ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ
ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԹՈՂՈՒՆՅԱՆ Ա.Հ., ՓԱՆՈՍՅԱՆ Հ.Հ., ԲԱՁՈՒԿՅԱՆ Ի.Լ.,
ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ Ա.Ա., ՊՈՊՈՎ ՅՈՒ.Գ.

ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

**ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ Ա. Հ., ՓԱՆՈՍՅԱՆ Հ. Հ., ԲԱԶՈՒԿՅԱՆ Ի. Լ.,
ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ Ա. Ա., ՊՈՊՈՎ ՅՈՒ. Գ.**

ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2014

ՀՏԴ 579(07)
ԳՄԴ 52.64 ց7
Մ 725

Գրախոսներ՝
Վ. Ա. Շեկոյան
Մ. Հերացու անվան ԵՊԲՀ-ի բժշկական մանրէաբանության ամբիոնի վարիչ, ՀՀ գիտության վաստակավոր գործիչ, բժշկական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր
Կ. Օ. Հովնանյան
Հայաստանի էլեկտրոնային մանրադիտակման ընկերության նախագահ, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի էլեկտրոնային մանրադիտակման լաբորատորիայի վարիչ, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր

Մ 725 Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքների ուսումնամեթոդական ձեռնարկ/ Ա. Հ. Թռչունյան, Հ. Հ. Փանոսյան, Ի. Լ. Բազուկյան, Ա. Ա. Մարգարյան, Յու. Գ. Պոպով.- Եր.: ԵՊՀ հրատ., 2014.- 316 էջ:

Մանրէաբանության լաբորատոր աշխատանքների ուսումնամեթոդական ձեռնարկը ընդգրկում է մանրէաբանության հիմնական օբյեկտների և դրանց ուսումնասիրման մեթոդների մասին համապարփակ տեղեկություններ: Ձեռնարկում շարադրված են մանրադիտակային պատրաստուկների պատրաստման և մանրադիտակման, սննդամիջավայրերի պատրաստման, լաբորատոր գործիքների և ապակեղենի նախապատրաստման և մանրէազերծման, մանրէների աճեցման, մաքուր կուլտուրաների մեկուսացման և դրանց ձևաբանական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական առանձնահատկությունների ուսումնասիրության մեթոդներ: Առանձին բաժիններ են նվիրված օդի, ջրի և հողի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությանն ու մանրէների քանակական վերլուծությանը:

Ձեռնարկը ներառում է նաև ինքնուրույն աշխատանքների կատարման առաջադրանքներ, թեստային հարցեր, ինչպես նաև մի շարք սննդամիջավայրերի, ներկանյութերի և ռեակտիվների բաղադրակազմն ու մանրէների մանրադիտակային պատկերներն ընդգրկող հավելվածներ:

Ձեռնարկը նախատեսված է բուհերի «Կենսաբանություն», «Կենսաքիմիա», «Կենսաֆիզիկա», «Կենսաինֆորմատիկա», «Դեղագործական քիմիա» և այլ մասնագիտություններով սովորող ուսանողների համար:

ՀՏԴ 579(07)
ԳՄԴ 52.64 ց7

ISBN 978-5-8084-1904-9

© ԵՊՀ հրատ., 2014
© Հեղ. խումբ, 2014

ՄԱՍ ԱՌԱՋԻՆ

ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ԵՎ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

ԳԼՈՒԽ 1 ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Մանրէներն անզեն աչքով անտեսանելի էակներ են: Կենդանի օրգանիզմների ֆիլոգենետիկական, նյութափոխանակային և էկոլոգիական կենսաբազմազանության ավելի քան 90%-ը բաժին է ընկնում միկրոաշխարհին, որն ընդգրկում է բոլոր պրոկարիոտաները և որոշ էուկարիոտային օրգանիզմները:

Պրոկարիոտները, որոնք ներկայացված են բակտերիաներով և արքեաներով, մեր մոլորակի հնագույն և ամենատարածված բնակիչներն են: Գրեթե բոլոր պրոկարիոտները միաբջիջ են, որոնց չափսերը տատանվում են 0.2-10 մկմ-ի սահմաններում: Դրանց շարքում կան «թզուկներ», օրինակ՝ բջջի 0.05 մկմ տրամագծով միկոպլազմները և նանոարքեաները, և «հսկաներ», որոնք տեսանելի են նույնիսկ անզեն աչքով, օրինակ՝ *Thiomargarita namibiensis*-ը (երկարությունը 0.75 մմ է): Տարբերում են պրոկարիոտային բջջի երեք հիմնական ձևեր՝ գնդաձև, ձողաձև և պարուրաձև: Հայտնաբերված են նաև խորանարդաձև, եռանկյան կամ քառանկյան ձև ունեցող, աստղաձև, տափակ և նույնիսկ տձև պրոկարիոտային բջիջներ: Դրանք տարածության մեջ կարող են դասավորվել մեկական, երկուական, կարճ և երկար կանոնավոր շղթաներով կամ անկանոն կույտերով: Ակտինոմիցետները առաջացնում են սնկամարմին հիշեցնող թելիկներ: Հայտնի են նաև «բազմաբջիջ» պրոկարիոտներ, որոնք առաջացնում են ուղիղ և ճյուղավորված թելաձև կառուցվածքներ՝ տրիխոմներ:

Պրոկարիոտների գերակշիռ մեծամասնությունը ունի ամուր բջջապատ, որը շրջապատում է պլազմային թաղանթը: Բակտերիաների բջջապատի կառուցվածքային առանձնահատկությունները ունեն կարևոր կարգաբանական նշանակություն: Տարբերում են գրամդրական, գրամբացասական և բջջապատից զուրկ բակտերիաներ:

Գրամդրական բակտերիաները տարբերվում են գրամբացասականներից բջջապատում մեծ քանակությամբ մուրեինի պարունակությամբ և արտաքին թաղանթի բացակայությամբ: Արքեաները, որոնք ունեն բջջապատ, իրենց կառուցվածքում մուրեին չեն պարունակում: Դրանցում բջջապատի հիմնակմախքը պսևդոմուրեինային է, իսկ որոշ արքեաների բջջապատն ունի սպիտակուցային կառուցվածք:

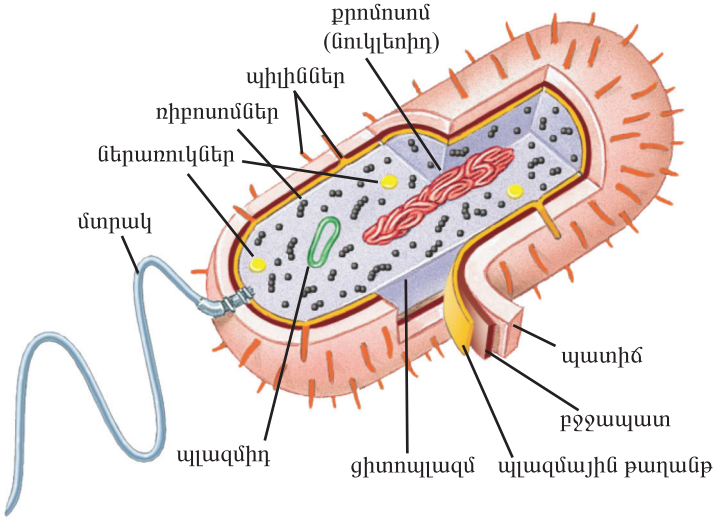
Բակտերիաների շատ տեսակներ բջջի մակերեսին ունեն թարթիչներ (ֆիմբրիաներ և պիլիններ), իսկ շարժուն ձևերի մեծամասնությունը՝ նաև մտրակներ: Բազմաթիվ պրոկարիոտային բջիջներ շրջապատված են տարբեր հաստությամբ պոլիսախարիդային, երբեմն գլիկոպրոտեիդային կամ պոլիպեպտիդային բնույթ ունեցող լորձային պատիճներով:

Պրոկարիոտները բնորոշվում են համեմատաբար պարզ ներբջջային կառուցվածքով և զուրկ են թաղանթային ծագման օրգանոիդներից: Որոշ պրոկարիոտներ ցիտոպլազմային թաղանթի ներփքման հետևանքով առաջացնում են ներբջջային թաղանթային բշտիկներ: Ներբջջային թաղանթային այդպիսի գոյացությունները հատկապես լավ ձևավորված են ֆոտոտրոֆ, նիտրիֆիկացնող և մեթանը օքսիդացնող բակտերիաներում: Որոշ ջրային կենսակերպ վարող բակտերիաների բջիջներում առաջանում են սպիտակուցային թաղանթով պատված գազային վակոլներ՝ աերոսոմներ: Պրոկարիոտների բազմաթիվ տեսակներ ցիտոպլազմում ներառուկների ձևով պարունակում են պաշարանյութեր՝ պոլիսախարիդներ, լիպիդներ, պոլի-β-օքսիկարագաթթու, պոլիֆոսֆատներ, ծծումբ: Էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաների առանձին տեսակներ առաջացնում են սպիտակուցային բնույթի հարսպորային մարմնիկներ:

Պրոկարիոտների ժառանգակիր նյութը հիմնականում ներկայացված է մեկ օղակաձև ԴՆԹ-ով: Այն համապատասխանում է մեկ քրոմոսոմի (հապլոիդ հավաքակազմ է) և հաճախ կոչվում է նուկլեոիդ:

Պրոկարիոտների շարքում կան ինչպես շարժուն, այնպես էլ անշարժ տեսակներ: Ընդհանուր առմամբ պրոկարիոտների շարժումն իրականանում է մտրակների շնորհիվ, իսկ որոշ բջիջների շարժումն իրականանում է սահելու միջոցով: Մտրակների թիվը և դասավորությունը բջջի մակերեսին ունի կարգաբանական նշանակություն: Պրոկարիոտային բջջի կառուցվածքի մոդելը բերված է նկար 1-ում:

Շարժուն բակտերիաներն ունակ են իրականացնելու տարբեր՝ աերո-, ֆոտո-, քեմո- և մագնիտա-տաքսիսներ:



Նկար 1. Պրոկարիոտային բջջի կառուցվածքի մոդելը:

Բակտերիաների մեծամասնությունը հիմնականում բազմանում է երկակի կիսմամբ, հազվադեպ՝ բողբոջմամբ, իսկ ուրիշները, օրինակ՝ ակտինոմիցետները, էկզոսպորներով կամ միցելիումի հատվածավորմամբ: Ցիանաբակտերիաներին բնորոշ է նաև բազմակի կիսմամբ բազմացումը: Բազմաբջիջ պրոկարիոտները կարող են բազմանալ տրիխոմից մեկ կամ մի քանի բջիջների անջատման հետևանքով:

Որոշ պրոկարիոտներ ունեն զարգացման բարդ կենսաշրջան, որի ընթացքում կարող է փոխվել բջջի ձևը կամ առաջանալ «հանգըստացող» ձևեր՝ ցիստեր, էնդոսպորներ կամ ակինետներ:

Բակտերիաները բնութագրվում են արագ բազմացման ունակությամբ: Բազմացման արագ տեմպերով օժտված են ֆոտոբակտերիաները, որոնց կիսումների միջև ընկած ժամանակը 8 րոպե է: Հաշվարկված է, որ անընդհատ աճի դեպքում աղիքային ցուպիկի՝ *Escherichia coli*-ի (կիսումների միջև ընկած ժամանակը 20 րոպե է) մեկ բջջի սերունդը 48 ժամ հետո կարող է առաջացնել Երկրի զանգվածը 150 անգամ գերազանցող կենսազանգված:

Մանրէների նյութափոխանակային գործընթացները բազմազան են: Տարբերում են ավտոտրոֆ (ինքնասուն) մանրէներ, որոնք բջջային միացությունների կենսասինթեզը ամբողջությամբ իրակա-

նացնում են CO_2-ի կամ այլ միածխածնային միացությունների հաշվին, և հետերոտրոֆ (տարասուն), որոնք որպես ածխածնի աղբյուր օգտագործում են պատրաստի օրգանական միացությունները: Հետերոտրոֆ մանրէները հիմնականում սապրոֆիտներ են, որոնք օգտագործում են այլ օրգանիզմների մահացման կամ կենսագործունեության ընթացքում առաջացած արգասիքային օրգանական միացությունները: Հետերոտրոֆ մանրէների շարքին են պատկանում նաև օբլիգատ (պարտադիր կամ անպայման) մակաբույծները (պարատրոֆները), որոնք օգտագործում են տեր օրգանիզմի սինթեզած բարդ օրգանական միացությունները, և հետևաբար, ամբողջությամբ կախված են տեր օրգանիզմի նյութափոխանակությունից:

Մանրէները ունակ են յուրացնելու ազոտի տարբեր միացություններ: Մանրէների մեծամասնությունը յուրացնում են ազոտի ինչպես վերականգնված անօրգանական (օրինակ՝ ամոնիումի աղերը), այնպես էլ օրգանական միացությունները (օրինակ՝ ամինաթթուները, միզանյութը), իսկ որոշները՝ ազոտի օքսիդացված միացությունները (օրինակ՝ նիտրատները, նիտրիտները): Դիազոտրոֆները (ազոտ ֆիքսողները), որոնք ներառում են ինչպես ազատ ապրող, այնպես էլ այլ օրգանիզմների հետ սիմբիոզ առաջացնող պրոկարիոտները, ունակ են որպես ազոտի աղբյուր յուրացնել մոլեկուլային ազոտը:

Նուկլեինաթթուների և բջջի այլ կառուցվածքների կազմի մեջ մտնող ֆոսֆորը մանրէները հիմնականում ստանում են ֆոսֆատներից:

Ամինաթթուների և որոշ կոֆակտորների կենսասինթեզի համար անհրաժեշտ ծծմբի աղբյուր են սուլֆատները: Մանրէները, որոնք օժտված չեն սուլֆատը վերականգնելու ունակությամբ, յուրացնում են միայն ծծմբի վերականգնված միացությունները:

Մանրէները կենսագործունեության համար անհրաժեշտ էներգիան ստանում են խմորման, շնչառության (աերոբ կամ օդակյաց և անաերոբ կամ անօդակյաց) կամ ֆոտոսինթեզի գործընթացներում:

Մանրէներում էներգիական փոխանակության գործընթացները բազմազան են: Ըստ էլեկտրոնային դոնորի, էներգիայի և ածխածնի աղբյուրի մանրէների էներգիական փոխանակության հիմնական ձևերը ամփոփված են աղյուսակ 1-ում:

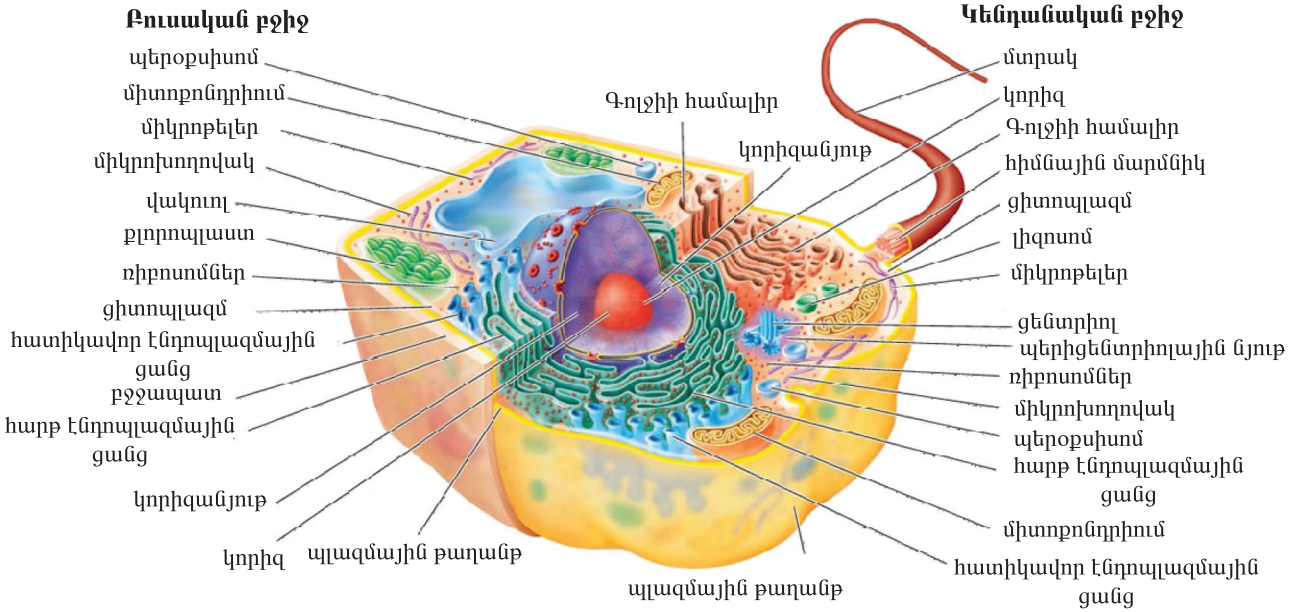
Աղյուսակ 1.

Մանրէների էներգիական փոխանակության ձևերի բազմազանությունը

Էներգիայի աղբյուր	Էլեկտրոնների դոնոր	Ածխածնի աղբյուր	
		Օրգանական միացություններ	CO_2
Լույս	Օրգանական միացություններ	Ֆոտոօրգանահետերոտրոֆիա	Ֆոտոօրգանավտոտրոֆիա
Լույս	Անօրգանական միացություններ	Ֆոտոլիթոհետերոտրոֆիա	Ֆոտոլիթոավտոտրոֆիա
Օրգանական միացություններ	Օրգանական միացություններ	Քեմոօրգանահետերոտրոֆիա	Քեմոօրգանավտոտրոֆիա
Անօրգանական միացություններ	Անօրգանական միացություններ	Քեմոլիթոհետերոտրոֆիա	Քեմոլիթոավտոտրոֆիա

Էուկարիոտ մանրէները ներկայացված են նախակենդանիներով և սնկերի ու ջիրիմուռների բազմաթիվ ներկայացուցիչներով: Էուկարիոտային բջջի կառուցվածքի մոդելը բերված է նկար 2-ում:

Նախակենդանիները՝ սարկոմաստիգոֆորաները (*Sarcomastigophora*), սպորավորները (*Sporozoa*), կնիդոսպորավորները (*Cnidosporidia*), միկրոսպորավորները (*Microsporidia*) և թարթչավորները (*Ciliophora*) լայնորեն տարածված են բնության մեջ և կազմում են միաբջիջ հետերոտրոֆ (քեմոօրգանահետերոտրոֆ) մանրէների մեծ խումբ: Զուրկ են բջջապատից (որոշ ներկայացուցիչներ ունեն խեցի) և սննդանյութերը կլանում են (աբսորբում են) բջջաթաղանթով կամ էնդոցիտոզով: Բազմացումը իրականանում է սեռական և անսեռ եղանակներով, երբեմն վերարտադրության երկու եղանակները հերթագայում են օրգանիզմի զարգացման կենսաշրջանում:



Նկար 2. Էուկարիոտային բջջի կառուցվածքի մոդելը:

Սնկերը հետերոտրոֆ (քեմոօրգանահետերոտրոֆ) մանրէների մեծ խումբ են կազմում և լայնորեն տարածված են բնության մեջ: Սնկերի մեծամասնությունը սապրոֆիտներ են, ներառում են նաև մակաբույծ տեսակներ: Գրեթե բոլոր սնկերին բնորոշ է միցելիումի առաջացումը: Սնկերի սեռական և անսեռ բազմացման առանձնահատկությունները, սեռական բազմացման ընթացքում սպորների առաջացման ձևը, բջջապատի պոլիսախարիդային կազմը, լիզինի կենսասինթեզի ուղիները, ինչպես նաև զարգացման կենսաշրջանում շարժուն ձևերի մտրակների թվաքանակը, կառուցվածքը և դասավորությունը ունեն կարգաբանական նշանակություն: Մանրէաբանության ուսումնասիրության օբյեկտներ են սնկանման օրգանիզմների՝ լաբիրինթուլոմիցետների (*Labyrinthulomycota*), հիֆոխիտրիդիոմիցետների (*Hyphochytridiomycota*) և օոմիցետների (*Oomycota*) և իսկական սնկերի՝ խիտրիդիոմիցետների (*Chytridiomycota*), զիգոմիցետների (*Zygomycota*), ասկոմիցետների (*Ascomycota*), բազիդիոմիցետների (*Basidiomycota*) և դեյտերոմիցետների (*Deuteromycota*) բազմաթիվ ներկայացուցիչները:

Ջրիմուռները ֆոտոտրոֆ (ֆոտոլիթոավտոտրոֆ) օրգանիզմներ են, պարունակում են կարոտինոիդներ և քլորոֆիլ *a*, ուրիշները՝ նաև քլորոֆիլ *b* և/կամ *c* և ֆիկոբիլինններ: Գունանյութերի կազմով պայմանավորված է ջրիմուռների գույնը: Ջրիմուռների բջիջներում կարող են կուտակվել մի շարք պաշարանյութեր՝ օսլա, պարամիլոն, լամինարին: Ջրիմուռները դասակարգվում են ըստ ձևաբանական կառուցվածքի, շարժունակության, գունանյութերի կազմի, պաշարանյութերի բնույթի, բջջապատի բաղադրության: Դրանք բաժանվում են մի շարք խմբերի, որոնցից մանրէաբանության ուսումնասիրման օբյեկտներն են կանաչ (*Chlorophyta*), օքրոֆիտային (*Ochrophyta*), հապտոֆիտային (*Haptophyta*), կրիպտոֆիտային (*Cryptophyta*), դինոֆիտային (*Dinophyta*), էվգլենային (*Euglenophyta*) և կարմիր (*Rhodophyta*) ջիրիմուռների բազմաթիվ ներկայացուցիչները:

Մանրէների շարքին են դասվում նաև կյանքի ոչ բջջային ձևերը՝ վիրուսները (այդ թվում՝ ֆագերը), վիրոիդները և պրիոնները:

ԳԼՈՒԽ 2 ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅԻ ԿԱՀԱՎՈՐՈՒՄԸ ԵՎ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅՈՒՄ ԱՇԽԱՏԵԼՈՒ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ

Մանրէաբանական հետազոտություններում հիմնականում օգտագործվում են մանրէների մաքուր կուլտուրաներ: Մաքուր կուտուրա են անվանում մեկ տեսակի (շտամի) մանրէների պոպուլյացիան: Եթե կուլտուրան պարունակում է մեկից ավելի տեսակի մանրէային բջիջներ, այն կոչում են խառը կամ կոնտամինացված: Օդում և առարկաների (սեղանների, գործիքների, հագուստների, սարքավորումների) մակերեսին, ինչպես նաև ձեռքերի, մաշկի, մազերի վրա կան մեծ քանակությամբ տարատեսակ մանրէներ, հետևաբար, մանրէների հետ աշխատելիս հնարավոր կոնտամինացումից խուսափելու համար անհրաժեշտ է անընդհատ պահպանել ուսումնասիրվող մանրէային կուլտուրայի մաքրությունը:

Կախված հետազոտության նպատակից տարբերում են ուսումնական, արտադրական, գիտահետազոտական և ախտորոշիչ մանրէաբանական լաբորատորիաներ: Վարակիչ, հատկապես հատուկ վտանգավոր վարակիչ, հիվանդությունների հարուցիչները ուսումնասիրվում են միայն հատուկ լաբորատորիաներում, որոնցում ապահովված է աշխատակիցների անվտանգությունը և բացառված է լաբորատորիայից ախտածին մանրէների արտահոսքը: Մենք կանդրադառնանք ուսումնական մանրէաբանական լաբորատորիայում աշխատելու կանոններին և այդ լաբորատորիային ներկայացվող հիմնական պահանջներին:

Մանրէաբանական լաբորատորիան պետք է ընդգրկի բնական լավ լուսավորված (>110 լյուքս) ընդարձակ տարածք: Սեղանների մակերեսը պետք է պատված լինի հեշտ մաքրվող պաստառներով (օրինակ՝ պլաստիկատով), հատակը պետք է լինի սալիկապատված կամ պատված լինոլեումով, իսկ պատերը պետք է յուղաներկով հատակից առնվազն 170 սմ բարձրությամբ լինեն ներկված կամ սալիկապատված: Հիմնական աշխատանքային տարածքը պետք է կահավորված լինի լաբորատոր սեղաններով, սարքավորումների, ամանեղենի և ռեակտիվների պահպանման համար նախատեսված պահարաններով և դարակներով:

Բացի հիմնական աշխատանքային տարածքից լաբորատո-

Ջերմապահարան

Թափահարիչ

Ջեռոց

Լամինար բոքս

Մանրէասպան լամպեր

Ավտոկլավ

Նկար 3. Մանրէաբանական լաբորատորիայի որոշ սարքավորումներ:

ռիաներում պետք է լինի. ա) մանրէազերծման համար նախատեսված սենյակ կամ տարածք, որտեղ պետք է տեղավորել ավտոկլավները ու ջեռոցները (նկար 3), բ) մանրէների աճեցման համար նախատեսված սենյակ կամ տարածք, որտեղ պետք է տեղավորել ջերմապահարանները (թերմոստատները) (նկար 3), գ) սառնարանային սենյակ կամ տարածք և լվացարան: Մանրէների ցանքը և փոխացանքը իրականացնում են տարբեր կառուցվածք ունեցող հատուկ խցիկներում՝ լամինար բոքսերում (նկար 3), որոնցում մաքրությունը ապահովվում է ֆիլտրերի միջոցով մանրէազերծված օդային հոսքի շրջանառությամբ: Հատուկ խցիկների բացակայության դեպքում մանրէների հետ աշխատանքները կատարում են լաբորատորիայում մեկուսացված առանձին տարածքներում:

Լամինար բոքսերում սովորաբար ներկառուցված են ուլտրամանուշակագույն լամպեր: Աշխատանքը սկսելուց առաջ, լամինար բոքսի ներքին բոլոր հասանելի մակերեսներն անհրաժեշտ է մշակել չեզոք դետերգենտների լուծույթներով և քիմիական ախտահանիչներով (70% էթանոլ), որից հետո միացնել ուլտրամանուշակագույն լամպը (մինչև 40 րոպե):

Լամինար բոքսում կոնտամինացումից խուսափելու համար պետք է աշխատել գազայրոցի կամ սպիրտայրոցի բոցին մոտ:

Մանրէաբանական լաբորատորիայի նախապատրաստումը աշխատանքի

Մանրէաբանական լաբորատորիան անհրաժեշտ է պահպանել մաքուր վիճակում: Օդում, ինչպես նաև սարքերի ու առարկաների մակերեսից մանրէների թվաքանակը հնարավորինս նվազեցնելու նպատակով պետք է պարբերաբար իրականացնել լաբորատոր սարքերի և տարածքի մաքրում:

Մանրէաբանական լաբորատորիայի կահույքը, հատակը և պատերը մաքրում են փոշեկուլով և լվանում տարբեր մանրէազերծող նյութերով: Որպես մանրէազերծող նյութեր հաճախ օգտագործում են սոդայի (Na_2CO_3) 2-3%, ֆենոլի (կարբոլաթթու) 3-5% և քլորամինի 0.5-3% ջրային լուծույթները:

Օդափոխությունը (ոչ պակաս 30-60 րոպե), հատկապես արտաքին օդի և լաբորատորիայի օդի ջերմաստիճանների կտրուկ տարբերության պայմաններում, զգալի նվազեցնում է մանրէների քանակությունը:

Օդի մանրէազերծման ավելի նպատակային և հաճախ կիրառվող եղանակ է ճառագայթահարումը 260 նմ ալիքի երկարությամբ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով: Այս ճառագայթներն օժտված են մանրէասպան հատկությամբ և ոչնչացնում են ոչ միայն մանրէների վեգետատիվ բջիջները, այլ նաև դրանց սպորները: Ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցությունը պետք է լինի անմիջական և երկարատև: Դա պայմանավորված է ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ցածր թափանցելիությամբ: Դրանք չեն թափանցում հասարակ ապակիով և հեշտությամբ կլանվում են փոշու հատիկներով: Բացի դրանից, սպիտակ թղթի էջերը, ալյումինե կամ քրոմե թիթեղները, ինչպես նաև դրանցից պատրաստված առարկաները կարող են զգալիորեն անդրադարձնել ուլտրամանուշակագույն ճառագայթները: Այդ պատճառով մանրէազերծման համար անհրաժեշտ է ճառագայթահարել 30 րոպեից մինչև մի քանի ժամ՝ կախված օդի աղտոտվածությունից:

Որպես ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների աղբյուր օգտագործում են մանրէասպան լամպեր (նկար 3): Դրանցում, գազային սնդիկի ցածր ճնշման պայմաններում առաջանում է էլեկտրական աղեղ, որն էլ ճառագայթում է: Սովորաբար մանրէասպան լամպերն իրենցից ներկայացնում են տարբեր տրամագիծ և երկարություն ունեցող հատուկ ապակյա խողովակներ, որոնք թափանցելի են 254 նմ երկարություն ունեցող ալիքների համար:

Անհրաժեշտ է իմանալ, որ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթները կարող են հարուցել աչքերի ծանր վնասվածքներ, այդ պատճառով մանրէասպան լամպերի հետ աշխատելիս անհրաժեշտ է զգուշանալ աչքերի վրա ինչպես ուղիղ, այնպես էլ անդրադարձված ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների անմիջական ազդեցությունից: Մանրէասպան լամպերի աշխատանքի ընթացքում արգելվում է անձնակազմին մնալ լաբորատորիայում: Երկարատև անընդհատ աշխատանքի դեպքում մանրէասպան լամպերի ճառագայթման ուժգնությունն ընկնում է: Այդ պատճառով ճառագայթահարումը նպատակահարմար է իրականացնել ընդհատումներով:

Մանրէների աճեցման համար նախատեսված աշխատանքային տարածքը պետք է մանրէազերծել առավել մանրակրկիտ: Մինչ աշխատանքը և աշխատանքից հետո աշխատանքային սեղանները հարկավոր է մշակել ախտահանիչ նյութերով (քլորամին, 70% էթանոլ կամ իզոպրոպանոլ): Նշված լուծույթներով հարկավոր է մանրէազերծել նաև ձեռքերը: Աշխատանքային սեղանի մակերեսը

կարելի է մանրէազերծել նաև ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով, ընդ որում, պետք է հաշվի առնել, որ որքան ճառագայթահարվող մակերեսը մոտ է գտնվում ճառագայթման աղբյուրին, այնքան ճառագայթների մանրէասպան ազդեցությունը արդյունավետ է:

Լաբորատորիայում խստիվ արգելվում է ծխել, սնվել, խմել, սնընդամթերք պահել, ծամել: Անհրաժեշտ է աշխատել միայն հատուկ հագուստով (խալաթներով):

Մանրէների կուլտուրաների հետ աշխատանքի կանոնները

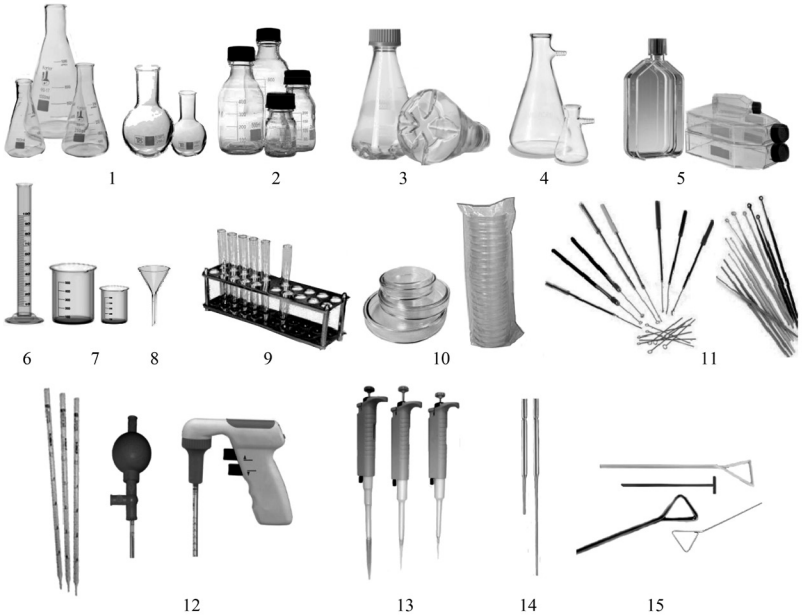
Լաբորատորիայում մանրէներն աճեցնում են սրվակներում, անոթներում, Պետրիի թասերում լցված սննդամիջավայրերում: Ամանեղենը և սննդամիջավայրերը նախապես մանրէազերծում են:

Մանրէների ներմուծումը սննդամիջավայր անվանում են ցանք կամ ինոկուլյացում: Մանրէների ցանքի ընթացքում անհրաժեշտ է հետևել որոշակի կանոնների, որոնք թույլ են տալիս խուսափելու կոնտամինացումից: Ցանքից առաջ պետք է սրվակների, անոթների և Պետրիի թասերի վրա նշել մանրէի անվանումը և ցանքի ամսաթիվը:

Մանրէների ցանքի համար, եթե մանրէներն աճեցված են պինդ սննդամիջավայրերի վրա, օգտագործում են մանրէաբանական (կամ բակտերիաբանական) ասեղ կամ օղակ (նկար 4):

Եթե մանրէներն աճեցված են հեղուկ սննդամիջավայրում, առավել հարմար է օգտագործել մանրէազերծված կաթոցիչ (պիպետ): Մանրէաբանական ասեղը կամ օղակը պատրաստում են վոլֆրամային կամ նիքրոմային բարակ մետաղալարից, որն ամրացված է մետաղյա կամ ապակյա բռնակին: Մանրէաբանական օղակի տրամագիծը պետք է լինի 4-5 մմ: Ցանքսից առաջ մանրէաբանական օղակը կամ ասեղը մանրէազերծվում է սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցի վրա շիկացնելով (նկար 5): Միաժամանակ պետք է բոցով մանրէազերծել բռնակին կից հատվածը:

Հարկավոր է մանրէաբանական օղակը պահել բոցի կողմնային



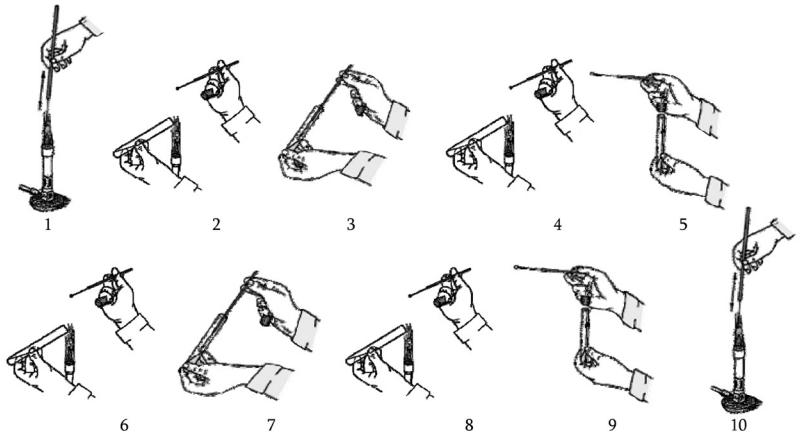
Նկար 4. Մանրէաբանական լաբորատորիայում կիրառվող ամանեղեն և պարագաներ: *1. Ապակյա անոթներ, 2. Ապակյա անոթներ պլրլրվող խցաններով, 3. Պայրի ներրիքումներ ունեցող անոթ, 4. Բունզենի անոթ, 5. Մայրրաս, 6. Չափանոթ, 7. Չափանշմամբ բաժակ, 8. Չաղար, 9. Սրվակներ շրայրիվում, 10. Պետրրիի բասեր, 11. Մանրէաբանական օղակներ, 12. Պիպետներ և պիպետների համար նախատեսված բաժանաչափեր, 13. Ակրոմատ պիպետներ ծայրակալներով, 14. Պասրերյան պիպետներ, 15. Մածկաթիակներ (Դրեգալսկու շպատելներ):*

և վերին հատվածներում այնպես, որպեսզի մետաղալարը հավասարաչափ շիկանա ամբողջ երկարությամբ: Շիկացման ընթացքում պետք է հիշել, որ սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցի առավելագույն ջերմաստիճանը դրա վերին և կողմնային հատվածներում է (նկար 5.3): Շիկացնելուց հետո ասեղը կամ օղակը նախ սառեցնում են հպելով անոթի կամ սրվակի ներքին մակերեսին կամ մանրէներից զերծ սննդամիջավայրին, որից հետո վերցնում են մանրէային կենսազանգվածի փոքր քանակություն:

Նկար 5. Մանրէազերծման համար նախատեսված այրոցներ:
1. *Գազայրոց, 2. Սպիրտայրոց, 3. Ջերմաստիճանի արժեքները գազայրոցի բոցի տարբեր հատվածներում (°C):*

Սրվակում պինդ սննդամիջավայրի վրա աճեցված մանրէների բջիջների առանձնացումն իրականացնում են հետևյալ կերպ: Սրվակը հորիզոնական դիրքով կամ խցանի ծայրով դեպի վեր պահում են ձախ ձեռքում այնպես, որպեսզի սննդամիջավայրի վրա աճած մանրէային փառը լինի տեսանելի: Այնուհետև, շարունակելով ձեռքում պահել մանրէաբանական օղակը, աջ ձեռքի մատնեմատով և ճկույթով սեղմում են խցանը ափին, հանում այն սրվակից և նույն դիրքով պահում: Մանրէային կուլտուրայով բաց անոթի կամ սրվակի եզրերը մանրէազերծում են սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցով: Նույն բոցով շիկացնելով՝ մանրէազերծում են նաև մանրէաբանական օղակը, և այն խորասուզում սրվակի մեջ:

Շիկացած մանրէաբանական օղակը նախ սառեցնում են հպելով սրվակի ներքին մակերեսին կամ մանրէներից զերծ սննդամիջավայրին, ապա, պինդ սննդամիջավայրի մակերեսից վերցնելով կենսազանգվածի մի փոքր մաս, հանում են մանրէաբանական օղակը սրվակից՝ հետևելով որպեսզի փոխացանվող զանգվածը չդիպչի սրվակի պատերին և եզրերին: Սրվակի եզրերը նորից մանրէազերծում են սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցով, ապա խցանում սրվակը (նկար 6):



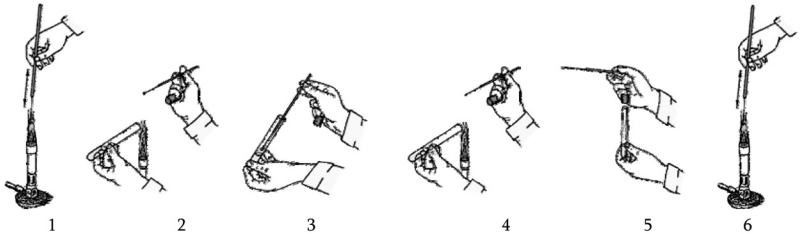
Նկար 6. Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսից մանրէների փոխացանքի հաջորդական փուլերը:

1. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 2. Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին մանրէների կենսազանգված պարունակող սրվակի խցանի հեռացում, 3. Մանրէային կենսազանգվածի վերցնում, 4. Սրվակի եզրերի մանրէազերծումը գազայրոցի բոցով, 5. Սրվակի խցանում, 6. Պինդ սննդամիջավայրով լցված սրվակի խցանի հեռացում, 7. Մանրէաբանական օղակով կենսազանգվածի ցանքը շեղ ագարացված սննդամիջավայրի մակերեսին, 8. Մանրէաբանական օղակի հեռացում սրվակից և սրվակի եզրերի մանրէազերծումը գազայրոցի բոցով, 9. Սրվակի խցանում, 10. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում:

Բամբակյա խցանն այրվելու դեպքում անհրաժեշտ է այն անմիջապես տեղադրել անոթի կամ սրվակի մեջ: Չի կարելի փչել վառվող խցանի վրա, քանի որ այն կուժեղացնի այրումը: Եթե փոխացանքի ընթացքում խցանն ընկնում է հատակին կամ սեղանին, ապա այն չի կարելի օգտագործել: Պետք է վերցնել նոր մանրէազերծված անոթ կամ սրվակ և վերսկսել աշխատանքը:

Եթե կուլտուրան փոխացանում են շեղ ագարացված սննդամիջավայրի՝ շեղակի վրա, ապա մանրէաբանական օղակն առանց ագարային մակերեսը վնասելու խորասուզում են մինչև սրվակի հատակը, և, թեթևակի հպելով մակերեսին, ցանք են կատարում՝ օղակը սահեցնելով ներքևից վերև զիգզագաձև կամ ուղիղ գծով (շտրիխով):

Հեղուկ սննդամիջավայրում ցանք իրականացնելիս կենսազանգվածը մանրէաբանական օղակով մինչև հեղուկի մեջ խորասուզելը հպում են սրվակի կամ անոթի պատին և տարածում: Այնուհետև, անոթը կամ սրվակը մի փոքր թեքելով, հեղուկ սննդամիջավայրում լուծում են պատին տարածված կենսազանգվածը մանրէների համասեռ կախույթ ստանալու համար (նկար 7):

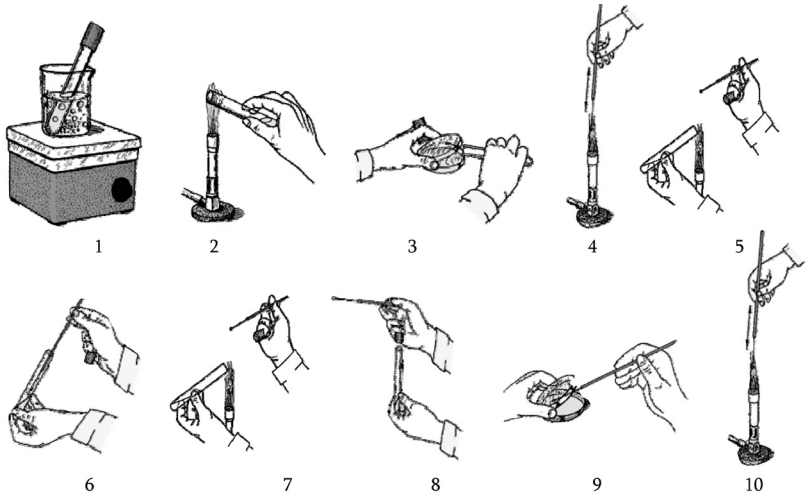


Նկար 7. Հեղուկ սննդամիջավայրում մանրէների ցանքի հաջորդական փուլերը:
1. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 2. Հեղուկ սննդամիջավայրով լցված սրվակի խցանի հեռացում, 3. Մանրէային կենսազանգվածի տեղադրում սրվակի պատին, 4. Մանրէաբանական օղակի հեռացում սրվակից և սրվակի եզրերի մանրէազերծում գազայրոցի բոցով, 5. Սրվակի խցանում, 6. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում:

Փոխսացանքից հետո մանրէների բջիջները, որոնք մնացել են մանրէաբանական օղակի վրա, այրում են սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցով:

Հեղուկ սննդամիջավայրում աճեցված կենսազանգվածը տեղափոխում են սովորական կամ ավտոմատ պիպետով: Մանրէազերծված պիպետը, վերին ծայրից բռնելով, խորասուզում են սրվակի կամ անոթի մեջ, որում աճեցվել է մանրէն: Օգտագործված պիպետն անմիջապես տեղադրվում է մանրէազերծող լուծույթի, օրինակ՝ 3-5% ֆենոլի կամ 2% քլորամինի լուծույթի մեջ:

Հեղուկ սննդամիջավայրից Պետրիի թասերում լցված պինդ սննդամիջավայրի վրա ցանքը կատարվում է հետևյալ եղանակով: Նախօրոք մանրէազերծված պինդ (ագարացված) սննդամիջավայրը ջրային բաղնիքում կամ միկրոալիքային վառարանում հալեցնելուց հետո լցվում է մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ (նկար 8):



Նկար 8. Հեղուկ սննդամիջավայրից պինդ սննդամիջավայրի վրա մանրէների փոխացանքի հաջորդական փուլերը:

1. Ջրային բաղնիքում սրվակում լցված ազարացված սննդամիջավայրի հալեցում, 2. Սրվակի եզրերի մանրէազերծում, 3. Պետրիի թասերի մեջ հալեցված սննդամիջավայրի լցնում, 4. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 5. Մանրէային կենսազանգվածով լցված սրվակի եզրերի մանրէազերծում, 6. Մանրէաբանական օղակով սրվակից մանրէների կենսազանգվածի վերցնում, 7. Սրվակի խցանում, 8. Մանրէային կենսազանգվածի ցանք Պետրիի թասում լցված ազարացված սննդամիջավայրի մակերեսին, 9. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում:

Դրա համար աջ ձեռքով պետք է բռնել սննդամիջավայրով լցված սրվակը, ձախ ձեռքի ճկույթի և մատնեմատի օգնությամբ հանել խցանը, մանրէազերծել սրվակի եզրերը սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցով, ապա ձախ ձեռքի բութ մատի և միջնամատի օգնությամբ բացել Պետրիի թասի կափարիչը և հալեցված սննդամիջավայրն անմիջապես լցնել թասի մեջ այն քանակությամբ (20-30 մլ), որպեսզի թասի հատակն ամբողջությամբ ծածկվի սննդամիջավայրով: Այնուհետև պետք է կափարիչն անմիջապես փակել և թասը թողնել անշարժ վիճակում մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը: Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո պետք է բացել Պետրիի թասը, պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին տեղադրել կենսազանգվածի կախույթը, ապա զգուշությամբ տարածել մանրէազերծված մածկաթիակով կամ մանրէաբանական օղակով:

Բոլոր նկարագրված գործողությունները կոնտամինացումից խուսափելու նպատակով անհրաժեշտ է իրականացնել հնարավորինս արագ և սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցին մոտ: Այդ ըն-

թացքում ցանկալի չէ կատարել կտրուկ շարժումներ, քայլել մաքուր կուլտուրայի հետ աշխատող մարդկանց կողքով, խոսել, քանի որ օդի շարժումը մեծացնում է կոնտամինացման հավանականությունը: Փոխացանքից հետո սրվակները տեղադրվում են ջերմապահարաններ: Օգտագործված ամանեղենը, որը պարունակում է մանրէների կուլտուրաներ, անհրաժեշտ է նախ մանրէազերծել ավտոկլավում, ապա լվանալ:

Փորձնական արդյունքների գրանցումներ

Փորձնական արդյունքների գրանցամատյանում պետք է գրանցել կատարված փորձի ընթացքի և արդյունքների վերաբերյալ տվյալները: Գրանցումը պետք է լինի հստակ, ճշգրիտ և ընդգրկի տեղեկություններ հետևյալ հաջորդականությամբ.

- փորձի անվանումն ու նպատակը, իրականացման և ավարտման ամսաթվերը,
- հետազոտման օբյեկտները,
- փորձի իրականացման պայմանները,
- օգտագործվող վերլուծական մեթոդների նկարագրությունը,
- ստացված տվյալները:

Թվային տվյալները պետք է ներկայացվեն աղյուսակներով: Անհրաժեշտության դեպքում փորձի ընթացքը կամ արդյունքները պետք է ներկայացնել նաև գծապատկերներով, դիագրամներով կամ նկարներով: Յուրաքանչյուր փորձնական աշխատանք պետք է հիմնվի ինքնուրույն դիտարկումների և եզրակացությունների վրա, որոնք ևս գրանցվում են գրանցամատյանում: Գրանցամատյանը միշտ պահպանվում է այն լաբորատորիայում, որտեղ իրականացվել է փորձը:

ԳԼՈՒԽ 3 ՍՆՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԵՐ ԵՎ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԱՃԵՑՈՒՄԸ

Մանրէների աճեցումը կամ կուլտիվացումը մանրէաբանության հիմնական մեթոդներից է: Մանրէների աճեցման համար կարևոր է իմանալ դրանց նյութափոխանակության առանձնահատկությունները և կենսագործունեության համար անհրաժեշտ միջավայրի ֆիզիկաքիմիական պայմանները:

Մանրէների աճեցման համար կիրառվող սննդամիջավայրեր

Սննդանյութերը, որոնք անհրաժեշտ են մանրէների աճի և զարգացման համար բազմազան են և որոշվում են մանրէների նյութափոխանակության առանձնահատկություններով: Մանրէների աճի համար նախատեսված սննդամիջավայրերը նախ պետք է պարունակեն բջջի համար հասանելի էներգիայի աղբյուրներ: Ընդ որում, քեմոօրգանատրոֆ մանրէների համար էներգիայի աղբյուր են օրգանական նյութերը, իսկ քեմոլիթոտրոֆների համար՝ անօրգանական վերականգնված միացությունները: Ֆոտոտրոֆ մանրէները սննդամիջավայրում որպես էներգիայի աղբյուր օրգանական կամ անօրգանական նյութեր չեն պահանջում, քանի որ դրանց համար որպես էներգիայի աղբյուր ծառայում է լույսը: Սննդամիջավայրը պետք է պարունակի նաև բոլոր այն բաղադրամասերը, որոնք անհրաժեշտ են բջջում նյութափոխանակային, հատկապես կենսասինթեզի գործընթացները իրականացնելու համար: Հետերոտրոֆ մանրէներն իրենց անհրաժեշտ օրգանական նյութերի կենսասինթեզի համար որպես ածխածնի աղբյուր պահանջում են երկ- կամ բազմածխածնային օրգանական միացություններ՝ ածխաջրեր, թթուներ, սպիրտներ և այլն, իսկ ավտոտրոֆ մանրէները՝ միածխածնային (կամ անօրգանական) միացություններ՝ ածխաթթու գազ, մեթան, մեթանոլ և այլն: Հետերոտրոֆ մանրէների գերակշիռ մեծամասնության համար միևնույն օրգանական միացությունը միաժամանակ կարող է ծառայել և՛ ածխածնի, և՛ էներգիայի աղբյուր:

Մանրէները տարբերվում են նաև ըստ ազոտի աղբյուրի յուրաց-

ման ունակության: Որոշ պրոկարիոտային մանրէներ՝ դիազոտրոֆները, որպես ազոտի աղբյուր, ունակ են յուրացնել մոլեկուլային ազոտը և կարող են աճել սննդամիջավայրում ազոտական միացությունների բացակայության պայմաններում (ազոտային ավտոտրոֆներ): Բազմաթիվ մանրէներ սննդամիջավայրում պահանջում են ազոտի օքսիդացված կամ վերականգնված անօրգանական միացությունների, հիմնականում ամոնիումի աղերի կամ նիտրատների առկայությունը: Մանրէների մեկ այլ խումբ էլ, որպես ազոտի միակ աղբյուր, ունակ է յուրացնելու ազոտի օրգանական միացությունները, օրինակ՝ ամինաթթուները, պուրինները, պիրիմիդինները, միզանյութը: Ամինաթթուները (*L*- կամ *DL*- ձևերը), որպես անհրաժեշտ ազոտի աղբյուր, ավելացնում են 100 մլ մանրէազերծված սննդամիջավայրին 0.1 մգ-ից մինչև 0.05 գ հաշվարկով: Գլիցինը, ալանինը, պրոլինը, լիզինը և օրնիտինը լուծվում են թորած ջրում, ֆենիլալանինն ու տրիպտոֆանը՝ NaOH-ով հիմնայնացված թորած ջրում, իսկ մնացած ամինաթթուները՝ HCl-ով թթվեցված թորած ջրում: Ցիստինը, ցիստեինը, գլուտամինն ու ասպարագինը ջերմազգայուն են, հետևաբար, դրանց մանրէազերծում են ֆիլտրելով: Մնացած ամինաթթուները կարելի է մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ավելցուկային մթնոլորտային ճնշման (ամճ) պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում:

Մանրէների պահանջը մի շարք ամինաթթուների նկատմամբ բավարարելու համար հաճախ սննդամիջավայրին ավելացնում են սպիտակուցի հիդրոլիզատ: Հիդրոլիզատների կազմը, կախված ելային սուբստրատից և ստացման եղանակից, տարբերվում է: Հաճախ օգտագործվում է կազեինի հիդրոլիզատը, որը սովորաբար պատրաստվում է լաբորատորիայում թթվային հիդրոլիզի եղանակով: Դրա քանակությունը սննդամիջավայրում, կախված մանրէի պահանջից, տատանվում է 1 մգ-ից մինչև 0.1 գ 100 մլ սննդամիջավայրի համար:

Առավել պահանջկոտ մանրէներն աճեցվում են սպիտակուցներ կամ դրանց ոչ լրիվ ճեղքման արգասիքներ՝ պեպտոններ, պարունակող սննդամիջավայրերում: Պեպտոնը պոլի- և օլիգոպեպտիդների, ամինաթթուների, օրգանական ազոտական հիմքերի, աղերի և միկրոտարրերի խառնուրդ է և ստացվում է պրոտեազներով կենդանական կամ բուսական ծագում ունեցող սպիտակուցների ճեղքման հետևանքով: Պեպտոնն ավելացնում են 1-2 գ-ից մինչև 20 գ 1 լ սնընդամիջավայրի համար:

Անհրաժեշտ է հիշել, որ մանրէները կարող են օգտագործել ամի-

նաթթուները և պեպտոնը թե՛ որպես ազոտի, թե՛ որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր:

Բազմաթիվ մանրէների աճի համար անհրաժեշտ են այսպես կոչված աճի գործոններ, որոնց շարքին են դասվում վիտամինները, պուրինները, պիրիմիդինները և ամինաթթուները: Իրենց աճի համար այդ գործոնների նկատմամբ պարտադիր պահանջ ունեցող մանրէները կոչվում են աուքսոտրոֆներ: Պրոտոտրոֆները, ընդհակառակը, կարող են աճել սննդամիջավայրում աճի գործոնների բացակայության պայմաններում: Եթե մանրէների աճը սահմանափակվում է մեկ կամ մի քանի վիտամիններով, ապա խորհուրդ է տրվում սննդամիջավայրերին ավելացնել 1 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով թիամին (վիտամին B_1), Ca-ի պանտոտենատ, ռիբոֆլավին (վիտամին B_2), նիկոտինաթթու (նիացին), պիրիդոքսին, պիրիդոքսինամին, խոլին, կոբալամին (վիտամին B_{12}), 0.005 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով՝ բիոտին, և 0.05 մկգ/մլ կոնցենտրացիայով՝ ֆոլաթթու և պարաամինաբենզոյաթթու:

Վիտամինները լուծույթների ձևով ավելացնում են մանրէազերծված սննդամիջավայրը մանրէներով ինոկուլացումից անմիջապես առաջ: Լուծույթները պատրաստում են նախօրոք մանրէազերծված թորած ջրում և մանրէազերծված անոթներում: Բացառություն են կազմում ռիբոֆլավինը և ֆոլաթթուն: Ռիբոֆլավինը լուծում են 0.02 Ն քացախաթթվի մեջ, իսկ ֆոլաթթուն՝ 0.01 Ն NaOH-ում՝ հասցնելով լուծույթում NaOH-ի կոնցենտրացիան մինչև 0.001 Ն: Ստացված լուծույթները մանրէազերծում են եռացող ջրային բաղնիքում 3 րոպեի ընթացքում ջերմամշակմամբ: Թիամինի լուծույթը խորհուրդ է տրվում մանրէազերծել ֆիլտրելով, քանի որ ջերմամշակման ենթարկելիս թիամինը քայքայվում է: Վիտամինների լուծույթները 4°C ջերմաստիճանային պայմաններում կարելի է պահպանել մեկ ամիս: Ֆոլաթթվի, պիրիդոքսինի և ռիբոֆլավինի լուծույթները պահպանում են մթության մեջ, քանի որ դրանք լուսազգայուն են:

Տարբեր աճի գործոններ պարունակող խառնուրդների օրինակներ են շաքարասնկային լուծամզվածքը, շաքարասնկային ավտոլիզատը, եգիպտացորենային լուծամզվածքը: 100 մլ սննդամիջավայրին ավելացնում են 0.05-0.5 գ շաքարասնկային լուծամզվածք, իսկ շաքարասնկային ավտոլիզատը ավելացնում են այնքան, որպեսզի ամինային ազոտի քանակությունը կազմի 5-30 մգ: Շաքարասնկային ավտոլիզատը կարելի է պատրաստել լաբորատորիայում: Եգիպտացորենային լուծամզվածքը օսլա-մաթային արտադրու-

թյան արտադրանք է: Այն պարունակում է ամինաթթուներ, վիտամիններ, մեծ քանակությամբ օրգանական թթուներ (կաթնաթթու, քացախաթթու և մրջնաթթու) և հանքային աղեր: Եգիպտացորենային լուծամզվածքն ավելացնում են սննդամիջավայրին 0.2-5% չափով և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

Մանրէների բջջանյութի կառուցման համար անհրաժեշտ են ֆոսֆորը, ծծումբը, կալիումը և մի շարք այլ քիմիական տարրեր: Դրանք պետք է պարունակվեն սննդամիջավայրում մանրէների համար հասանելի ձևով: Ծծմբի, ֆոսֆորի և այլ տարրերի նկատմամբ պահանջը սովորաբար բավարարվում է հանքային աղերով: Այդ պատճառով սննդամիջավայրերի հանքային ֆոնը իր կազմով գրեթե նույնն է տարբեր մանրէների աճեցման համար: Մանրէների մեծամասնության համար ծծմբի պահանջը բավարարվում է սուլֆատներով, չնայած որ ծծումբը բջջում գտնվում է վերականգնված՝ սուլֆիհիդրիլային խմբերի ձևով: Քիչ թվով մանրէների աճի համար անհրաժեշտ է ծծմբի վերականգնված ձևը: Այդ դեպքում սննդամիջավայր են ներմուծում սուլֆիդներ, հիմնականում Na_2S, կամ սուլֆիհիդրիլային խմբեր պարունակող օրգանական միացություններ, օրինակ՝ ցիստեին: Ֆոսֆորի նկատմամբ մանրէների պահանջը բավարարվում է ֆոսֆորական թթվի աղերով:

Մանրէներին անհրաժեշտ են բոլոր մետաղները (K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu և այլն), որոնք յուրացնում են անօրգանական աղերի կատիոնների կամ անիոնների ձևով: Օրինակ՝ մագնեզիումի աղբյուր ծառայում է $MgSO_4$-ը, նատրիումի և քլորի աղբյուր՝ NaCl-ը, կալցիումի՝ $CaCO_3$-ը կամ $CaCl_2$-ը: Երկաթը ավելացնում են սննդամիջավայրին քլորիդի, սուլֆատի կամ ցիտրատի ձևով:

Որոշ կատիոնների (երկաթ կամ կալցիում) ֆոսֆատների չլուծվող կոմպլեքսների հետևանքով նստվածքի առաջացումից խուսափելու համար խորհուրդ է տրվում սննդամիջավայրին ավելացնել 0.001-ից մինչև 1 գ/լ էթիլենդիամինտետրաքացախաթթու (ԷԴՏՔ) կամ 4 գ/լ նատրիումի հեքսամետաֆոսֆատ: Կատիոնների հետ այդ միացությունները առաջացնում են կոմպլեքսներ, որոնց դիսոցման արդյունքում սննդամիջավայր են անցնում ազատ կատիոնները:

Կալիումը, մագնեզիումը, կալցիումը և երկաթն անհրաժեշտ են համեմատաբար մեծ քանակություններով, այդ պատճառով դրանց աղերը, որպես կանոն, պետք է ավելացվեն սննդամիջավայրերին: Մանգանը, մոլիբդենը, ցինկը, պղինձը, կոբալտը անհրաժեշտ են

քիչ քանակություններով: Այս տարրերը կոչվում են միկրոտարրեր և պատրաստվում են թորած ջրում 1 մկգ/լ-ից մինչև 1 մգ/լ կոնցենտրացիայով և ավելացվում ստույգ կազմ ունեցող սննդամիջավայրերին: Միկրոտարրերի լուծույթները մանրէազերծվում են առանձին և ավելացվում սննդամիջավայրերին անմիջապես աշխատանքից առաջ: Մանրէների տարբեր խմբերի համար միկրոտարրերի պահանջը տարբեր է, այդ պատճառով առաջարկվում են տարբեր կազմ ունեցող միկրոտարրերի խառնուրդներ: Բնական բաղադրամասեր պարունակող, ինչպես նաև ծորակի ջրով պատրաստված սննդամիջավայրերն արդեն պարունակում են անհրաժեշտ միկրոտարրեր և լրացուցիչ ավելացնելու անհրաժեշտություն չկա:

Մանրէների աճի համար նախատեսված սննդամիջավայրերը ըստ կազմի լինում են բնական և սինթետիկ: Բնական սննդամիջավայրերը կազմված են կենդանական կամ բուսական ծագում ունեցող բաղադրամասերից՝ բանջարեղենային կամ մրգային հյութերից, կաթից, կենդանական հյուսվածքներից, նոսրացված արյունից, ծովերի, լճերի, հանքային աղբյուրների ջրերից, ինչպես նաև բնական սուբստրատներից՝ մսից, ձկից, խմորասնկերից, բույսերից, ճավարեղենից, գոմաղբից կամ հողից ստացված լուծամզվածքներից կամ եփուկներից: Բնական սննդամիջայրերին են դասվում նաև, այսպես կոչված, կիսասինթետիկ սննդամիջավայրերը, որոնք կազմված են բնական բաղադրամասերի և որոշակի քիմիական միացությունների համակցություններից: Բնական սննդամիջավայրերը հարուստ են օրգանական նյութերով, սակայն ունեն բարդ և ոչ հաստատուն կազմ: Այդ պատճառով մանրէների նյութափոխանակության ուսումնասիրության համար դրանց կիրառումը նպատակահարմար չէ: Սինթետիկ սննդամիջավայրերը բաղկացած են հստակ քանակի քիմիապես մաքուր միացություններից: Սինթետիկ սննդամիջավայրերը կիրառվում են մանրէների նյութափոխանակության առանձնահատկությունների ուսումնասիրության համար: Սինթետիկ սննդամիջավայրերի կազմը կախված է սննդանյութերի նկատմամբ աճեցվող մանրէների ունեցած պահանջներից: Կախված հետազոտության խնդրից սինթետիկ սննդամիջավայրերը պատրաստվում են ծորակային կամ թորած ջրով:

Ըստ նշանակության սննդամիջավայրերը լինում են էլեկտիվ և տարբերակիչ-ախտորոշիչ (ցուցանիշային կամ հայտանյութային): Էլեկտիվ սննդամիջավայրերն ապահովում են հիմնականում միայն մանրէների մեկ տեսակի կամ խմբի աճը: Էլեկտիվ սննդամիջա-

վայրերը կիրառվում են բնական աղբյուրներից մանրէների մեկուսացման առաջին փուլում, այսինքն՝ կուտակիչ կուլտուրաների ստացման համար, օրինակ՝ Էշբիի սննդամիջավայրը կիրառվում է *Azotobacter* ցեղի ներկայացուցիչների աճեցման համար:

Հայտանյութային սննդամիջավայրերը թույլ են տալիս արագ տարբերակել մեկ տեսակի մանրէներին մյուս տեսակներից կամ բացահայտել դրանց որոշ առանձահատկություններ: Հայտանյութային սննդամիջավայրերի օրինակ կարող է ծառայել աղիքային խմբի բակտերիաների հայտնաբերման համար օգտագործվող Էնդոյի ագարացված սննդամիջավայրը: *Escherichia* ցեղի բակտերիաները այս սննդամիջավայրի վրա առաջացնում են մորու գույնի մետաղական փայլով գաղութներ (տե՛ս նկար 87 Ա):

Մանրէների նույնականացման (իդենտիֆիկացման) համար հաճախ օգտագործում են pH-հայտանյութային սննդամիջավայրեր, որոնց բաղադրության մեջ մտնում է որևէ հայտանյութ, օրինակ՝ նեյտրալռոտը (0.0005%), ֆենոլռոտը (0.005%) կամ բրոմթիմոլկապույտ (0.005%): Մանրէների նյութափոխանակության արդյունքում առաջացած թթուն կամ հիմքը փոխում է հայտանյութի գույնը: pH-հայտանյութային սննդամիջավայրերը հաճախ կիրառվում են սանիտարական և բժշկական մանրէաբանությունում:

Ըստ ֆիզիկական վիճակի տարբերում են հեղուկ, կիսահեղուկ, և պինդ սննդամիջավայրեր: Պինդ և կիսահեղուկ սննդամիջավայրերը ստացվում են հեղուկ սննդամիջավայրերին պնդեցնող նյութեր՝ ագար-ագար, ժելատին, սիլիկաժել կամ կարագինան ավելացնելով (աղյուսակ 2):

Ագար-ագարը բազմաշաքար է, որի բաղադրության մեջ մտնում է ագարոզը և ագարոպեկտինը: Ագար-ագարը ստացվում է որոշ ծովային ջրիմուռներից և արտադրվում է թիթեղների կամ փոշու ձևով: Մանրէների մեծամասնությունը ունակ չէ յուրացնելու ագար-ագարը որպես ածխածնի կամ էներգիայի աղբյուր: Ջրում լուծվելիս առաջացնում է ժել, որը հալվում է մոտավորապես 100°C և պնդանում 45°C ջերմաստիճանում: Այդ պատճառով ագարացված սննդամիջավայրերի վրա կարելի է աճեցնել հայտնի կուլտիվացվող մանրէների մեծամասնությունը: Կիսահեղուկ սննդամիջավայրերը ստացվում են հեղուկ սննդամիջավայրերի 0.5%, իսկ պինդ սննդամիջավայրին՝ 1.5-3% ագար-ագար ավելացնելով: Անհրաժեշտ է հաշվի առնել, որ ագար-ագարը պահպանում է իր հատկությունները միայն չեզոք pH -ի պայմաններում: Ագար-ագարը միշտ պարունակում է այլ օրգա-

նական և անօրգանական հավելանյութեր, այդ պատճառով խիստ որոշակի կազմ ունեցող սննդամիջավայրերի պատրաստման համար ագար-ագարը նախապես մաքրում են տարալվացմամբ: Հավելանյութերի լուծամզումն իրականացնում են 2-3 շաբաթվա ընթացքում ագար-ագարը ծորակային ջրում 30-37°C ջերմաստիճանային պայմաններում տարալվացմամբ՝ պարբերաբար (յուրաքանչյուր երկրորդ օրը) փոխելով ջուրը: Տարալվացումը դադարեցնում են այն դեպքում, երբ ջուրը այլևս չի պղտորվում: Այնուհետև ագար-ագարը տեղավորում են թանզիվե պարկի մեջ և 2-3 օր լվանում ծորակի հոսող ջրով, ապա չորացնում և օգտագործում:

Աղյուսակ 2.

Սննդամիջավայրերի պնդեցման նպատակով օգտագործվող նյութերի բնութագիրը

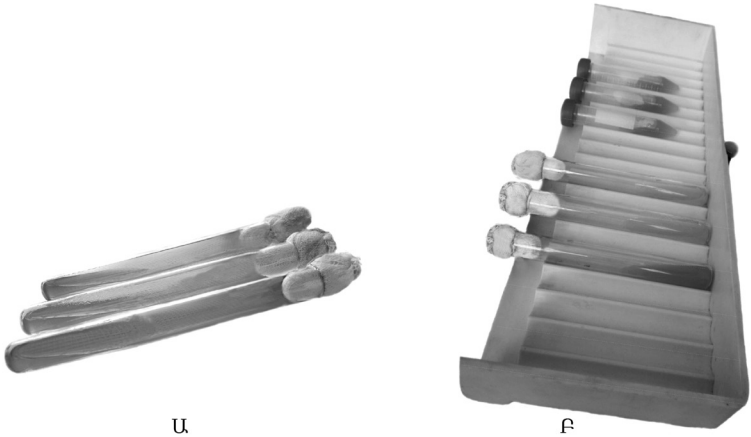
Բնութագիր	Ագար-ագար	Ժելատին	Սիլիկաժել
Ելանյութը	Ծովային ջրիմուռներ	Կաշի, ոսկոր, ջիլ	Սիլիկաթթվային կալիում կամ նատրիում և աղաթթու
Հիմնական բաղադրամասերը	Բազմաշաքարներ	Սպիտակուցներ	Սիլիկաթթու
Հալման ջերմաստիճան, °C	≈ 100	22-25	-
Պնդեցման ջերմաստիճան, °C	≈ 45	22-25	-
Պրոտեազների ազդեցությունը	Չեն ազդում	Ազդում են	Չեն ազդում
Կոնդենսացվող ջուր	Անջատվում է	Չի անջատվում	Չի անջատվում
Կիրառվող կոնցենտրացիան, %	1-3	10-20	-

Ագար-ագար պարունակող սննդամիջավայրերը տաքացնում են ջրային բաղնիքում կամ միկրոալիքային վառարանում մինչև ամբողջական հալվելը: Եթե նախատեսվում է մանրէները աճեցնել ագարային շեղակների մակերեսին, ապա սրվակների 1/3-ը լցնում են ագարային սննդամիջավայրով, մանրէազերծում, որից հետո սրվակները թեք վիճակում տեղավորում են շեղակների ստացման համար նախատեսվող հարմարանքի վրա և թողնում մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը (նկար 9): Ստացված շեղակը պետք է լինի

խցանից 4-6 սմ հեռավորության վրա:

Պետրիի թասերում մանրէների աճեցման համար նախատեսվող ագարային սննդամիջավայրը լցնում են 20-25 մլ-ական մեծ սրվակների կամ անոթների մեջ և մանրէազերծում, ապա մանրէազերծ պայմաններում լցնում Պետրիի թասերի մեջ: Ագարային սննդամիջավայրերի պնդեցման ընթացքում առաջանում է կոնդենսացված ջուր: Այդ պատճառով Պետրիի թասերում լցված սննդամիջավայրերը տեղավորում են ջերմապահարան շրջված վիճակով՝ կափարիչով ներքև: Հակառակ դեպքում կափարիչի վրա կուտակվում է կոնդենսացված ջուր, որը ծորալով ընկնում է ագարային մակերեսին՝ խոչընդոտելով առանձին գաղութների առաջացմանը:

Ժելատինը սպիտակուց է, որը ստացվում է կենդանիների ոսկորներից, ջլերից և կաշվից: Ժելատինը, լուծվելով ջրում, առաջացնում է ժել, որը հալվում է 24-26°C ջերմաստիճանում: Բազմաթիվ մանրէներ առաջացնում են պրոտեազներ, որոնք քայքայում են ժելատինը, հետևաբար այն հաճախ օգտագործվում է մանրէների պրոտեազային ակտիվության հայտնաբերման համար:



Նկար 9. Շեղակների պատրաստումը:
Ա) Շեղակներ, Բ) Սրվակներում շեղակների պատրաստման համար նախատեսված հարմարանք:

Սիլիկաթթվային ժելը կամ սիլիկաժելը կիրառում են հստակ բաղադրություն ունեցող արհեստական սննդամիջավայրերի պնդեցման համար: Սիլիկաժելի ստացման համար աղաթթվին (խտությունը՝ ρ=1.1) ավելացնում են նույն ծավալով հեղուկ ապակի՝ Na_2SiO_3

կամ K_2SiO_3 (խտությունը՝ ρ=1.1): Խառնուրդը լցնում են Պետրիի թասերի մեջ և թողնում մինչև ժելի առաջանալը: Այնուհետև թասերը տեղադրում են ապակյա տարայում և քլորիդների հեռացման համար ժելը լվանում են հոսող ջրով: Քլորիդների առկայությունը ստուգում են $AgNO_3$–ով որակական ռեակցիայով: Ժելի ստացման գործընթացն ավարտում են թորած ջրով սիլիկաժելի լվացմամբ:

Որպես պնդեցնող միջոց մանրէաբանական աշխատանքներում օգտագործվում է նաև կարագինան բազմաշաքարը, որը ստանում են կարմիր ջրիմուռներից: Կարագինանը նույնպես չի յուրացնում մանրէների մեծամասնությունը: 45 և 60°C ջերմաստիճաններում պինդ սննդամիջավայր ստանալու համար ավելացնում են 2 և 2.4% կարագինան, համապատասխանաբար:

Որոշ հետազոտություններում, օրինակ՝ խորքային ցանքի կատարելիս, անաերոբ մանրէների լավ տեսանելի մեկուսացված գաղութներ ստանալու համար կիրառվում են թափանցիկ սննդամիջավայրեր: Թափանցիկ սննդամիջավայրերը ստացվում են մի քանի եղանակներով: Առավել պարզ եղանակը բամբակով ֆիլտրումն է: Եթե այն բավարար չէ, սննդամիջավայրը պարզեցնում են հավկիթի սպիտակուցի օգնությամբ: 500 մլ սննդամիջավայրի պարզեցման համար բավական է մեկ հավկիթի սպիտակուցը: Սպիտակուցը տարանջատում են դեղնուցից և թափահարում նույն ծավալով ջրի հետ, մինչև փրփրագոյացումը: Փրփրացված սպիտակուցը լցնում են նախապես հալեցված սննդամիջավայրի մեջ: Սննդամիջավայրի ջերմաստիճանը պետք է լինի 45-50°C: Սպիտակուցն ավելացնելուց առաջ սննդամիջավայրի pH-ը պետք է հասցնել 7-7.3 արժեքի: Սննդամիջավայրը սպիտակուցի հետ լավ խառնելուց հետո այն 1 ժամ մշակում են ավտոկլավում 100°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Սպիտակուցը բնափոխվում է և մակակլանում սննդամիջավայրում եղած կախութային մասնիկները: Երբ բնափոխված սպիտակուցը բարձրանում է սննդամիջավայրի մակերեսին կամ իջնում անոթի հատակին, սննդամիջավայրը տաք վիճակում բամբակով ֆիլտրում են: Ֆիլտրելիս կիրառում են հատուկ տակդիրներով տաքացվող ձագարներ, որոնց շնորհիվ կասեցվում է սննդամիջավայրի պնդեցումը:

Արհեստական ագարացված սննդամիջավայրերը, որոնց պարզեցման համար ցանկալի չէ հավկիթի սպիտակուցի ավելացումը, ավտոկլավում մանրէազերծում են ջերմակայուն ապակյա բաժակներում և մանրէազերծումից հետո 10-12 ժամ թողնում փակ ավտոկ-

լավում: Դանդաղ սառեցման պայմաններում բոլոր կախութային մասնիկները նստում են բաժակի հատակին: Պնդացած սննդամիջավայրի վերին թափանցիկ հատվածը առանձնացվում է, տեղափոխվում նոր անոթի մեջ և նորից մանրէազերծվում:

Վերջերս լայն կիրառություն են ստացել հայտնի բաղադրությամբ չոր կամ փոշենման պատրաստի սննդամիջավայրերը, որոնց պատրաստման ընթացակարգը նշված է տարայի վրա: Այս սննդամիջավայրերի հաստատուն բաղադրությունը, հեշտ պահպանումը, տեղափոխումը և պատրաստումը դարձնում են դրանց առավել հարմար մանրէաբանական աշխատանքներում:

Մանրէների աճեցման պայմանները

Մանրէների աճեցման համար կարևոր նշանակություն ունի ոչ միայն սննդամիջավայրի կազմը, այլ նաև սննդամիջավայրի pH-ը, օդավորումը, ջերմաստիճանը, լույսը, խոնավությունը: Մանրէների զարգացումը հնարավոր է յուրաքանչյուր գործոնի միայն որոշակի սահմաններում, ընդ որում, մանրէների տարբեր խմբերի համար այդ սահմանները տարբեր են:

Սննդամիջավայրի pH-ը որոշիչ նշանակություն ունի մանրէների աճի համար: Մանրէների մեծամասնությունը լավ է աճում չեզոք pH-ի պայմաններում, չնայած միկրոմիցետները լավ աճ են դրսևորում pH-ի թույլ թթվային արժեքներում: Սննդամիջավայրեր պատրաստելիս անհրաժեշտ է ստուգել pH-ը: Սովորաբար սննդամիջավայրի pH-ը չափվում է պոտենցիաչափով: Լաբորատոր պայմաններում հարմար է pH-ը չափել հեղուկ հայտանյութերով կամ դրանցով ներծծված թղթե թիթեղիկներով՝ հայտաթղթերով (նկար 10): Լայնորեն կիրառվում է, օրինակ՝ հեղուկ երկգույնանի հայտանյութը՝ բրոմթիմոլկապույտ: Դրա գույնը փոփոխվում է դեղինից կապույտ, երբ pH-ը փոխվում է 6-ից 7.6 սահմաններում: pH 7.3-ում հայտանյութը ունի կապտականաչ երանգ:

Անհրաժեշտության դեպքում սննդամիջավայրի pH-ը կարգավորում են HCl կամ H_2SO_4 թթուների, NaOH կամ KOH հիմքերի, կամ հիմնային ռեակցիա ունեցող աղերի՝ Na_2CO_3 կամ $NaHCO_3$ լուծույթներով: pH-ը կարգավորելու համար ցանկալի է օգտագործել տարբեր կոնցենտրացիա ունեցող մանրէազերծված լուծույթներ:

Նկար 10. pH **հայտաթղթեր և** pH **պոտենցիաչափեր:**
1. pH հայտաթղթեր, 2. Դյուրակիր pH պոտենցիաչափ, 3. Դյուրակիր համակցված pH պոտենցիաչափ, 4. Ոչ շարժական (ստացիոնար) համակցված pH պոտենցիաչափ:

Սննդամիջավայրերի pH-ի արժեքը կարող է փոփոխվել մանրէազերծման ընթացքում: Այդ պատճառով մանրէազերծումից հետո նս պետք է ստուգել սննդամիջավայրի pH-ը և, եթե անհրաժեշտ է, կարգավորել մանրէազերծված թթվի կամ հիմքի լուծույթով: Սննդամիջավայրի pH-ը կարող է փոփոխվել մանրէների աճեցման ընթացքում: Այսպիսի փոփոխությունը կարող է տեղի ունենալ նյութափոխանակության արգասիքների առաջացման կամ սննդամիջավայրի առանձին բաղադրամասերի անհամաչափ յուրացման հետևանքով: Օրինակ՝ ածխաջրերի յուրացման դեպքում սննդամիջավայրում կուտակվում են օրգանական թթուներ, որոնք իջեցնում են սննդամիջավայրի pH-ը: KNO_3 պարունակող սննդամիջավայրերում pH-ը բարձրանում է նիտրատ իոնների ակտիվ յուրացման և սննդամիջավայրում կալիումի իոնների կուտակման պատճառով:

Սննդամիջավայրի pH-ը կայուն պահպանելու համար կիրառում են տարբեր մեթոդներ: Երբեմն սննդամիջավայրերին ավելացնում են բուֆերային լուծույթներ, օրինակ՝ ֆոսֆատային բուֆերներ: Երբ մանրէների աճը ընթանում է թթուների մեծ քանակության կուտակմամբ, բուֆերի թույլատրելի քանակությունը (մինչև 5 գ ֆոսֆատներ 1 լ սննդամիջավայրին) բավարար չէ, քանի որ ցանկացած բուֆերի հակազդումը pH-ի փոփոխությանը սահմանափակ է: Այդ պատճառով սննդամիջավայրի pH-ը կտրուկ փոփոխող մանրէների աճի համար նախատեսված սննդամիջավայրերում բուֆերային լուծույթների կիրառումը նպատակահարմար չէ: Այդպիսի մանրէների աճի համար սննդամիջավայրերին ավելացնում են կավիճ, որը չեզոքաց-

նում է առաջացած թթվային արգասիքները: Մանրէների աճեցման ընթացքում առաջացած թթուների չեզոքացման համար կարելի է սննդամիջավայրին ավելացնել մանրէազերծված $NaHCO_3$-ի 10% ջրային լուծույթ:

Աճեցման ընթացքում սննդամիջավայրի pH-ի պահպանումը մեծ նշանակություն ունի այն մանրէների համար (օրինակ՝ կաթնաթթվային բակտերիաները և պսևդոմոնադները), որոնք առաջացնում են մեծ քանակությամբ թթվային արգասիքներ, սակայն կայուն չեն դրանց նկատմամբ: Մեծ դժվարությունների հետ է կապված pH-ի պահպանումը թույլ հիմնային սննդամիջավայրում, քանի որ pH 7.2-8.5 սահմաններում համապատասխան բուֆերային լուծույթներ չկան: Այդ պատճառով անհրաժեշտություն է ստեղծվում անընդհատ կամ պարբերաբար շտկել սննդամիջավայրի pH-ը՝ ավելացնելով սննդամիջավայրին մանրէազերծված թթվի կամ հիմքի լուծույթներ:

Թթվածինը մտնում է ջրի և այլ միացությունների կազմի մեջ: Աերոբ մանրէների աճի համար անհրաժեշտ է սննդամիջավայրում ապահովել մոլեկուլային թթվածնի անընդհատ հոսքը: Այդպիսի մանրէները կոչվում են օբլիգատ աերոբներ: Էներգիաառաջացման գործընթացը այդ մանրէներում աերոբ շնչառությունն է, իսկ մոլեկուլային թթվածինն այդ գործընթացի վերջնական օքսիդիչն է: Օբլիգատ աերոբ մանրէներից պետք է տարանջատել միկրոաերոֆիլ մանրէներին, որոնք պահանջում են սննդամիջավայրում թթվածնի առկայություն, սակայն լավ են աճում, եթե թթվածնի պարցիալ ճնշումը ավելի ցածր է, քան օդում: Այլ մանրէների զարգացումը, ընդհակառակը, հնարավոր է միայն թթվածնի բացակայության պայմաններում: Էներգիայի ստացումն այդպիսի մանրէներում կախված չէ մոլեկուլային թթվածնի օգտագործման հետ, իսկ մեծամասնության համար թթվածինը նույնիսկ թունավոր է և ճնշում է մանրէների աճը կամ սպանում դրանց: Այդպիսի մանրէները կոչվում են օբլիգատ անաերոբներ: Ֆակուլտատիվ (պայմանական) անաերոբները ունակ են աճելու մոլեկուլային թթվածնի ինչպես առկայության, այնպես էլ բացակայության պայմաններում: Այսպես, որոշ շաքարասնկեր և աղիքային խմբի բակտերիաներ կախված սննդամիջավայրում մոլեկուլային թթվածնի առկայությունից ունակ են իրականացնելու կա՛մ աերոբ շնչառություն, կա՛մ խմորում (կամ անաերոբ շնչառություն): Որոշ անաերոբ մանրէներ կարող են աճել թթվածնի առկայության պայմաններում, այսինքն՝ զգայուն չեն թթվածնի նկատմամբ: Այդ մանրէներն անվանում են աերոտոլերանտ անաերոբներ: Ուս-

տի անհրաժեշտ է հաշվի առնել մանրէների զգայունությունն ազատ թթվածնի նկատմամբ դրանց աճեցման ընթացքում:

Աերոբ մանրէները կարելի է աճեցնել հեղուկ և պինդ սննդամիջավայրերի մակերեսին (կոչվում է մակերեսային աճեցում) կամ հեղուկ սննդամիջավայրում (կոչվում է խորքային աճեցում): Մակերեսային աճեցման դեպքում թթվածինն անցնում է մանրէների բջիջների մեջ անմիջապես օդից, այդ պատճառով անհրաժեշտ է մեծացնել սնընդամիջավայրի և օդի շփման մակերեսը: Այդ նպատակով սննդամիջավայրերը բարակ շերտով լցնում են Պետրիի թասերի մեջ:

Հեղուկ սննդամիջավայրերում աճեցվող աերոբ մանրէները հաճախ առաջացնում են մակերեսային թաղանթ: Ֆակուլտատիվ անաերոբները զարգանում են ոչ միայն սննդամիջավայրի մակերեսին, այլ նաև հեղուկ սննդամիջավայրի խորքում՝ առաջացնելով սննդամիջավայրի քիչ թե շատ հավասարաչափ պղտորություն: Մակերեսային աճեցումը կիրառվում է ինչպես լաբորատոր, այնպես էլ արտադրական պայմաններում:

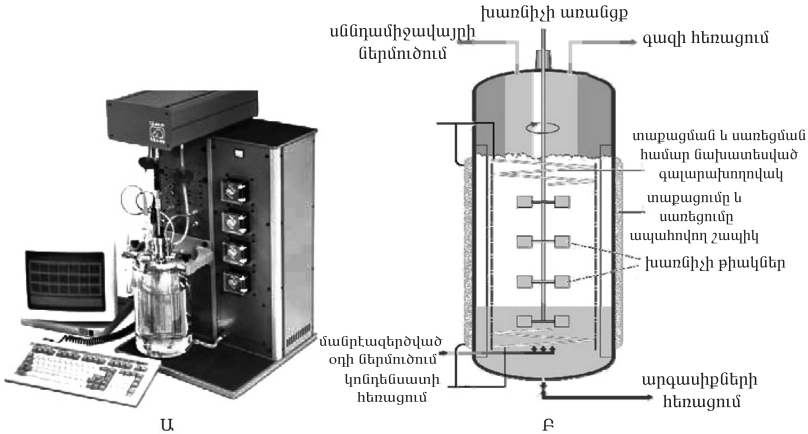
Աերոբ մանրէների խորքային աճեցման դեպքում անհրաժեշտ է մեծացնել սննդամիջավայրի և օդի թթվածնի շփման մակերեսը: Անհրաժեշտ է իմանալ նաև, որ խորքային աճեցման ընթացքում հեղուկ սննդամիջավայրերում մանրէներն օգտագործում են լուծված թթվածինը: Թթվածնի լուծելիությունը ջրում մեծ չէ, այդ պատճառով աերոբ մանրէների աճը սննդամիջավայրի խորքում ապահովելու համար անհրաժեշտ է այն անընդհատ օդավորել: Սննդամիջավայրի օդավորման դեպքում հաշվի են առնում երկու ցուցանիշ՝ օդավորման ուժգնությունն ու օդավորման աստիճանը: Օդավորման ուժգնությունը բնութագրվում է միավոր ժամանակում միավոր ծավալում թթվածնի լուծելիության արագությամբ: Օդավորման աստիճանը օդի այն ծավալն է, որը միավոր ժամանակում անցնում է որոշակի ծավալ ունեցող սննդամիջավայր: Լաբորատոր աշխատանքներում խորքային աճեցման առավել պարզ և լայն տարածված եղանակ է աճեցումը թափահարիչների վրա, որոնք ապահովում են անոթների և սրվակների թափահարումն ու պտտումը 100-200 պտույտ/րոպե արագությամբ: Ինչքան մեծ է թափահարման արագությունը, այնքան մեծ է սննդամիջավայրի շփումը օդի հետ և, հետևաբար, սննդամիջավայրի թթվածնով հագեցումը: Սննդամիջավայրի օդավորումը թափահարմամբ կարելի է մեծացնել՝ փոքրացնելով սննդամիջավայրի ծավալը կամ մանրէներն աճեցնելով 2-3 սմ երկարությամբ ապակյա պատի ներփքումներ ունեցող հատուկ անոթներում (տե՛ս նկար

4.3): Այդպիսի անոթների կիրառման դեպքում մեծանում է սննդամիջավայրի շփման մակերեսն օդի հետ, հետևաբար, ինչքան շատ են անոթի պատի ներփքումները, այնքան ավելի մեծ է օդավորման աստիճանը:

Բացի թափահարումից մանրէների կուլտուրաները կարելի է օդավորել մանրէազերծված օդի մղմամբ: Այս եղանակը հաճախ օգտագործում են լաբորատոր հետազոտություններում, սակայն ավելի լայնորեն կիրառվում է արտադրությունում մանրէների կենսազանգվածի կամ կենսագործունեության տարբեր արգասիքների՝ հակաբիոտիկների, ֆերմենտների, թթուների ստացման համար: Սննդամիջավայր մղվող օդի քանակությունը կարգավորվում է գազաչափերով: Ֆերմենտյորներում մղվող օդի քանակությունը կարգավորվում է ավտոմատ կերպով: Օդը մանրէազերծվում է ակտիվացված փայտածուխով, մանրէազերծիչ նյութերով ներծծված այսպես կոչված «ապակյա բամբակով», կամ պոլիմերներից պատրաստված հատուկ հյուսվածքներով: Հաճախ լաբորատոր փորձերում, երբ օդի ներմուծման ծավալն ու արագությունը շատ մեծ չէ, օգտագործվում են նախօրոք մանրէազերծված բամբակյա ֆիլտրեր: Օդամղման ուժգնությունը մեծացնելու համար օդը մղում են մանր ծակոտիներ ունեցող թիթեղներով՝ բարբոտյորներով: Մանրէների կուլտուրաների օդավորման համար որպես կանոն օգտագործում են մթնոլորտային օդը:

Լաբորատոր պայմաններում սննդամիջավայր մաքուր թթվածնի մղումը ցանկալի չէ, քանի որ սննդամիջավայրի չափազանց հագեցումը թթվածնով (մինչև 40 մգ/լ) կարող է ճնշել մանրէների աճը: Ֆերմենտյորներում օդավորումը սովորաբար զուգորդվում է սննդամիջավայրի մեխանիկական խառնմամբ: Խորքային աճեցման ֆերմենտյորի օրինակը բերված է նկար 11-ում:

Անաերոբ մանրէների աճեցումը ավելի բարդ է, քանի որ անաերոբ մանրէների թթվածնի հետ շփումը պետք է նվազեցվի կամ բացառվի: Դա իրականացնելու համար կիրառում են տարբեր մոտեցումներ:



Նկար 11. Աերոբ մանրէների խորքային աճեցման համար նախատեսված լաբորատոր ֆերմենտյոր (Ա) և դրա գծապատկեր (Բ):

Մանրէների աճեցումը սննդամիջավայրի խորը շերտերում օդի սահմանափակման առավել պարզ եղանակ է: Դրա համար հեղուկ սննդամիջավայրը լցվում է մեծ ծավալով աճեցնելու համար նախատեսված հատուկ անոթների մեջ: Քանի որ չի կարելի մանրէազերծել անոթի ծավալի կեսից ավելին լցված սննդամիջավայրը, դրա մի մասը մանրէազերծվում է առանձին և ցանքից հետո մանրէազերծ պայմաններում անոթի մեջ ավելացվում է սննդամիջավայրի մյուս մասնաբաժինը: Անմիջապես ցանքից առաջ սննդամիջավայրը եռացվում կամ 30-40 րոպե տաքացվում է եռացող ջրային բաղնիքում, ապա, որպեսզի օդի թթվածինը չհասցնի լուծվել սննդամիջավայրում, արագ սառեցվում է: Այնուհետև ցանքանյութը ներմուծվում է սննդամիջավայր անոթի հատակամերձ մասում:

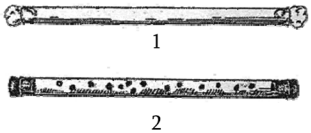
Երբեմն կիրառվում է աճեցում մածուցիկ սննդամիջավայրերում: Թթվածնի դիֆուզիան հեղուկի մածուցիկությանը զուգընթաց պակասում է: Այդ պատճառով մածուցիկ սննդամիջավայրերում, օրինակ՝ կարտոֆիլային կամ եգիպտացորենի ալյուր պարունակող սննդամիջավայրերում, լավ են աճում որոշ օբլիգատ անաերոբներ, օրինակ՝ կարագաթթվային խմորման հարուցիչները: Սննդամիջավայրի մածուցիկությունը կարելի է բարձրացնել ավելացնելով 0.2-0.3% ագար-ագար:

Աերոտոլերանտ անաերոբ մանրէների աճեցման համար օգտագործվում են վակուումային էքսիկատորներ (նկար 12): Այդ նպատակով վակուումային պոմպի միջոցով էքսիկատորից հեռացվում է օդը:

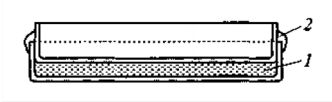
Այնուհետև, էքսիկատորը լցնում են իներտ գազով, օրինակ՝ ազոտով կամ ջրածնով կամ էլ դրանց խառնուրդով՝ հավելելով 5-10% ածխաթթու գազով:

Նկար 12. Վակուումային պոմպին միացված էքսիկատոր:

Մաքուր կուլտուրաների մեկուսացման համար առանձին-առանձին գաղութներ ստանալիս կամ անաերոբ մանրէների թվաքանակը որոշելիս մանրէներն աճեցվում են պինդ սննդամիջավայրի խորքում: Դրա համար ցանքանյութը ներմուծվում է 48-50°C ջերմաստիճան ունեցող ագարացված (ցանկալի է թափանցելի) սննդամիջավայրի մեջ, ապա լավ խառնվում է, թողնելով անոթի մեջ, կամ տեղափոխվում է մանրէազերծված Բուրիի խողովակների կամ Պետրիի թասերի մեջ: Անոթների մակերեսը ծածկվում է պարաֆինով: Բուրիի խողովակները՝ 20-25 սմ երկարությամբ և 1-1.5 սմ տրամագծով սնամեջ ապակյա խողովակներ են (նկար 13): Խողովակները մանրէազերծում են նախապես երկու ծայրերն էլ փակելով բամբակյա խցաններով: Ցանքից առաջ ծայրերից մեկի բամբակյա խցանը փոխարինում են մանրէազերծված ռետինե խցանով, իսկ մյուս ծայրով լցնում ցանքանյութով ինոկուլացված սննդամիջավայր և փակում ռետինե խցանով: Պետրիի թասերում անաերոբ մանրէներ աճեցնելիս ցանքանյութով ինոկուլացված սննդամիջավայրը լցնում են թասի կափարիչի մեջ, և սննդամիջավայրը պնդանալուց անմիջապես հետո կիպ փակում թասի հատակով: Պետրիի թասի կափարիչի և հատակի միջև եղած տարածությունը, որով սննդամիջավայրը շփվում է օդի հետ, լցվում է մանրէազերծված պարաֆինով (նկար 14):



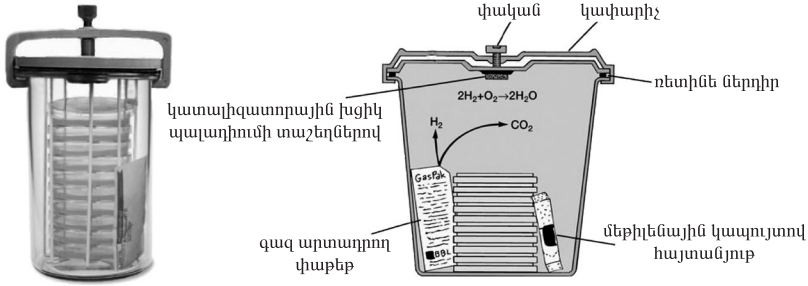
Նկար 13. Բուրիի խողովակ:
1. Մանրէազերծման պատրաստված Բուրիի խողովակ, 2. Անաերոբ մանրէների զաղութները Բուրիի խողովակում լցված ազարացված սննդամիջավայրի խորքում:



Նկար 14. Անաերոբների աճեցումը Պետրիի թասերում:
1. Ազարացված սննդամիջավայր, 2. Պարաֆին:

Մանրէների անաերոբ աճեցման համար հաճախ կիրառվում է գազային փաթեթ պարունակող անաերոբ տարա (նկար 15):

Գազային փաթեթում քիմիական ռեակցիայի արդյունքում առաջանում է ջրածին, որը փոխգործելով տարայում առկա թթվածնի հետ առաջացնում է ջուր: Սենյակային ջերմաստիճանում այդ ռեակցիան կատալիզում է պալադիումը: Փաթեթում ջրածնի առաջացումը խթանվում է ջրի ավելացմամբ: Հարկ է նշել, որ ռեակցիայի արդյունքում անջատվում է նաև CO_2, որն անհրաժեշտ է բազմաթիվ անաերոբ մանրէների աճի համար: Մեթիլեն կապույտ հայտանյութի գունազրկումը վկայում է տարայում թթվածնի բացակայության մասին: Եթե հայտանյութը չի գունազրկվում 2 ժամվա ընթացքում, նշանակում է, որ տարան ամուր փակված չէ կամ քիմիական ռեակցիան չի ընթացել:



Նկար 15. Գազային փաթեթ և մանրէների կուլտուրաներով Պետրիի թասեր պարունակող անաերոբային տարա (ձախից) և գծապատկերը (աջից):

Անաերոբ մանրէները կարելի է աճեցնել անաերոստատների՝ մանոմետրերով վակուումային մետաղական կաթսաների մեջ (նկար 16): Անաերոստատից հեռացնում են օդը, և որպես կանոն, լցնում

$67 \cdot 10^3$ Պա ճնշմամբ (0.7 ամմ) գազային խառնուրդով, որը կազմված է 90-80% ազոտից և 10-20% ածխաթթու գազից: Ավելցուկային ճընշումը բացառում է օդի թթվածնի դիֆուզիայի հնարավորությունը:

Որոշ օբլիգատ անաերոբներ, օրինակ՝ մեթան առաջացնող արքեաները, թթվածնի հետ նույնիսկ կարճատև շփումից ոչնչանում են: Այդպիսի մանրէների աճեցման ընթացքում պետք է ամբողջովին բացառել թթվածնի մուտքը սննդամիջավայր, ստեղծել և պահպանել օքսիդավերականգնողական (Eh) ցածր պոտենցիալ: Թթվածնի կլանման և սննդամիջավայրի վերականգնվածության աստիճանը բնորոշվում է Eh-ով, որը չափվում է պոտենցիաչափով կամ որոշվում հայտանյութերի, օրինակ՝ ռեզազուրինի, ֆենոսաֆրանինի, նեյտրալռոտի և այլնի կիրառմամբ: Հատկապես հարմար է օգտագործել ռեզազուրինը, որն ավելացնում են սննդամիջավայրին 1 մգ/լ խտությամբ և մանրէազերծում սննդամիջավայրի հանքային տարրերի հետ: Օքսիդանալիս այն ներկվում է երկնագույն, վերականգնվելիս անգունանում է:

Նկար 16. Անաերոբ մանրէների աճեցման համար նախատեսված անաերոստատ (ձախից) և անաերոբ խցիկ (աջից):

Օբլիգատ անաերոբ մանրէների աճեցման մեթոդը մշակել է ամերիկացի գիտնական Ռ. Հանգեյթը: Այդ մեթոդը կիրառելիս անհրաժեշտ է հաշվի առնել հետևյալ պայմանները.

- բոլոր աշխատանքները՝ սննդամիջավայրերի պատրաստումն ու բաշխումը տարաներում, մանրէների ցանքն ու աճեցումը, կատարվում է թթվածնի բացակայության պայմաններում անաերոբ խցիկում (նկար 16), եռացման, մանրէազերծված գազի հոսքի, հերմետիկ փակվող անոթների կիրառմամբ,

- թթվածնի հետքային քանակությունների կլանման համար մինչև մանրէների ցանքը սննդամիջավայրին ավելացնում են վերականգնիչներ (ցիստեինի, նատրիումի սուլֆիդի, թիոգլիկոլատի հիմնային լուծույթներ),
- բոլոր փոխացանքերը և սննդամիջավայրերի հավելումները պետք է իրականացվեն թթվածին չպարունակող գազով նախապես մշակված ներարկիչներով,
- գազանցկացման համար նախատեսված բոլոր խողովակները պետք է պատրաստված լինեն օդի թթվածնի դիֆուզիան արգելակող նյութերից, օրինակ՝ պղնձից կամ բութիլացված ռետինից:

Որպես թթվածնի կլանիչներ լաբորատոր պայմաններում օգտագործում են պիրոգալոլի կամ նատրիումի երկթիոնիտի հիմնային լուծույթները, մետաղական երկաթը, մինչև 400°C տաքացված պղինձը և որոշ այլ ռեակտիվներ: Անհրաժեշտ է հաշվի առնել ռեակտիվների կլանունակությունը և մանէների աճեցման համար փակ անոթի ծավալը: Օրինակ՝ յուրաքանչյուր 100 մլ ծավալ ունեցող անոթի համար օգտագործում են 1 գ պիրոգալոլ և 10 մլ 2.5 Ն NaOH: Այն անաերոբ մանրէների, որոնց աճի համար անհրաժեշտ է ածխաթթու գազ, պետք է պիրոգալոլը լուծել ոչ թե հիմքի, այլ նատրիումի երկկարբոնատի խիտ լուծույթում: Թթվածնի կլանման աստիճանը որոշվում է օքսիդավերականգնողական հայտանյութ պարունակող լուծույթի միջոցով: Լուծույթի պատրաստման համար խառնվում են հավասար ծավալներով 0.025% NaOH, 0.015% մեթիլեն կապույտի ջրային լուծույթ և 6% գլյուկոզ, իսկ որպես մանրէազերծիչ նյութ լուծույթին ավելացվում է թիմոլ: Օգտագործելուց անմիջապես առաջ անոթի մեջ լցվում է 5 մլ խառնուրդն և տաքացվում եռացող ջրային բաղնիքի վրա մինչև անգունանալը, ապա արագ սառեցվում և տեղադրվում է անաերոստատում կամ անաերոբ խցիկում:

Մինչև 1.5% օդ պարունակող արտադրական գազերից թթվածնի մնացորդները հեռացվում են հետևյալ կերպ: Նախ գազն անցկացվում է պղնձե խառտուքներով լցված ապակյա խողովակով և էլեկտրական տաքացուցիչի օգնությամբ տաքացվում է մինչև 400°C: Այս եղանակով մշակված գազը չի պարունակում թթվածին, քանի որ բարձր ջերմաստիճաններում պղինձն արդյունավետ փոխազդում է թթվածնի հետ՝ առաջացնելով CuO: Պղնձի վերականգնման համար օգտագործվում է գազային ջրածինը՝ $CuO+H_2=Cu+H_2O$: Այդպիսի թթվածնազերծ գազը անհրաժեշտ է անաերոբ խցիկների բաշխիչ

փականը լցնելու համար:

Որպես վերականգնիչ հաճախ օգտագործվում է նատրիումի սուլֆիդ և թիոգլիկոլատ: Վերականգնիչները օգտագործվում են մանրէների աճի վրա չազդող կոնցենտրացիաներով: Սովորաբար պատրաստվում է վերականգնիչների 1% լուծույթը 5% նատրիումի երկկարբոնատային լուծույթում, ապա մանրէազերծվում ավտոկլավում: Սննդամիջավայրին ավելացվում է նատրիումի սուլֆիդ (250-500 մգ/լ) կամ թիոգլիկոլատ (մինչև 250 մգ/լ):

Տարբեր մանրէների աճի ջերմաստիճանային միջակայքը տատանվում է լայն սահմաններում: Մեզոֆիլների, որոնց դասվում է հայտնի մանրէների մեծամասնությունը, աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը ընկած է 25-ից մինչև 37°C սահմաններում: Թերմոֆիլների աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը զգալի բարձր է՝ 45-ից մինչև 80-90°C: Պսիխրոֆիլները լավ են զարգանում 5-10°C ջերմաստիճանային միջակայքում: Ջերմաստիճանային տատանումները բացասաբար են ազդում մանրէների աճի վրա, այդ պատճառով մանրէներն աճեցվում են ջերմապահարաններում կամ հատուկ ջեռուցվող սենյակներում, որոնցում ջերմակարգավորիչների օգնությամբ պահպանվում է անհրաժեշտ ջերմաստիճանը: Մեզոֆիլ մանրէները, որոնց բնական կենսամիջավայրերը ջուրն ու հողն են, աճեցվում են 20-30°C ջերմաստիճանային միջակայքում, մինչդեռ մարդու և կենդանիների մաշկի, լորձաթաղանթների վրա կամ աղիներում բնակվող մանրէներն աճեցվում են ավելի բարձր՝ 35-37°C ջերմաստիճաններում: Պսիխրոֆիլների աճեցման համար օգտագործվում են սառցախցիկներ:

Մանրէների ճնշող մեծամասնության աճի համար լուսավորումն անհրաժեշտ չէ: Ավելին՝ լույսի ուղիղ ճառագայթները բացասական են ազդում մանրէների զարգացման վրա: Այդ պատճառով դրանք աճեցվում են մթության մեջ: Լույսն անհրաժեշտ է ֆոտոտրոֆ մանրէների աճի համար: Սակայն բնական լուսավորումն օգտագործվում է շատ հազվադեպ, քանի որ այն կանոնավոր չէ և վատ է կարգավորվում: Սովորաբար ֆոտոտրոֆ մանրէներն աճեցվում են լյումինոստատներում՝ շիկացման լամպերով կամ ցերեկային լույսի լուսածորող (ֆլուորեսցենտային) լամպերով լուսավորված խցիկներում: Լյումինոստատներում անհրաժեշտ ջերմաստիճանն ապահովվում է օդորակիչների կամ սառեցնող հարմարանքների կիրառմամբ: Լուսավորման աղբյուրի ընտրությունը որոշվում է վերջինիս լուսարձակման սպեկտրով և ալիքների երկարությամբ: Ծիրանագույն և կանաչ

բակտերիաների աճեցման համար ավելի նպատակահարմար է օգտագործել շիկացման լամպերը: Ցիանաբակտերիաների և միկրոջրիմուռների աճեցման համար կիրառվում են ցերեկային լույսի լամպեր: Բացի լույսի սպեկտրի կազմից, կարևոր է նաև լուսավորվածությունը, որը որոշվում է լյուքսաչափի կիրառմամբ:

Մանրէների աճի համար պարտադիր է սննդամիջավայրում ջրի առկայությունը, ընդ որում, ջուրը պետք է լինի բջջի համար հասանելի ձևով, այսինքն՝ հեղուկ փուլում: Սակայն բնական սուբստրատներում ջրի մի մասը կապված է ջրում լուծված նյութերի մոլեկուլների հետ և մատչելի չէ մանրէների համար: Սուբստրատում մանրէների աճի համար ջրի հասանելիությունն արտահայտվում է ջրի ակտիվությամբ՝ a_w: Ջրի ակտիվությունը որոշվում է հետևյալ բանաձևով:

$$a_w = \frac{P}{P_0},$$

որտեղ P-ն լուծույթի վրա գոլորշու ճնշումն է, P_0-ն՝ տվյալ ջերմաստիճանում մաքուր ջրի վրա գոլորշու ճնշումն է:

Թորած ջրի համար $a_w = 1$: Ջրի մեջ տարբեր նյութեր լուծելիս այս մեծությունը փոքրանում է, հետևաբար նվազում է ջրի հասանելիությունը բջջի համար: Մանրէները կարող են աճել այնպիսի սնընդամիջավայրերում, որոնց $a_w = 0.99\text{-}0.61$: Պրոկարիոտների համար հասանելի ջրի պահանջը, որպես կանոն, ավելի բարձր է: Այսպես, պրոկարիոտների մեծամասնությունը, բացառությամբ հալոֆիլների, լավ են աճում միայն այն սննդամիջավայրերում, որոնցում a_w-ն 0.99-0.95 է: Սննդամիջավայրերում ջրի տարբեր ակտիվությունները ստեղծվում են NaCl-ի, KCl-ի, գլյուկոզի, գլիցերինի, պոլիէթիլենգլիկոլի ավելացմամբ:

Մանրէների աճեցման օրինաչափությունները: Աճի կոր

Աճ ասելով պետք է հասկանալ կենդանի նյութի քանակի անհետադարձ մեծացումը, որը հաճախ զուգորդվում է բջիջների մեծացման և բաժանման հետ: Բակտերիաները հաճախ բազմանում են կրկնակի կիսմամբ, այդ իսկ պատճառով դրանց թիվն աճում է երկրաչափական պրոգրեսիայով. $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \ldots \rightarrow 2^n$: Եթե սահմանափակ տարածությունում աճող կուլտուրայի (այսպես կոչված

պարբերական կուլտուրայի) միավոր ծավալին համապատասխանում են N_0 բջիջներ, ապա n բաժանումներից հետո բջիջների թիվը կլինի $N_0 \cdot 2^n$: Լոգարիթմելով ստանում ենք $\lg N = \lg N_0 + n\lg 2$, որտեղ բջջային բաժանումների թիվը կլինի՝

$$n = \frac{\lg N - \lg No}{\lg 2}:$$

Բջջային բաժանումների թիվը 1 ժամում կամ բաժանման արագության հաստատունը՝ v-ն, որոշվում է հետևյալ բանաձևով.

$$v = \frac{n}{t} = \frac{\lg N - \lg No}{\lg 2(t - to)},$$

որտեղ t_0-ն բաժանման սկզբնական ժամանակն է, իսկ t-ն՝ վերջնական ժամանակը:

Բաժանման մեկ ցիկլի համար անհրաժեշտ ժամանակը՝

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v}:$$

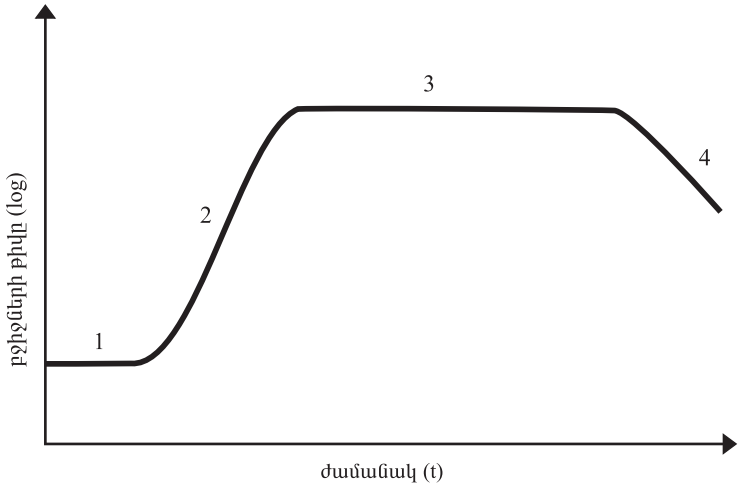
Եթե 10 ժամում բջիջների թիվը կախույթում աճում է 10^3-ից մինչև 10^6, ապա բաժանման արագության հաստատունը կորոշվի հետևյալ բանաձևով՝

$$\mathrm{v} = \frac{\lg 10^9 - \lg 10^3}{0.3010 \times 10} \times 10 \approx \frac{6}{3} = 2,$$

իսկ բջիջների կիսումների միջև ընկած ժամանակը հավասար կլինի կես ժամի:

Սննդամիջավայր ներմուծելիս բակտերիաները սովորաբար աճում են այնքան ժամանակ, մինչև անհրաժեշտ սննդամիջավայրի բաղադրիչներից որևէ մեկի պարունակությունը հասնում է նվազագույնի, որից հետո աճը դադարում է: Եթե այդ ընթացքում չավելացնենք անհրաժեշտ սննդանյութեր և չհեռացնենք նյութափոխանակության վերջնական արգասիքները, ապա կստանանք այսպես կոչված պարբերական կուլտուրա (այլ կերպ՝ սահմանափակ տարածությունում բջիջների պոպուլյացիա): Աճն այդպիսի «փակ համակարգում» ենթարկվում է օրինաչափությունների, որոնք իրական են ոչ միայն միաբջիջ, այլև բազմաբջիջ օրգանիզմների համար: Պարբերական կուլտուրան ըստ էության նման է գենետիկորեն սահ-

մանափակ աճով բազմաբջիջ օրգանիզմի: Կորը, որը նկարագրում է կենդանի բջիջների թվի լոգարիթմի կախվածությունը ժամանակից կոչվում է աճի կոր (նկար 17): Բնորոշ աճի կորը S-աձև է, որում տարբերում են մի քանի փուլեր՝ սկզբնական (կամ lag) փուլ, էքսպոնենցիալ (կամ լոգարիթմական) փուլ, ստացիոնար (կամ կայուն) փուլ և մահացության փուլ:



Նկար 17. Մանրէային պարբերական կուլտուրայի աճի կոր:
1. Սկզբնական (lag) փուլ, 2. Էքսպոնենցիալ կամ լոգարիթմական փուլ, 3. Ստացիոնար կամ կայուն փուլ, 4. Մահացության փուլ:

Սկզբնական փուլ: Այս փուլն ընդգրկում է բակտերիաների սնընդամիջավայր ներմուծման և բջիջների բաժանման առավելագույն արագության հասնելու միջև ընկած ժամանակահատվածը: Այս փուլի տևողությունը կախված է նախնական կուլտուրայի աճեցման պայմաններից, ներմուծվող կուլտուրայի տարիքից և սննդամիջավայրի ճիշտ ընտրությունից: Եթե ներմուծվող կուլտուրան թարմ չէ, ապա բջիջները նախ պետք է հարմարվեն նոր պայմաններին ՌՆԹ-ի սինթեզի, ռիբոսոմների ձևավորման և ֆերմենտների սինթեզի ճանապարհով, հատկապես, եթե էներգիայի և ածխածնի աղբյուրները նոր սննդամիջավայրում տարբերվում են նախորդից:

Էքսպոնենցիալ փուլ: Աճի էքսպոնենցիալ (լոգարիթմական) փուլը բնութագրվում է բջիջների բաժանման հաստատուն առավելագույն արագությամբ: Այդ արագությունը կախված է բակտերիաների տեսակից, ինչպես նաև սննդամիջավայրից: Օրինակ՝ *E. coli*-ն 37°C

ջերմաստիճանային պայմաններում կիսվում է մոտավորապես յուրաքանչյուր 20 րոպեն մեկ: Այլ բակտերիաների կիսումների միջև ընկած ժամանակը զգալիորեն ավելի մեծ է, օրինակ՝ շատ հողային տեսակների կիսումների միջև ընկած ժամանակը 60-150 րոպե է, իսկ *Nitrosomonas* և *Nitrobacter* ցեղերի ներկայացուցիչներինը՝ նույնիսկ 5-10 ժ:

Բազմաթիվ բակտերիաների բջիջների մեծությունը և դրանցում սպիտակուցի պարունակությունն աճի էքսպոնենցիալ փուլում ևս մնում են հաստատուն: Այլ կերպ ասած բակտերիական կուլտուրան այս դեպքում բաղկացած է «ստանդարտ բջիջներից»: Եթե հստակ որոշված է, որ բջիջների թիվը, դրանցում սպիտակուցի պարունակությունը և դրանց չոր կենսազանգվածը մեծանում են միևնույն արագությամբ, ապա կուլտուրայի աճին կարելի է հետևել՝ օգտվելով այս ցուցանիշների որևէ մեկից:

Մինչդեռ հաճախ նաև աճի էքսպոնենցիալ փուլում պարբերական կուլտուրայի բջիջները ենթարկվում են փոփոխությունների, քանզի աստիճանաբար փոփոխվում է սննդամիջավայրը. նվազում է սուբստրատի խտությունը, մեծանում է բջջային կախույթի խտությունը, կուտակվում են նյութափոխանակության արգասիքները: Էքսպոնենցիալ փուլում բջիջների բաժանման արագությունը համեմատաբար ավելի հաստատուն է, ուստի այս փուլն առավել հարմար է բաժանման (և աճի) արագության որոշման համար: Աճի էքսպոնենցիալ փուլում բջիջների թվի ավելացմանը կամ բջջային կախույթի պղտորությանը կարելի է հետևել՝ ուսումնասիրելով սննդամիջավայրի գործոնների (pH-ի, օքսիդավերականգնողական պոտենցիալի, ջերմաստիճանի, օդափոխման և այլն) ազդեցությունը, ինչպես նաև տարբեր սուբստրատների պիտանելիությունը:

Ստացիոնար փուլ: Ստացիոնար փուլն սկսվում է, երբ բջիջների թիվը դադարում է աճել: Աճի արագությունը կախված է սուբստրատի խտությունից: Երբ սուբստրատի խտությունը սկսում է նվազել, բջիջների աճի արագությունը փոքրանում է: Այդ պատճառով էքսպոնենցիալ փուլից դեպի ստացիոնար փուլ անցումը աստիճանաբար է տեղի ունենում: Աճի արագությունը կարող է նվազել ոչ միայն սուբստրատի անբավարարության, այլև բակտերիական պոպուլյացիայի մեծ խտության, սննդամիջավայրում O_2-ի ցածր ճնշման կամ նյութափոխանակության թունավոր արգասիքների կուտակման պատճառով: Ստացիոնար փուլում դեռևս կարող են յուրացվել պաշարային նյութերը և սինթեզվել ֆերմենտներ: Դա կախված է աճը

սահմանափակող գործոնից: Արագ մահանում են միայն շատ զգայուն բջիջները, մյուսները դեռ երկար պահպանում են կենսունակությունը այնքան ժամանակ, քանի դեռ առկա է պաշարանյութի կամ բջջային սպիտակուցների օքսիդացման գործընթացում կենսագործունեության համար անհրաժեշտ էներգիան ստանալու հնարավորությունը:

Ստացիոնար փուլ հասած կենսազանգվածի քանակությունն անվանում են ելք կամ բերք: Այն կախված է օգտագործվող սննդանյութերի բնույթից և քանակությունից, ինչպես նաև աճեցման պայմաններից:

Մահացության փուլ: Մահացության փուլը և բջիջների մահացության պատճառները սննդամիջավայրերում անբավարար են ուսումնասիրված: Դրա պատճառը, օրինակ՝ կաթնաթթվային բակտերիաների աճեցման ընթացքում սննդամիջավայրում կուտակվող թթու արգասիքներն են: Կենդանի բջիջների թիվն այս փուլում շատ արագ նվազում է: Երբեմն բջիջները լիզիսի են ենթարկվում սեփական ֆերմենտներով (ավտոլիզ):

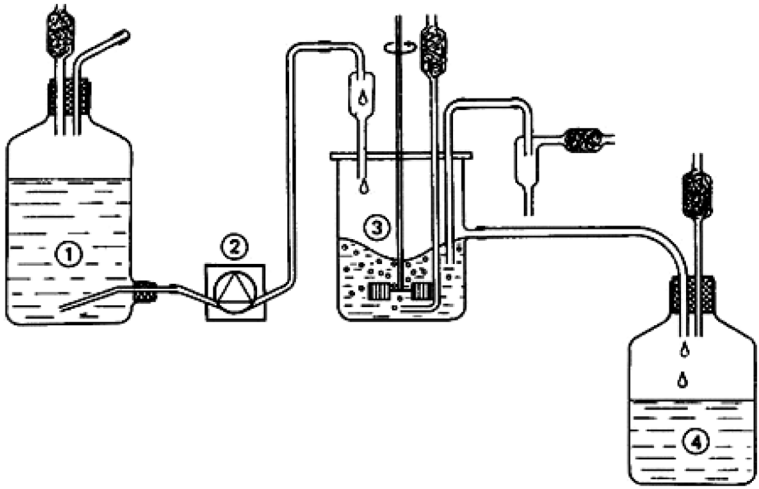
Մանրէների աճեցման եղանակները

Գոյություն ունեն հեղուկ սննդամիջավայրում մանրէների աճեցման սկզբունքորեն տարբերվող երկու եղանակ: Մի դեպքում սննդամիջավայրը ինոկուլացնելուց հետո դրան չեն ավելացնում և դրանից չեն հեռացնում որևէ բաղադրամաս, բացի գազային փուլից: Աճեցման այդպիսի եղանակը կոչվում է պարբերական, և ենթադրում է սահմանափակ ժամանակահատվածում մանրէների խտության անընդհատ աճ, որն ուղեկցվում է սննդամիջավայրի կազմի և պայմանների փոփոխությամբ: Եթե մենք այդ համակարգ անընդհատ ներմուծենք թարմ սննդամիջավայր և միաժամանակ հեռացնենք նյութափոխանակության արգասիքները և բակտերիաների աճած զանգվածը, ապա կունենանք այսպես կոչված անընդհատ աճող կուլտուրա:

Անընդհատ (հոսքային) աճեցումն, ի տարբերություն պարբերական աճեցման, բնութագրվում է թարմ սննդամիջավայրի անընդհատ ներմուծմամբ այն արագությամբ, ինչ արագությամբ հեռացվում է սինթեզված կենսազանգվածը: Այս դեպքում կախույթի ծավալը ֆերմենտյորում ժամանակի ընթացքում չի փոխվում: Անընդհատ աճեց-

ման եղանակի հիմնական պայմաններից է ֆերմենտյորում կախույթի լավ խառնումը: Անընդհատ աճեցման եղանակը կարող է իրականացվել տուրբիդաստատի և քեմոստատի սկզբունքով:

Քեմոստատն իրենից ներկայացնում է ֆերմենտյոր, որում անընդհատ ներմուծվում է թարմ սննդամիջավայր: Ֆերմենտյորում խառնիչով նոր ներմուծված սննդամիջավայրն ու օդը խառնվում են՝ ստեղծելով մանրէների աճի համար սննդանյութերի և օդի անհրաժեշտ խտություններ: Նոր սննդամիջավայրի ներմուծմանը զուգընթաց, ֆերմենտյորից հեռացվում է նույնքան ծավալով մանրէային կենսազանգված (նկար 18):



Նկար 18. Քեմոստատի գծապատկերը:

1. Սննդամիջավայրով լցված անոթ, 2. Մղող պոմպ, 3. Քեմոստատ խառնիչով, ֆիլտրված օդի, սննդամիջավայրի ներմուծման և արտամղման խողովակներով, 4. Արգասիքների ընդունիչ անոթ:

Տուրբիդաստատն ավելի պարզ անընդհատ աճեցման եղանակ է, որի դեպքում բջիջների կոնցենտրացիան ընտրում է հետազոտողը, իսկ թարմ սննդանյութերի ներմուծումը սննդամիջավայր կարգավորվում է ավտոմատ՝ ըստ մանրէների պոպուլյացիայի խտության: Սննդամիջավայրի ավելացման արագությունը փոփոխելով՝ փորձարարը կարող է ստանալ պոպուլյացիայի աճի արագության տարբեր ցուցանիշներ՝ վերարտադրելով կուլտուրայի աճի տարբեր փուլերը (աճի էքսպոնենցիալ փուլից մինչև ստացիոնար փուլ):

Ի տարբերություն քեմոստատի, տուրբիդոստատում բոլոր սնընդանյութերը գտնվում են ավելցուկով և կուլտուրայի աճի արագությունը հասնում է իր առավելագույն արժեքին: Աշխատանքը տուրբիդոստատի հետ տեխնիկապես ավելի բարդ է, քան քեմոստատի հետ:

Այսպիսով, պարբերական կուլտուրայի և անընդհատ կուլտուրայի միջև կան սկզբունքային տարբերություններ: Պարբերական կուլտուրան փակ համակարգ է և բազմափուլ, պայմաններն աճման փուլերում տարբեր են, ավտոմատ կարգավորումը բացակայում է: Անընդհատ կուլտուրան իրենից ներկայացնում է բաց համակարգ, որը ձգտում է դինամիկ հավասարակշռության հաստատման: Դրանում ժամանակի գործոնը բացակայում է, այն միափուլ է, սննդամիջավայրի պայմաններն անփոփոխ են և ենթարկվում են ավտոմատ կարգավորման:

ԳԼՈՒԽ 4 ՄԱՆՐԷԱԶԵՐԾՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Մանրէազերծումը (լատ. *sterilization* - ստերիլացում) մանրէաբանական կարևորագույն և անհրաժեշտ գործընթացներից է: Մանրէազերծումը բոլոր կենդանի էակների ոչնչացմանը ուղղված գործընթաց է: Մանրէների զարգացումը կասեցնելու նպատակով մանրէազերծվում են սննդամիջավայրերը, ապակեղենը, գործիքները և հետազոտությունների համար անհրաժեշտ այլ առարկաները: «Մանրէազերծում» տերմինը ունի բացարձակ իմաստ: Օբյեկտը կարող է լինել մանրէազերծված կամ ոչ մանրէազերծված, և չի կարող լինել մասնակի կամ ոչ լիարժեք մանրէազերծված:

Տարբերում են ջերմային և ոչ ջերմային մանրէազերծում: Մանրէաբանության մեջ կիրառվում են ջերմային մանրէազերծման հետևյալ ձևերը՝ շիկացում, չոր մանրէազերծում (տաք օդով), հագեցած ջրային գոլորշիով մանրէազերծում (ավտոկլավացում), կոտորակային մանրէազերծում (տինդալացում) և եռացում: Ոչ ջերմային մանրէազերծման մեթոդներից են՝ ֆիլտրումը, գազային նյութերով և ուլտրամանուշակագույն կամ այլ տեսակի ճառագայթներով մանրէազերծումը:

Մանրէազերծման այս կամ այն եղանակի կիրառության նպատակահարմարությունը պայմանավորված է առաջին հերթին նյութի ֆիզիկա-քիմիական հատկություններով, երբեմն նաև հետազոտման նպատակով:

Սննդամիջավայրերի մանրէազերծում

Մանրէազերծում հագեցած գոլորշիով՝ ավտոկլավացմամբ: Ավտոկլավացումը սննդամիջավայրերի մանրէազերծման առավել հուսալի և լայն կիրառվող եղանակներից է, որի հիմքում ընկած է մթնոլորտայինից բարձր ճնշմամբ հագեցած ջրային գոլորշիով նյութի ջերմամշակումը: Հայտնի է, որ գոլորշու ջերմաստիճանը մեծանում է դրա ճնշման ավելացմանը զուգընթաց (աղյուսակ 3):

Աղյուսակ 3.

Հագեցած գոլորշու ջերմաստիճանը տարբեր ճնշումների դեպքում

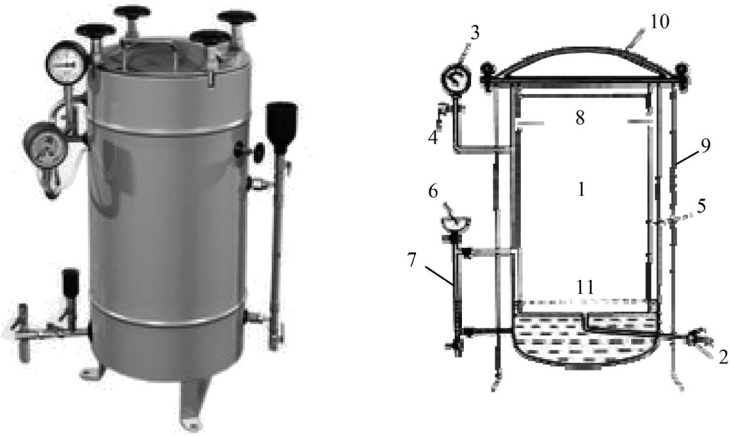
ճնշում			Ջերմաստիճան, °C
Մթն	**ամմ***	**կՊա**	
1	0	101.32	100
1.5	0.5	151.98	111
2	1	202.65	121
2.5	1.5	251.20	128
3	2	299.75	134

**ամմ – ավելցուկային մթնոլորտային ճնշում*

Ավտոկլավացման արդյունավետությունն ապահովվում է բարձր ջերմաստիճանի և գոլորշու միաժամանակյա ազդեցությամբ, որի ընթացքում ոչնչանում են մանրէների և՛ վեգետատիվ բջիջները, և՛ սպորները: Հաստատված է, որ գրեթե բոլոր մանրէների սպորները 121°C (1 ամմ) հագեցած գոլորշու պայմաններում չեն դիմանում նույնիսկ 5 րոպե, և միայն որոշ հողային բակտերիաների սպորները ոչնչանում են նույն պայմաններում 30 րոպե հետո:

Ավտոկլավացումը իրականացվում է հատուկ հերմետիկ փակվող հաստապատ սարքերում՝ ավտոկլավներում: Ավտոկլավները տարբերվում են ձևով, չափսով, ճնշման կարգավորմամբ, կառուցվածքով և այլ ցուցանիշներով: Դրանք կարող են լինել մեխանիկական, կիսաավտոմատ և ավտոմատ կարգավորմամբ:

Նկար 19-ում պատկերված է մեխանիկական կարգավորմամբ ուղղահայաց ավտոկլավի գծապատկերը: Այն բարձր ճնշմանը դիմակայող մետաղական երկպատ կաթսա է, որի մանրէազերծիչ խցիկում տեղադրում են մանրէազերծվող նյութերն ու պարագաները: Մանրէազերծիչ խցիկում առկա ծորակով օդը դուրս է մղվում խցիկից, իսկ ճնշաչափով որոշվում է խցիկում կուտակված ճնշումը: Մանրէազերծիչ խցիկը ունի ապահովիչ փական, որով ճնշման չափից ավելի բարձրացման դեպքում կարելի է բաց թողնել կուտակված գոլորշին՝ կանխելով ավտոկլավի պայթյունը:



Նկար 19. Մեխանիկական կարգավորմամբ ուղղահայաց ավտոկլավ (աջից) և դրա գծապատկերը (ձախից):

1. Մանրէազերծիչ խցիկ, 2. Մանրէազերծիչ խցիկից օդը դուրս մղող խողովակի ծորակ, 3. Ճնշաչափ, 4. Ապահովիչ փական, 5. Ջրագոլորշիային խցիկ, 6. Ջազար, 7. Ջրաչափային ապակյա խողովակ, 8. Ջրագոլորշիային խցիկի ներքին պատի անցքեր, 9. Պահպանիչ պատյան, 10. Կափարիչ, 11. Պատվանդան:

Պատերի միջև եղած տարածությունը՝ ջրագոլորշիային խցիկը, հատուկ ճագարով լցվում է ջրով (աղային նստվածքներից խուսափելու համար ցանկալի է լցնել թորած ջրով) մինչև որոշակի մակարդակ: Ջրի մակարդակը որոշվում է հատուկ ջրաչափային ապակյա խողովակով, որի առավելագույն նշաչափը գերազանցել ցանկալի չէ, քանի որ ջրի եռման ընթացքում այն կարող է անցնել մանոմետրը միացնող խողովակի մեջ և խաթարել մանոմետրի աշխատանքը: Ջրագոլորշիային խցիկի ներքին պատի վերին հատվածում առկա են անցքեր, որոնց շնորհիվ գոլորշին ներթափանցում է մանրէազերծիչ խցիկ: Կաթսան արտաքինից ծածկված է պահպանիչ պատյանով: Հերմետիկություն ստեղծելու համար ավտոկլավը պինդ փակվում է ռեզինե մեջաղիր կրող զանգվածեղ կափարիչով: Մանրէազերծվող առարկաները տեղադրվում են հատուկ պատվանդանի վրա:

Ավտոկլավացում: Կախված ավտոկլավի տեսակից մանրէազերծման առանձին գործողությունները կարող են տարբերվել: Համապատասխանաբար տարբեր է նաև դրանց հետ աշխատելու տեխնիկան: Սակայն տարբեր ավտոկլավներում մանրէազերծման ընթացքի հիմնական մոտեցումները նույնն են:

Աշխատանքից առաջ պետք է զննել ավտոկլավը և չափիչ սար-

քավորումները: Ավտոկլավի ցանկացած անսարքության դեպքում (մանոմետրի սլաքի զրոյից շեղման, ջրաչափային խողովակի ճեղքի առաջացման) աշխատել չի թույլատրվում: Սարքի զննումից հետո, ջրագոլորշիային խցիկը պետք է լցնել ջրով, մինչև ջրաչափային խողովակի վերին նիշը: Մանրէազերծիչ խցիկի մեջ հատուկ պատվանդանի վրա տեղադրվում են մանրէազերծվող նյութերը: Առարկաները պետք է դասավորված լինեն իրարից որոշակի հեռավորության վրա, որպեսզի գոլորշին ազատ թափանցի դրանց միջով, հակառակ դեպքում, նյութերը լիարժեք ջերմամշակման չեն ենթարկվի և, հետևաբար, չեն մանրէազերծվի: Մանրէազերծիչ խցիկում առարկաները տեղադրելուց հետո պետք է փակել ավտոկլավի կափարիչը, այնուհետև բացել մանրէազերծիչ խցիկն արտաքին օդի հետ միացնող ծորակը և միացնել էլեկտրական սնուցմանը:

Մանրէազերծիչ խցիկից մնացորդային օդի հեռացումը ավտոկլավացման գործընթացի անհրաժեշտ պայմանն է, քանի որ նույն ճնշման տակ գոլորշու ջերմաստիճանն ավելի բարձր է, քան օդի և գոլորշու խառնուրդինը: Ավտոկլավում օդ մնալու դեպքում նյութը կարող է չմանրէազերծվել: Ավտոկլավից մնացորդային օդի հեռացման առավել պարզ և տարածված մեթոդը գոլորշիով օդի դուրս մղումն է: Ջրագոլորշին օդի հետ դուրս է մղվում ծորակի վրա ամրացված ռետինե փողրակով ջրով լցված հատուկ տարայի կամ կոյուղուն միացված հատուկ խողովակի մեջ: Օդի դուրս մղումը գոլորշիով չպետք է գերազանցի 15-20 րոպեն, այլապես ջրի ամբողջական գոլորշիացման արդյունքում ավտոկլավի աշխատանքը կխափանվի: Օդի ամբողջական հեռացման մասին վկայում է կայուն անդադար հագեցած գոլորշու շիթը: Հագեցած գոլորշու շիթը պետք է շարունակել դուրս մղել մինչև 10 րոպե: Գոլորշու ծախսը նվազեցնելու համար կարելի է կիսով չափ բացել ծորակը: Ժամանակակից ավտոկլավներում օդը մանրէազերծիչ խցիկից հեռացվում է վակուումային պոմպի օգնությամբ:

Օդը հեռացնելուց հետո ծորակը փակվում է, և ճնշումը բարձրացվում համապատասխան արժեքի: Ավտոկլավացման պայմանակարգը արտահայտվում է ավելցուկային մթնոլորտային ճնշման միավորներով և տևողությամբ, օրինակ՝ մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Ավտոկլավի ճնշաչափի վրա նշվում է ավտոկլավում առաջացած այն ավելցուկային ճնշումը, որը բարձր է նորմալ մթնոլորտայինից: Հաճախ մանրէազերծման պայմանակարգը բնութագրվում է ջերմաստիճանով և ժամանակով:

Այն պահին, երբ ճնշաչափի սլաքը հասնում է հավելյալ ճնշման ցուցանիշին, և, հետևաբար, գոլորշու ջերմաստիճանը հասնում է ցանկալի մեծության, ճնշման այդ մակարդակը մեխանիկական կամ ավտոմատ կարգավորմամբ պահպանվում է անհրաժեշտ ժամանակահատվածում: Մանրէազերծելուց հետո դադարեցվում է ավտոկլավի էլեկտրասնուցումը: Ավտոկլավում ճնշումը աստիճանաբար ընկնում է՝ հավասարվելով մթնոլորտայինին: Միայն այս դեպքում կարելի է բացել գոլորշին հեռացնող խողովակի ծորակը: Այս ծորակի վաղաժամ բացումը կարող է հանգեցնել սննդամիջավայրերի բուռն եռման, որն իր հերթին պատճառ է հանդիսանում բամբակյա խցանների խոնավացմանը և նույնիսկ ապախցանմանը: Մնացորդային գոլորշու հեռացումից հետո կարելի է բացել ավտոկլավի կափարիչը՝ պահպանելով անվտանգության կանոնները դեմքի և ձեռքերի գոլորշիահարումից խուսափելու համար: Ժամանակակից ավտոկլավների վակուումային պոմպը հեռացնում է մնացորդային գոլորշին և մասամբ չորացնում մանրէազերծվող նյութը:

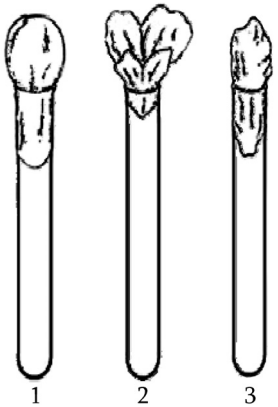
Քանի որ ավտոկլավն աշխատում է բարձր ջերմաստիճանի և բարձր ճնշման պայմաններում, ապա սխալ աշխատանքը կարող է դժբախտ պատահարների պատճառ դառնալ: Ավտոկլավի տեղադրումն ու դրա հետ աշխատանքն իրականացվում է համաձայն անվտանգության կանոնների, որոնք նշվում են ավտոկլավին կցված հրահանգների մեջ: Ավտոկլավի հետ աշխատել թույլատրվում է միայն մասնագիտացված աշխատողներին:

Ավտոկլավի մանրէազերծիչ խցիկում ջերմաստիճանի հսկման անհրաժեշտության դեպքում, կիրառում են ջերմակայուն նյութեր, որոնք նախապես խառնում են չեզոք ներկանյութերի հետ և տեղադրում մանրէազերծումից առաջ: Որպես ջերմաստիճանի հայտանյութեր օգտագործվում են ֆենանտրենը ($T_{հալ}$ 98-100°C), բենզաուրինը ($T_{հալ}$ 115°C), ծծումբը ($T_{հալ}$ 119°C), բենզոյաթթուն ($T_{հալ}$ 121-122°C), միզանյութը ($T_{հալ}$ 132°C), գլյուկոզը ($T_{հալ}$ 146°C), թիոմիզանյութը ($T_{հալ}$ 180°C), ասկորբինաթթուն ($T_{հալ}$ 187-192°C): Այս նյութերի 100 գ ավելացնում են 0.01 գ ներկանյութ (ֆուքսին, մեթիլեն կապույտ), մանրակրկիտ խառնում և լցնում ապակյա խողովակների մեջ, որոնք ունեն հավասար տրամագիծ և պատերի հաստություն: Այդ ապակյա խողովակների եզրերը զոդում են և ուղղահայաց դիրքով տեղադրում ավտոկլավում մանրէազերծվող պարագաների միջև: Համապատասխան ջերմաստիճանի հասնելով՝ նյութերը հալվում են և ներկվում համապատասխան գույնով:

Սննդամիջավայրերի նախապատրաստումը մանրէազերծման: Ավտոկլավացման ընթացքում մանրէազերծվող հեղուկ նյութերի 3-5% գոլորշիանում է, հետևաբար, սննդամիջավայրերը պատրաստելիս խորհուրդ է տրվում ավելացնել պահանջվող ծավալից 5%-ով ավելի թորած ջուր: Այդ դեպքում մանրէազերծումից հետո սննդամիջավայրը (կամ լուծույթը) կունենա պահանջվող խտությունը:

Սննդամիջավայրերը սովորաբար մանրէազերծվում են սրվակներում, անոթներում, ապակյա այլ տարաներում: Խցանները թրջվելուց զերծ պահելու համար տարաները լցվում են իրենց բարձրության կեսից ոչ շատ: Սննդամիջավայրերով լցված տարաները փակվում են բամբակյա կամ այլ տիպի խցաններով: Դրանք պահպանում են սննդամիջավայրերը կոնտամինացումից: Բամբակյա խցանների մանրաթելերը պետք է լինեն հավասարաչափ դասավորված և այնքան խիտ, որպեսզի չխոչընդոտվի գազափոխանակությունը շրջակա միջավայրի հետ: Չափազանց խիտ խցանները դժվարացնում են օդի ներթափանցումը:

Խցանի պատրաստման համար բամբակի տափակ մի կտոր, որում մանրաթելերի ուղղվածությունը զուգահեռ է, գլանափաթաթում են: Որպեսզի ստացված խցանը լինի անհրաժեշտ խիտ, այն մաքուր ապակյա հարթակի վրա գլանափաթաթում են ձեռքի ափով: Սովորական սրվակի համար խցանի երկարությունը պետք է լինի 4 սմ: Խցանը պետք է մտնի սրվակի մեջ 1.5-2 սմ (նկար 20): Սրվակի ձևը պահպանելու համար այն պետք է հանել սրվակից պտուտական շարժումներով: Այնուհետև խցանը ծածկվում է մաքուր թանզիվով:



Նկար 20. Բամբակյա խցաններով սրվակներ:

1. Խցանը ճիշտ է պատրաստված, 2. և 3. Խցանները սխալ են պատրաստված:

Մանրէազերծումից առաջ սրվակների և անոթների խցանները փաթաթում են թղթով: Չի կարելի ավտոկլավում մանրէազերծվող անոթների խցանները ծածկել ցելոֆանով, փայլաթիթեղով կամ այլ նյութերով, որոնք թափանցելի չեն գոլորշու համար: Գոլորշին պետք է ներթափանցի խցանով դեպի անոթ, հակառակ դեպքում միջավայրերը չեն տաքանա անհրաժեշտ չափով և չեն մանրէազերծվի: Ապակյա, ռեզինե, փայտե, պլաստմասե խցանների մանրէազերծման դեպքում դրանք փաթաթում են երկշերտ թղթով և ամրացնում բամբակյա խցանով փակ անոթին: Խցանները փոխանակվում են մանրէազերծ պայմաններում, սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցին մոտ:

Ավտոկլավացման պայմանակարգի ընտրությունը: Ավտոկլավում մանրէազերծումն իրականացվում է 111-138°C պայմաններում, այսինքն՝ 0.5-2.5 ամմ պայմաններում: 111°C-ից ցածր ջերմաստիճանը հուսալի չէ, իսկ 138°C-ից բարձրը, որպես կանոն, նպատակահարմար չէ, ավելին՝ ինչքան բարձր է գոլորշու ճնշումը, այնքան դժվար է ավտոկլավի շահագործումը: Առանց վակուումային պոմպերի ավտոկլավների համար առավել հուսալի պայմանակարգերն են՝ մանրէազերծումը 121°C ջերմաստիճանում (1 ամմ) 15-45 րոպեի ընթացքում և մանրէազերծումը 128°C ջերմաստիճանում (1.5 ամմ) 10-30 րոպեի ընթացքում: Հաճախ սննդամիջավայրերի մանրէազերծումը իրականացվում է 0.5 և 1 ամմ պայմաններում: Ավտոկլավացման ջերմաստիճանն ու պահաժամը որոշվում է առաջին հերթին սննդամիջավայրերի կազմով, բաղադրամասերի ջերմության նկատմամբ կայունությամբ: Կաթն ու ժելատինային սննդամիջավայրերը, գարեջրային քաղցուն, հյութերը, շաքարասնկային լուծամզվածքը, որոնք պարունակում են շաքարներ, վիտամիններ կամ հեշտ քայքայվող նյութեր սովորաբար մանրէազերծում են 0.5 ամմ պայմաններում 15-30 րոպեի ընթացքում: Մսապեպտոնային սննդամիջավայրերը կարելի է մանրէազերծել 1 ամմ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Ագար-ագար պարունակող սննդամիջավայրերը մանրէազերծվում են դժվարությամբ, քանի որ մանրէազերծումը սկսվում է միայն ագար-ագարը հալվելուց հետո: Հալված ագար-ագարը մանրէազերծելու համար անհրաժեշտ է երկու անգամ ավելի ժամանակ, քան նույն քանակությամբ ջրի մանրէազերծման համար: Դժվարությամբ են մանրէազերծվում փոշիացված նյութերը (տալկը, կավիճը), ինչպես նաև մածուցիկ հեղուկները (գլիցերինը, վազելինային յուղը), քանի որ դրանք վատ են փոխանցում ջերմությունը և տաքանում են

շատ դանդաղ: Այդպիսի նյութերը ենթարկում են չոր մանրէազերծման ջեռոցներում 160°C ջերմաստիճանային պայմաններում 2 ժամվա ընթացքում, կամ 170°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1 ժամվա ընթացքում: Յուղի կամ փոշու շերտն անոթում չպետք է գերազանցի 1.5 սմ:

Որոշ սուբստրատներ, օրինակ՝ հողը, որը պարունակում է ջերմակայուն սպորներ, մանրէազերծում են 1 ամճ պայմաններում մեկ անգամ 2 ժամ տևողությամբ կամ երկու օր շարունակ 1-ական ժամ, երբեմն էլ՝ 2 ամճ պայմաններում 2 ժամ:

Մանրէազերծման պայմանակարգն ընտրելիս պետք է հաշվի առնել նաև սննդամիջավայրի pH-ը: Թթվային pH-ի պայմաններում սննդամիջավայրի բաղադրության մեջ մտնող նյութերի մեծ մասը կարող են հիդրոլիզի ենթարկվել: Ցածր pH-ը և բարձր ջերմաստիճանը երկարատև մանրէազերծման դեպքում նպաստում են նյութերի հիդրոլիզին: Դրա հետևանքով մանրէազերծումից հետո ժելատին կամ նույնիսկ ագար-ագար պարունակող սննդամիջավայրերը կարող են չպնդանալ: Հիմնային pH-ի պայմաններում մանրէազերծման ընթացքում նստվածք են անցնում երկաթի աղերը, իսկ շաքարները կարամելացվում են և դառնում ոչ մատչելի: Որոշ դեպքերում մանրէազերծման ընթացքում փոփոխվում է սննդամիջավայրի pH-ը: Օրինակ՝ եթե ածխաջրեր պարունակող սննդամիջավայրի pH-ը 7-ից բարձր է, ապա ավտոկլավում մանրէազերծումից հետո pH-ը կարող է թթվայնանալ ընդհուպ pH 6: Դրանից խուսափելու համար խորհուրդ է տրվում ածխաջրերը, ֆոսֆատները, երկաթի աղերը մանրէազերծել առանձին խիտ լուծույթների ձևով և մանրէազերծումից հետո միայն խառնել անհրաժեշտ հարաբերությամբ:

Մանրէազերծման պայմանակարգը կախված է նաև մանրէազերծվող սուբստրատի ծավալից: Ինչքան մեծ է սուբստրատի ծավալը, այնքան երկարատև պետք է լինի նույն ջերմաստիճանի կամ ճնշման պայմաններում մանրէազերծումը: Նշանակություն ունեն անոթների պատերի հաստությունը, ինչպես նաև անոթների ձևը (աղյուսակ 4): Դա պետք է հաշվի առնել գործնական աշխատանքներում: Դիցուք՝ ցանկալի չէ մանրէազերծել ջերմազգայուն սուբստրատը սրվակների և մեծ ծավալային անոթներում նույն պայմանակարգով: Եթե սննդամիջավայրը մանրէազերծվում է այն պայմանակարգով, որն առաջարկվում է փոքր ծավալների մանրէազերծման համար, ապա մեծ անոթի պարունակությունն այդ պայմանակարգում կարող է չմանրէազերծվել: Եթե սննդամիջավայրը մանրէազերծվում

է այն պայմանակարգով, որն առաջարկվում է մեծ ծավալների մանրէազերծման համար, ապա փոքրածավալ անոթում սննդամիջավայրը մանրէազերծելիս ենթարկվում է երկարատև ջերմամշակման և կարող է փչանալ:

Ավտոկլավացումից հետո մանրէազերծումը ստուգելու համար սննդամիջավայրերը պահում են 30°C ջերմաստիճանում 2-3 օր: Եթե սննդամիջավայրերում նկատվում է մանրէների աճ, նշանակում է, որ սննդամիջավայրը չի մանրէազերծվել, ուստի անհրաժեշտ է այն նորից պատրաստել և մանրէազերծել:

Աղյուսակ 4.

Հեղուկի մանրէազերծման տևողության կախվածությունն անոթի ծավալից

Տարա	Ծավալ		Մանրէազերծման տևողությունը 121-123°C ջերմաստիճանային պայմաններում, րոպե
	մմ	Մլ	
Սրվակներ	18×150 32×200 38×200		12-14 13-17 14-20
Անոթներ՝ բարակապատ		50 125 200 500 900 1000 1800 2000	12-14 12-14 12-15 17-22 19-24 20-25 25-30 30-35
հաստապատ		500 1000 2000	24-28 25-30 40-45
Մատրասներ		1000	30-35
Շշեր		9000 100	50-55 13-17

Կոտորակային մանրէազերծում (տինդալացում) և պաստերացում: Կոտորակային մանրէազերծում առաջարկել է 1877 թ. Ջ. Տինդալը: Այն կիրառվում է այն սննդամիջավայրերի համար, որոնք փչանում են 100°C-ից բարձր ջերմամշակման ընթացքում: Կոտորակային մանրէազերծման սկզբունքը սննդամիջավայրը կամ դրա առանձին բաղադրամասերը մի քանի անգամ ջերմաշակելն է բնա-

կանոն ճնշման պայմաններում: Կոտորակային մանրէազերծումն իրականացվում է Կոխի եռոցում (նկար 21) կամ ավտոկլավում՝ գոլորշու հոսքով (100°C):

Սննդամիջավայրերը ջեռոցներում ջերմամշակում են մի քանի անգամ՝ յուրաքանչյուրը 10-15 րոպե: Յուրաքանչյուր ջերմամշակումից հետո սննդամիջավայրերը տեղադրում են ջերմապահարան 30°C ջերմաստիճանային պայմաններում 8-12 ժամ՝ կենսունակ սպորների ծլման համար: Ջերմազգայուն բաղադրամասեր պարունակող սննդամիջավայրերը ջերմամշակվում են 60-80°C ջերմաստիճանային պայմաններում՝ յուրաքանչյուր 8-12 ժամը մեկ 4-5 անգամ:

Նկար 21. Ճնշաչափով (Ա) և առանց ճնշաչափի (Բ) Կոխի եռոցներ:

Նյութի մեկանգամյա ջերմամշակումը 100°C-ից ցածր ջերմաստիճանում հայտնի է որպես պաստերացում: Այս մեթոդն առաջին անգամ առաջարկել է Լ. Պաստյորը: Այն նախատեսվում է միայն ոչ սպորավոր մանրէների (կամ մանրէների վեգետատիվ ձևերի) ոչընչացման համար, հետևաբար, այն չի ապահովում մանրէազերծում: Պաստերացումն իրականացնում են 60-80°C 10-30 րոպեի ընթացքում: Պաստերացումն օգտագործում են սննդարդյունաբերության մեջ, հատկապես կաթի, մրգային հյութերի, գինու, գարեջրի և այլ սննդամթերքների ջերմամշակման համար:

Մանրէազերծում ֆիլտրմամբ: Որոշակի կազմ ունեցող սինթետիկ սննդամիջավայրերը մանրէազերծում են ֆիլտրելով: Այդպիսի սննդամիջավայրերը պարունակում են հեշտ քայքայվող կամ ցնդող

բաղադրամասեր՝ վիտամիններ, ամինաթթուներ (ցիստեին և ցիստին), սպիտակուցներ, արոմատիկ ածխաջրեր, հակաբիոտիկներ և այլն: Հեղուկների ֆիլտրումն իրականացվում է մանր ծակոտիներ ունեցող նյութերի՝ ասբեստի, ցելյուլոզի, ճենապակու, կաոլինի կիրառմամբ, որոնք հեշտությամբ մակակլանում են մանրէների բջիջները:

Տեսականորեն մանրէազերծող ֆիլտրեր են համարվում 0.7 մկմ տրամագիծ ունեցող ծակոտիներով նյութերը: Գործնականում ֆիլտրերի պիտանելիությունը որոշվում է դրանցով որևէ մանրէի, օրինակ՝ *Serratia marcescens*-ի կախույթի փորձնական ֆիլտրմամբ: Մանրէազերծվածությունը որոշվում է սննդամիջավայրում մեծ քանակությամբ ֆիլտրատի ցանքով: Եթե 5 օրում թեստ օրգանիզմը չի աճում, ապա այդպիսի ֆիլտրերը կարելի է օգտագործել մանրէազերծման նպատակով:

Լայն տարածում են ստացել թաղանթային ֆիլտրերը, որոնք տարբեր տրամագիծ և չափս ունեցող նիտրոցելյուլոզային սկավառակներ են: Թաղանթային ֆիլտրերը, կախված ծակոտիների մեծությունից, կարող են օգտագործվել ֆիլտրման կամ մանրէազերծման նպատակով: Մանրէազերծման նպատակով օգտագործում են «Վլադիպոր» (Ռուսաստան) ընկերության արտադրության № 1 - 4 ֆիլտրերը, «Սինպոր» (Չեխիա) ընկերության արտադրության՝ № 5 - 10 և «Միլիպոր» (ԱՄՆ) ընկերության արտադրության VF, VM, VC, SLGS, SLHA, DA ֆիլտրերը:

Ասբեստի և ցելյուլոզի խառնուրդներից պատրաստված խիտ սկավառակները կոչվում են Զեյտցի ֆիլտրեր: Ծակոտիների չափսերից կախված դրանք անվանակոչվում են տարբեր հապավումներով. EK – ծակոտիների տրամագիծը 1.5-1.8 մկմ է, EKS՝ 1.2-1.5 մկմ, EKS-1՝ 1-1.2 մկմ, և EKP՝ 0.8-1 մկմ (նկար 22 Ա):

Ասբեստային սկավառակը տեղադրվում է չժանգոտվող մետաղից կամ ապակուց պատրաստված բռնակի մեջ՝ բռնակի վերին գլանաձև և ստորին ձագարաձև հատվածների միջև: Բռնակի ստորին ձագարաձև հատվածի խողովակը ռեզինե խցանի միջով միանում է Բունզենի անոթին: Շատ հաճախ այդ ամբողջական սարքն անվանում են Զեյտցի ֆիլտր (նկար 22 Բ): Նախքան օգտագործելը ֆիլտրերը, բռնակները և դրանք կրող անոթը պետք է լինեն մանրէազերծված:

Թաղանթային ֆիլտրերը մանրէազերծվում են ավտոկլավացմամբ 1 ամմ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում կամ երկարատև եռացմամբ: Բռնակը ռեզինե խցանի հետ փաթաթում են թղթով և

մանրէազերծում 1 ամՃ պայմաններում 20-30 րոպեի ընթացքում: Ջեյտցի ֆիլտրերը մանրէազերծվում են հավաքված վիճակում:

Ա Բ

Նկար 22. Թաղանթային ֆիլտրեր (Ա) և Ջեյտցի ֆիլտրը միացված վակուումային պոմպին (Բ):

Ապակյա ամանեղենի մանրէազերծումը

Ապակյա ամանեղենը հիմնականում մանրէազերծվում է չոր օդով ջերմամշակմամբ (<180°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1-3 ժամվա ընթացքում) (աղյուսակ 5): Այս դեպքում ոչնչանում են մանրէների և՛ վեգետատիվ բջիջները, և՛ սպորները:

Աղյուսակ 5.

Չոր ջերմամշակմամբ մանրէազերծման պայմանները

Ջերմաստիճան, °C	Ժամանակ, րոպե
140	180
150	150
160	120
170	60

Մանրէազերծումն իրականացվում է հատուկ ջեռոցներում, որոնք տարբերվում են ձևով և ջերմացման եղանակով: Ջեռոցները պատրաստված են ջերմակայուն նյութերից՝ մետաղից և ասբեստից: Ջեռոցներում կան պատվանդաններ, որոնց վրա տեղադրվում են ամանեղենը և ջերմաչափը:

Ջեռոցի պատերի և ջեռուցվող մակերեսի ջերմաստիճանն ավելի բարձր է, քան դրանում գտնվող օդինը, այդ պատճառով ջերմաչափի սնդիկային ծայրը պետք է տեղադրված լինի ջեռոցի խցիկի վերին պատից 6-8 սմ ներքև: Ջեռոցների վերին մասում կան նաև օդափո-

խության համար նախատեսված անցքեր, որոնք մանրէազերծման ընթացքում փակվում են: Ջեռոցները ունեն ջերմակարգավորիչ սարքեր, որով կարգավորվում է անհրաժեշտ ջերմաստիճան:

Ամանեղենի նախապատրաստումը մանրէազերծման: Մանրէազերծումից առաջ ամանեղենը լավ լվացվում է, ապա փաթեթավորվում է թղթով, որպեսզի ջերմամշակումից հետո մնա մանրէազերծ: Պիպետների վերին ծայրերը խցանում են բամբակով, իսկ բամբակի ավելորդ ծայրն այրում են սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցի վրա: Պիպետները փաթեթավորում են 4-5 սմ լայնությամբ թղթե երիզներով: Փաթեթավորումը սկսում են պիպետի ստորին ծայրից և պարուրաձև շարժումներով փաթաթում մինչև բամբակով խցանված ծայրը: Փաթեթավորված պիպետները տեղավորում են հատուկ մետաղյա գլանակներում: Պետրիի թասերը փաթեթավորում են 2-4 ական, իսկ մածկաթիակները՝ մեկական, և փաթեթավորում ընդհանուր փաթեթում: Անոթները և սրվակները խցանվում են բամբակյա խցաններով, ապա փաթեթավորում թղթով:

Մանրէազերծում: Մանրէազերծման համար նախապատրաստված ամանեղենը տեղավորում են ջեռոցներում միմյանցից որոշակի հեռավորությամբ, որպեսզի ջերմությունը տարածվի հավասարաչափ: Աշխատանքի ընթացքում ջեռոցը պետք է ամուր փակված լինի, իսկ մանրէազերծումից հետո այն չպետք է բացել մինչև ջերմաստիճանը չիջնի 80°C, հակառակ դեպքում, կտրուկ սառեցման հետևանքով կարող է խախտվել ամանեղենի մանրէազերծվածությունը, իսկ տաք ամանեղենը կարող է ճաքել:

Ամանեղենը կարելի է մանրէազերծել նաև ավտոկլավում: Այս դեպքում մանրէազերծման պայմանները կախված են ամանեղենի ծավալից և ապակու հաստությունից (տե՛ս աղյուսակ 4): Ավտոկլավում մանրէազերծման համար ամանեղենը պատրաստում են նույն ձևով, ինչպես ջեռոցներում մանրէազերծման դեպքում: Հարկավոր է նկատի ունենալ, որ ավտոկլավում ամանեղենը խոնավանում է:

Լաբորատոր գործիքների և պարագաների մանրէազերծումը

Փոքր մետաղյա գործիքները, ինչպես օրինակ՝ մանրէաբանական օղակները կամ ասեղները, նրբունելիները, մկրատները, ապակյա մածկաթիակները մանրէազերծում են գազայրոցի կամ սպիրտայրոցի բոցով օգտագործելուց անմիջապես առաջ: Աշխատան-

քից առաջ բոցի վրա թեթևակի ջերմամշակման են ենթարկում նաև առարկայական ապակիները և ծածկապակիները, ապակյա մաթկաթիակները և ձողիկները, ճենապակյա հավանգները և հավանգակոթերը, անոթների և սրվակների եզրերը, ինչպես նաև խցանները: Բոցի ջերմությունը ոչնչացնում է մանրէների և՛ վեգետատիվ ձևերը, և՛ սպորները: Մանրէաբանական լաբորատորիայում, միանվագ օգտագործման համար նախատեսված ներարկիչներից բացի, շատ հաճախ օգտագործվում են նաև բազմակի օգտագործման ապակյա ներարկիչներ, որոնք մանրէազերծվում են ջեռոցներում 160°C ջերմաստիճանի պայմաններում ամբողջական (75 րոպե), կամ անջատ (60 րոպե): Ամբողջական վիճակում ներարկիչները մանրէազերծում են սրվակում, իսկ անջատ վիճակում՝ փաթաթված թղթում: Ներարկիչներն անջատ կարելի է մանրէազերծել նաև ավտոկլավում (1 ամմ պայմաններում 15-20 րոպե): Ջերմակայուն ամանները, ռետինե խցանները և խողովակները մանրէազերծվում են ավտոկլավում, ընդ որում, թղթով փաթեթավորված: Մանրէազերծման ջերմաստիճանն ընտրվում է ըստ մանրէազերծվող գործիքի ջերմակայունության:

Որոշ առարկաներ, ինչպես օրինակ՝ մետաղյա գործիքները, մանր ապակյա սարքավորումները, թաղանթային ֆիլտրերը, մանրէազերծվում են թորած ջրում՝ երկարատև եռացնելով 20-30 րոպեի ընթացքում: Մետաղյա գործիքները և մանր ապակյա սարքավորումները եռացնում են հատուկ փակ տարաներում՝ մանրէազերծիչներում կամ մետաղյա ամաններում, իսկ թաղանթային ֆիլտրները մանրէազերծում են՝ եռացնելով բամբակյա խցանով փակված ապակյա անոթներում կամ քիմիական բաժակներում: Սակայն, մանրէազերծման այս եղանակը այդքան էլ նպատակահարմար չէ, քանի որ երկարատև եռացման ընթացքում մանրէազերծվող նյութը կարող է վնասվել: Եռացմամբ մանրէազերծումն առավել արդյունավետ է լինում եռացող լուծույթում մանրէազերծիչ նյութերի (օրինակ՝ 2% ֆորմալդեհիդ կամ 0.1% սուլեմա) ավելացման դեպքում: Սակայն այս դեպքում էլ առաջանում է մանրէազերծվող նյութերի աղտոտման վտանգ:

Մանրէազերծում գազային նյութերով: Այն սարքավորումները, որոնք ունեն հայելային, օպտիկական և ռադիոէլեկտրոնային կառուցամասեր, ինչպես նաև սարքավորումները, որոնք պատրաստված են ջերմանկայուն նյութերից, օրինակ՝ կենտրոնախուսակային սրվակները, ենթարկում են գազային մանրէազերծման: Գազային մանրէազերծման ընթացքում օգտագործվում են սպորասպան նյու-

թեր, օրինակ՝ էթիլենի օքսիդ, մեթիլբրոմիդ, պրոպիլենի օքսիդ, ֆորմալդեհիդ, գլուտարալդեհիդ, բետա-պրոպիոլակտոն, օզոն և այլն: Հատկապես շատ արդյունավետ է էթիլենի օքսիդի և մեթիլբրոմիդի 1:1.44 հարաբերությամբ խառնուրդը («ԷՄ» խառնուրդ):

Գազային մանրէազերծումն իրականացնում են հերմետիկ փակվող հատուկ տարաներում: Մանրէազերծվող նյութերը փաթեթավորվում են գազային մշակումից չփչացող թղթով, քլորվինիլային և նեյլոնային ժապավեններով և այլն: Մանրէազերծումից առաջ վակուումային խցիկի օդը պետք է հեռացնել, որպեսզի ապահովվի օբյեկտի և մանրէազերծիչ նյութի շփումը: Մանրէազերծման ընթացքում վերահսկվում է գազերի կոնցենտրացիան, խոնավությունը, ջերմաստիճանը և մշակման տևողությունը: Որոշ դեպքերում գազային մանրէազերծումն իրականացնում են բարձր ջերմաստիճանում (45-70°C): Մանրէազերծման պայմանակարգը կախված գազի տեսակից և մանրէազերծիչ սարքի կառուցվածքից կարող է տարբերվել: «ԷՄ» խառնուրդով 50°C ջերմաստիճանային պայմաններում 100 լ և ավելի տարողունակություն ունեցող մանրէազերծիչ տարայում մանրէազերծման օպտիմալ պայմանակարգը հետևյալն է՝ խառնուրդի խտությունը 3.36 գ/լ (1.2 ամճ պայմաններում), հարաբերական խոնավությունը՝ 80-100%, տևողությունը՝ 24 ժամ: Մանրէազերծման ավարտից հետո խցիկից վակուումային պոմպի միջոցով հեռացնում են գազերը, և խցիկը որոշ ժամանակ թողնում վակուումային պայմաններում, որպեսզի մանրէազերծվող նյութերի մակերեսից մնացորդային գազերը ապակլանվեն: Դրանից հետո խցիկը լցնում են մանրէազերծված օդով, իսկ մանրէազերծված սարքավորումներն օգտագործում են մանրէազերծումից 24 ժամ հետո: Դա անհրաժեշտ է գազերի ամբողջական հեռացման համար: Այդ ընթացքում առավել նպատակահարմար է խցիկը տեղավորել քարշիչ պահարանում, կամ լավ օդափոխվող տարածքում: Որոշ պլաստմասե իրեր խորհուրդ է տրվում թողնել լրացուցիչ օդավորման պայմաններում ընդհուպ 9 օր: Գազերով մանրէազերծման ընթացքում անհրաժեշտ է պահպանել թունավոր նյութերի հետ աշխատանքային բոլոր կանոնները:

Մանրէազերծում ճառագայթմամբ: Տարածքների, սարքավորումների, սննդանյութերի մանրէազերծման համար կիրառում են ինֆրակարմիր, ուլտրամանուշակագույն, ռենտգենյան, α- β- և γ-ճառագայթները: Ճառագայթման միավորը ռադն է (1 ռադ = 0.01 Գռ), որը էկվիվալենտ է կլանված էներգիային մոտավորապես 100 Էրգ/գ: Մանրէազերծող համարվում են 2-3 Մռադ (10^4 Գռ) չափա-

բաժինները: Առավել հաճախ օգտագործում են ուլտրամանուշակագույն ճառագայթումը: Հարկ է նշել, որ ներկայումս առավել տարածում է գտնում միանվագ օգտագործման համար նախատեսված մանրէազերծված ամանեղենը:

Սննդամիջավայրերի, ամանեղենի և այլ լաբորատոր նյութերի մանրէազերծման եղանակները ներկայացված են աղյուսակ 6-ում:

Աղյուսակ 6.

Սննդամիջավայրերի, ամանեղենի և այլ լաբորատոր պարագաների մանրէազերծման եղանակները

Մանրէազերծվող նյութեր	**Մանրէազերծման եղանակը**	**Մանրէազերծման պայմանակարգը**	**Ծանուցում**
Հողային մզվածք պարունակող, կարտոֆիլային և որոշ այլ բնական սննդամիջավայրեր	Ավտոկլավացում	1.5-2 ամճ, 30 րոպե	Բամբակյա խցաններով փակված անոթներում, սրվակներում, շշերում և այլն:
Հեղուկ և ագարացված սննդամիջավայրեր, որոնք չեն պարունակում շաքարներ և 120°C-ում քայքայվող այլ միացություններ	Ավտոկլավացում	1 ամճ, 20 րոպե	Բամբակյա խցաններով փակված անոթներում, սրվակներում, շշերում և այլն:
Հեղուկ և ագարացված սննդամիջավայրեր, որոնք պարունակում են շաքարներ և 120°C-ում քայքայվող այլ միացություններ	Ավտոկլավացում	0.5 ամճ, 20 րոպե	Բամբակյա խցաններով փակված անոթներում, սրվակներում, շշերում և այլն:
Սննդամիջավայրեր, կամ դրա բաղադրիչները, որոնք քայքայվում են 100°C-ից բարձր ջերմաստիճաններում	Կոտորակային մանրէազերծում	Հոսող գոլորշի, 3 անգամ 30-40 րոպե ընդմիջումներով	Բամբակյա խցաններով փակված անոթներում, սրվակներում, շշերում և այլն:
Սննդամիջավայրեր կամ դրա բաղադրիչները, որոնք տաքացնելիս դենատուրացվում են (սպիտակուցներ, որոշ վիտամիններ, ամինաթթուներ)	Բակտերիական ֆիլտրերով ֆիլտրում	-	-

Մանրէազերծվող նյութեր	Մանրէազերծման եղանակը	Մանրէազերծման պայմանակարգը	Ծանուցում
Վազելինային յուղ, գլիցերին, տալկ	Տաք օդ	160°C, 2 ժամ, կամ 170°C, 1 ժամ	Տարայում նյութի շերտը չպետք է գերազանցի 1.5 սմ-ը
Պետրիի թասեր, պիպետներ, մածկաթիակներ	Տաք օդ	160°C - 170°C, 2 ժամ	Թղթով փաթեթավորված (պիպետների վերին ծայրը պետք է փակված լինի բամբակով)
Անոթներ, սրվակներ, քիմիական բաժակներ, տարաներ, կենտրոնախուսակային ապակյա սրվակներ, Բուրիի խողովակներ	Տաք օդ	160°C - 170°C, 2 ժամ	Փակված բամբակյա խցաններով
Ներարկիչներ	Տաք օդ	160°C, 1 ժամ	Տարանջատված և թղթով կամ շորով փաթեթավորված
	Ավտոկլավացում	1 ամճ, 15-20 րոպե	Տարանջատված և թղթով կամ շորով փաթեթավորված
Թաղանթային ֆիլտրեր	Ավտոկլավացում	1 ամճ, 15-20 րոպե	Թորած ջրով տարայում
	Եռացում	30 րոպե	Թորած ջրով տարայում
Ձեյտցի ֆիլտրեր	Ավտոկլավացում	1 – 1.5 ամճ, 20-30 րոպե	Բռնակի գլանը փակված բամբակյա խցանով
	Տաք օդ	160°C, 1 ժամ	Վերին հատվածը թղթով փաթաթած
Կենտրոնախուսակային սրվակներ, պատրաստված ոչ ջերմակայուն պլաստմասսայից	Գազային մանրէազերծում	Կախված է օգտագործվող մանրէասպան նյութից	-
	Ուլտրամանուշակագույն ճառագայթահարում	Պահաժամը որոշում են փորձնականորեն	Ճառագայթումից հետո սրվակները պահում են մանրէազերծված տարաներում

ԳԼՈՒԽ 5 ՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿՆԵՐ, ՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

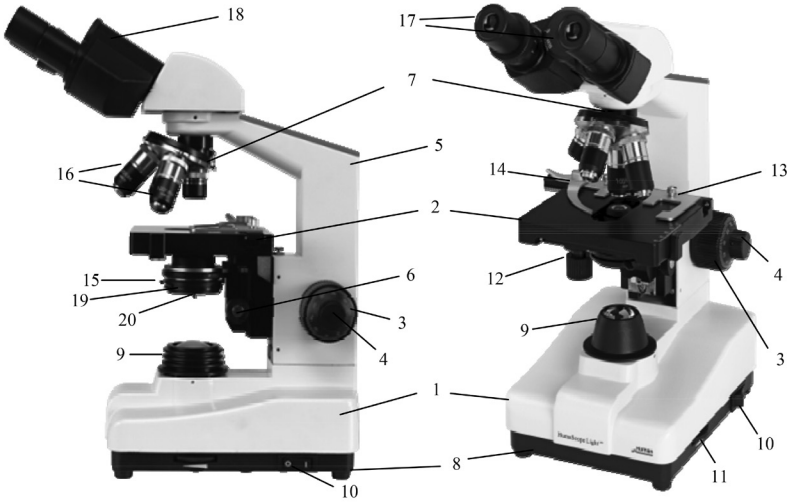
Մանրէային բջիջների մեծությունը չափվում է միկրոմետրերով (1 մկմ = 10^{-3} մմ)*: Այդ պատճառով դրանց ձևաբանության և կառուցվածքի ուսումնասիրությունը հնարավոր է միայն մանրադիտակներով: Մանրադիտակները հարյուրավոր (լուսային մանրադիտակ) կամ տասնյակ հազարավոր անգամ (էլեկտրոնային մանրադիտակ) խոշորացնում են հետազոտվող օբյեկտը: Լուսային մանրադիտակումը ներառում է սովորական լուսադիտմամբ (լուսավոր և մութ տեսադաշտերում), փուլացայտերանգային (ֆազային-կոնտրաստային), լուսարձակային (լյումինեսցենտային) մանրադիտակումը: Վերջերս մշակվել են մանրադիտակման այլ եղանակներ՝ կոնֆոկալ լազերային սքանավորող և զոնդային մանրադիտակում:

HumanScope Light մակնիշի երկփողյա լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը

HumanScope Light մակնիշի երկփողյա մանրադիտակը (նկար 23) կազմված է մեխանիկական և օպտիկական մասերից: Մանրադիտակի մեխանիկական մասը կազմված է տակդիրից, կոպիտ նշանառման և մանրաչափային պտուտակներից, փողակապահիչից կամ ամրակալանից, կոնդենսորի բարձակից, կոնդենսորի տեղափոխման պտուտակից, դարձունից, առարկայական սեղանիկից: Տակդիրի ստորին հատվածը կրում է չորս ռետինե ոտիկներ մանրադիտակի սևեռակման համար, վերին հատվածում գտնվում է էլեկտրական լույսի աղբյուրը, իսկ աջ կողմում տեղադրված են լույսի ուժգնությունը կարգավորող պտուտակն ու հոսանքի աղբյուրի անջատիչը: Օբյեկտը կիզակետի բերվում է առարկայական սեղանիկը կոպիտ նշանառման պտուտակով տեղաշարժելով 15 մմ սահմաններում: Մանրաչափային պտուտակը ծառայում է նուրբ կիզակետման համար: Մանրաչափային պտուտակի լրիվ պտույտն առարկայական սեղանիկը տեղաշարժում է 400 մկմ-ով, իսկ մեկ բաժանմունքով պտույտն առարկայական սեղանիկն իջեցնում կամ բարձրացնում է

*1մմ=10^3մկմ=10^6նմ=10^9պկմ=10^7Å

2 մկմ-ով: Մանրաչափային մեխանիզմը ցանկալի է պտտել մի ուղղությամբ և կես պտույտից ոչ ավելի: Փողակապահիչը իր վրա կրում է առարկայական սեղանիկը, կցափողը, որն իր վրա կրում է փողակները, երկու փողակների միջև անկյունը փոփոխող պտուտակը և դարձունը: Երկու փողակները անշարժ առանցքի նկատմամբ 10°-30° անկյունով տեղաշարժելով՝ հետազոտողը մանրադիտակը հարմարեցնում է իր աչքերին: Ձախ փողակը իր վրա կրում է պտուտակ, որը նախատեսված է թվային տեսախցիկի կիրառման դեպքում վերջինս կիզակետի բերելու համար:



Նկար 23. HumanScope Light մակնիշի երկփողոյա լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը:

1. Մանրադիտակի տակդիր, 2. Առարկայական սեղանիկ, 3. Կոպիտ նշանառման պտուտակ, 4. Մանրաչափային պտուտակ, 5. Փողակապահիչ կամ ամրակալան, 6. Կոնդենսորի բարձակ, 7. Դարձուն, 8. Ռետինե ոտիկներ, 9. Էլեկտրական լույսի աղբյուր, 10. Հոսանքի աղբյուրի անջատիչ, 11. Լույսի ուժգնությունը կարգավորող պտուտակ, 12. Հարթակին ամրացված առարկայական ապակին տեղաշարժող պտուտակ, 13. Շարժական հարթակ, 14. Պրկիչ, 15. Կոնդենսոր, 16. Օբյեկտիվներ, 17. Օկուլյարներ, 18. Փողակ, 19. Իրիսային (ապերտուրային) դիաֆրագմ, 20. Լուսաֆիլտր:

Սեղանիկի վրա գտնվում է շարժական հարթակը, որը առարկայական սեղանիկի ձախ կողմում գտնվող վերին պտուտակի միջոցով կարելի է տեղաշարժել դիմահար ուղղությամբ 30 մմ-ի սահմաններում: Սեղանիկի ձախ կողմում գտնվող ստորին պտուտակի օգնու-

թյամբ հարթակին պրկիչով ամրացված առարկայական ապակին կարելի է տեղաշարժել աջ կամ ձախ ուղղությամբ 70 մմ-ի սահմաններում:

Առարկայական սեղանիկի տակ գտնվում է կոնդենսորը (լուսահավաք ապակի), որը մանրադիտակի աջ կողմում գտնվող հատուկ պտուտակի՝ կոնդենսորի բարձակի օգնությամբ կարող է տեղաշարժվել ուղղահայաց ուղղությամբ 10 մմ-ի սահմաններում:

Մանրադիտակի օպտիկական մասը կազմված է լուսավորող սարքից, օբյեկտիվներից և փողակների վերին մասում տեղադրված օկուլյարներից: Լույսի աղբյուրը ներկառուցված է տակդիրի մեջ անմիջապես կոնդենսորի տակ: Կոնդենսորը կազմված է մի քանի ոսպնյակներից: Դրանք լույսի աղբյուրից ընկնող զուգահեռ ճառագայթները հավաքում են պատրաստուկի հարթության վրա գտնվող մի կետում՝ կիզակետում: Կոնդենսորի մեջ գտնվում է իրիսային (ապերտուրային) դիաֆրագմը, որը կասեցնում է լույսի եզրային ճառագայթների մուտքը: Կոնդենսորի ստորին հատվածին ամրացված է փայլատ ապակիով կամ լուսաֆիլտրով շարժուն օղակը:

Օբյեկտիվը կազմված է ոսպնյակների համակարգից, որոնք գտնվում են մետաղյա շրջանակի մեջ: Դեպի պատրաստուկը ուղղված օբյեկտիվի փոքր ոսպնյակը ամենակարևորն է և կոչվում է դիմային կամ ճակատային: Որքան մեծ է ճակատային ոսպնյակի կորությունը, այնքան կարճ է կիզակետային կամ աշխատանքային (դիմային ոսպնյակից մինչև օբյեկտ) տարածությունը և մեծ է օբյեկտիվի խոշորացումը: Օբյեկտիվի խոշորացման թվային արժեքը նշվում է շրջանակի վրա:

Տարբերում են չոր և իմերսիոն համակարգերի օբյեկտիվներ: Չոր համակարգի օբյեկտիվների կիրառման դեպքում օբյեկտիվի և պատրաստուկի միջև գտնվում է օդային տարածություն, իսկ իմերսիոն համակարգի դեպքում ճակատային ոսպնյակի և պատրաստուկի միջև տարածությունը լցված է ջրով կամ հատուկ յուղով (սովորաբար կիրառվում է մայրիի յուղ): Չոր համակարգի օբյեկտիվները խոշորացնում են 4, 8, 10, 20 և 40 անգամ, իսկ իմերսիոն համակարգինը՝ 90 և 100 անգամ:

Օկուլյարը կազմված է երկու ոսպնյակից՝ վերին (ակնային) և ստորին (հավաքող): Օկուլյարները խոշորացնում են 5, 7, 10, 12, 15 և 20 անգամ: Օկուլյարի ընդհանուր խոշորացումը այնքան մեծ է, որքան փոքր է դրա կազմի մեջ մտնող ոսպնյակների կիզակետային հեռավորությունը: Ուստի մեծ խոշորացման օկուլյարները կլինեն

կարճ, իսկ փոքր խոշորացման օկուլյարները՝ երկար: Մանրադիտակի ընդհանուր խոշորացումը հավասար է օբյեկտիվի և օկուլյարի խոշորացումների արտադրյալին: Օրինակ՝ 15 անգամ խոշորացնող օկուլյարի և 90 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառման դեպքում օբյեկտը կմեծանա 15×90=1350 անգամ:

Մանրադիտակի խոշորացնող ֆունկցիայից անհրաժեշտ է տարբերել դրա մյուս ֆունկցիան՝ լուծող ունակությունը, որով որոշվում է օբյեկտի հստակ պատկերի ստացումը: Մանրադիտակի լուծող ունակությունը կախված է օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունից և մանրադիտակի օպտիկական համակարգի թվային ապերտուրայից: Մանրադիտակի լուծող ունակությունը հակադարձ համեմատական է երկու կետերի միջև եղած նվազագույն հեռավորությանը (d), երբ այդ կետերն ընկալվում են առանձին: Այդ հեռավորությունը՝d-ն որոշվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2},$$

որտեղ A_1-ը օբյեկտիվի թվային ապերտուրան է, A_2-ը՝ կոնդենսորի թվային ապերտուրան, λ-ն՝ օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունը: Թվային ապերտուրան (A) ընկնող լույսի փնջի մաքսիմալ անկյան կեսի սինուսի (α) և օբյեկտիվի ճակատային ոսպնյակի և ծածկապակու միջև գտնվող միջավայրի բեկման ցուցչի (n) արտադրյալն է՝ $A=n\cdot\sin\alpha$:

Այսպիսով, լուծող ունակությունն այնքան ավելի բարձր կլինի, որքան կարճ է օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունը և մեծ է միջավայրի բեկման ցուցիչը: Բեկման ցուցիչը մեծացնելու նպատակով օբյեկտիվի ճակատային ոսպնյակի և հետազոտվող օբյեկտի միջև տեղավորում են իմերսիոն յուղի կաթիլ, որի բեկման ցուցիչը 1.51 է և մոտ է ապակու բեկման ցուցչին (n=1.52): Համեմատության համար նշենք, որ օդի բեկման ցուցիչը 1 է, իսկ ջրինը՝ 1.3:

Յուրաքանչյուր օբյեկտիվի վրա նշված է դրա խոշորացումը և ապերտուրան: Այսպես՝ 8 անգամ խոշորացման դեպքում թվային ապերտուրան 0.2 է, 40 անգամ խոշորացման դեպքում՝ 0.65, իսկ 100-ի դեպքում՝ 1.25:

Մանրադիտակի հետ աշխատանքի կանոնները

Մանրադիտակով աշխատելիս պետք է պահպանել ստորև թվարկված կանոնները և գործողությունների հաջորդականությունը:

1. Մանրադիտակը տեղադրում են սեղանի եզրին այնպես, որպեսզի օկուլյարները գտնվեն աչքերի դիմաց, և աշխատանքի ընթացքում այն չեն տեղաշարժում: Տետրը և աշխատանքի համար անհրաժեշտ բոլոր պարագաները դնում են մանրադիտակի աջ կողմում: Մանրադիտակով աշխատում են նստած: Աթոռի բարձրությունը պետք է լինի այնպես, որպեսզի ուղիղ նստած հնարավոր լինի նայել օկուլյարներով:
2. Այնուհետև բացում են դիաֆրագմը, իսկ կոնդենսորը բարձրացնում:
3. 10× խոշորացնող օբյեկտիվը բերվում է աշխատանքային դրության:
4. Նայելով օկուլյարների մեջ և օգտվելով էլեկտրալամպից՝ առավելագույն չափով և հավասարաչափ լուսավորում են տեսողության դաշտը: Աշխատում են դիտել երկու աչքով, հակառակ դեպքում ամբողջ ծանրությունը կընկնի մեկ աչքին, իսկ դա կարող է առաջացնել աչքի մկանների գերհոգնածություն:
5. Պատրաստուկը տեղավորում են առարկայական սեղանի վրա (ուսումնասիրվող օբյեկտը պետք է գտնվի օբյեկտիվի տակ), և, կողքից նայելով, առարկայական սեղանիկը բարձրացնում են կոպիտ նշանառման պտուտակի օգնությամբ այնպես, որպեսզի ժամանակավոր պատրաստուկների դեպքում օբյեկտիվի դիմային ոսպնյակի և պատրաստուկի միջև լինի 4-5 մմ հեռավորություն, իսկ մշտական պատրաստուկների դեպքում օբյեկտիվն ընկղմվի իմերսիոն յուղի մեջ:
6. Նայելով օկուլյարների մեջ և կոպիտ նշանառման պտուտակը պտտելով ժամսլաքի ուղղությամբ՝ առարկայական սեղանիկը բարձրացնում են ընդհուպ այն դրության, որում լավ է երևում օբյեկտի պատկերը: Եթե պատկերը չի երևում (անհետացել է), ապա պետք է սկզբից կրկնել 5 և 6 կետերի բոլոր գործողությունները: Չի կարելի նայել օկուլյարների մեջ և, միաժամանակ, կոպիտ նշանառման պտուտակը պտտելով, բարձրացնել առարկայական սեղանիկը, քանի որ այդ ընթացքում դիմային ոսպնյակը կարող է սեղմել ծածկապակուն (ժամանակավոր պատրաստուկների դեպքում) կամ առարկայական

ապակուն (մշտական պատրաստուկների դեպքում)՝ ոսպնյակի վրա առաջացնելով քերծվածքներ: Պատկերը ստանալով՝ սեղանը տեղաշարժող պտուտակների օգնությամբ պատրաստուկը տեղաշարժում են, գտնում օբյեկտի անհրաժեշտ տեղը, տեղավորում այն տեսադաշտի կենտրոնում, և պատրաստուկն ամրացնում պրկիչներով:

7. Պատկերի հստակությունը ձեռք են բերում՝ համապատասխանեցնելով օբյեկտիվի վրա ընկնող լույսի փնջի և օբյեկտիվի դիմային ոսպնյակի տրամագծերը: Չափազանց շատ լուսավորվածության դեպքում պատկերման ցայտունությունն ավելացնում են կոնդենսորն իջեցնելով:
8. Դարձունը շրջելով՝ 40× կամ 100× խոշորացնող օբյեկտիվին տալիս են աշխատանքային դրություն: Այնուհետև մանրաչափային պտուտակի օգնությամբ ձեռք են բերում օբյեկտի պատկերման հստակություն: Պետք է հիշել, որ մանրաչափային պտուտակը մի ուղղությամբ կարելի է պտտել կես պտույտից ոչ ավելի: Եթե 40× կամ 100× խոշորացման օբյեկտիվի տեղակայման ընթացքում պատկերը բոլորովին չի ստացվում, այն աշխատում են ստանալ կոպիտ նշանառման պտուտակը ժամսլաքի ուղղությամբ զգուշորեն պտտելով: Եվ միայն դրանից հետո օբյեկտը կիզակետում են մանրաչափային պտուտակի օգնությամբ:
9. Մեծ խոշորացմամբ աշխատանքը ավարտելուց հետո դարձունով տեղակայում են փոքր խոշորացման օբյեկտիվները և միայն դրանից հետո առարկայական սեղանիկից հեռացնում պատրաստուկը: Պատրաստուկը չի կարելի հեռացնել, երբ տեղակայված է 100× խոշորացնող օբյեկտիվը, քանի որ դրա աշխատանքային հեռավորությունը հավասար է 0.6 մմ, և այդ գործողության հետևանքով կարող է վնասվել դիմային ոսպնյակը:

Մանրադիտակի խնամքը: Միայն ճիշտ խնամքի դեպքում մանրադիտակը կարող է շահագործվել երկարատև: Հատկապես մանրազնին պետք է հետևել օբյեկտիվների, օկուլյարների, կոնդենսորի, լուսավորող հարմարանքի մաքրությունը: Դրանց փոշին մաքրում են մանրադիտակին հավելված վրձնիկով, իսկ հետո սրբում են բամբակյա լաթի կտորով, որը պահում են փակ տեղում: Աղտոտման դեպքում պետք է լաթի կտորը թրջել ջրով, իսկ եթե դրանից հետո էլ ոսպնյակի փառը չի անցնում, ապա լաթի կտորը թրջում են մաքուր բեն-

զինով կամ եթերի և սպիրտի խառնուրդով: Անթույլատրելի է ոսպնյակը տրորել մատներով, թղթի կամ լաթի կտորներով:

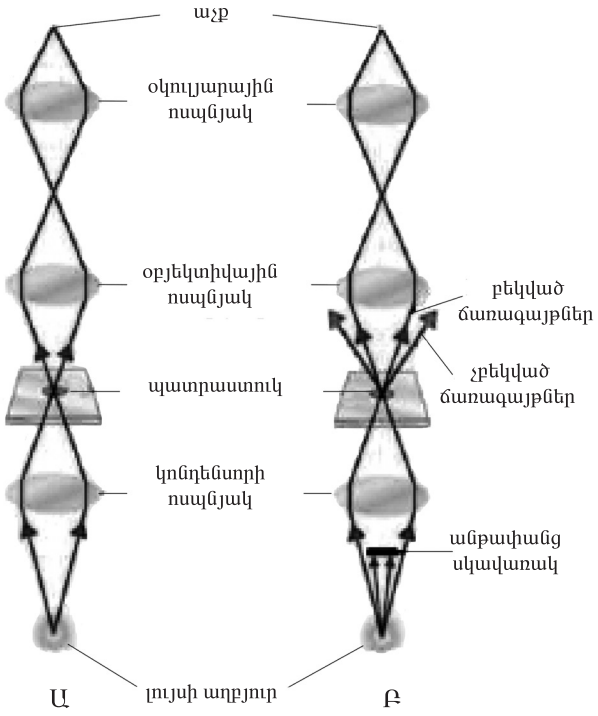
Աշխատելիս ոսպնյակները պաշպանում են մեխանիկական վնասվածքներից, հեղուկների, հատկապես թթուների և ռեակտիվների ազդեցությունից:

Մանրադիտակի մեխանիկական մասերի աշխատանքի ընթացքում դժվարությունների դեպքում ուժ չպետք է գործադրել: Անհրաժեշտ է պարզել անսարքության պատճառը և վերացնել այն:

Աշխատանքն ավարտելուց հետո սրբում են մանրադիտակի բոլոր մասերը, այն ծածկում պոլիէթիլենային պարկով և դնում պահարանի մեջ: Մանրադիտակը տեղափոխում են երկու ձեռքով. մեկով բռնում են փողակապահիչը, մյուսով՝ տակդիրը:

Մանրադիտակային հետազոտումը մութ տեսադաշտում

Նուրբ կառուցվածքները կենդանի վիճակում դիտելիս հաճախ չեն երևում լուսավոր տեսադաշտում: Այդ պատճառով հաճախ կենդանի պատրաստուկները լուսավորվում են լույսի թեք ճառագայթներով մութ տեսադաշտում: Այդ ճառագայթները չեն ընկնում օբյեկտիվի մեջ, ուստի տեսադաշտը երևում է մութ: Լույսի թեք ճառագայթները, անցնելով պատրաստուկի միջով, զգալի չափով անդրադառնում են բջիջների մակերեսից և, շեղվելով իրենց սկզբնական ուղղությունից, ընկնում են օբյեկտիվի մեջ (նկար 24): Այդ դեպքում մութ տեսադաշտում երևում են վառ լուսավորված մանրէների բջիջները: Այդպիսի լուսավորություն կարելի է ստանալ մանրադիտակի սովորական կոնդենսորը փոխարինելով հատուկ կոնդենսորով, որի կենտրոնական հատվածը մթնեցված է, ուստի պատրաստուկի հարթության վրա ընկնում են լույսի ոչ թե կենտրոնական, այլ միայն կողքային ճառագայթները: Մութ տեսադաշտում մանրադիտակմամբ կարելի է հետազոտել բավականին մանր օբյեկտներ, որոնց մեծությունը չափվում է միկրոմետրի հարյուրավոր մասերով: Սակայն մութ տեսադաշտում մանրադիտակմամբ կարելի է տարբերել միայն հետազոտվող օբյեկտների ուրվագծերը, իսկ օբյեկտի ներքին կառուցվածքի ուսումնասիրության հնարավորությունը բացառվում է:



Նկար 24. Լույսի ալիքի ուղին:
Ա) Լուսավոր դեսաղաշրում մանրադիտակելիս, Բ) Մութ դեսաղաշրում մանրադիտակելիս:

Մանրադիտակում փուլացայտերանգային հարմարանքի օգնությամբ

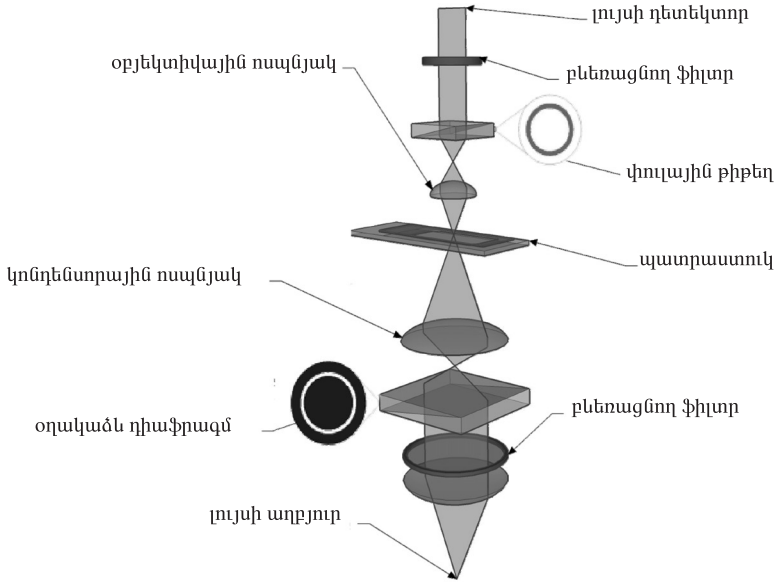
Փուլացայտերանգային մանրադիտակման էությունը թափանցիկ օբյեկտների միջով անցնելիս լույսի ճառագայթների փուլային տարբերությունների փոխակերպումն է ամպլիտուդայինի, որի հետևանքով օբյեկտները դառնում է ավելի ցայտուն տեսանելի: Մարդու աչքն ընկալում է լույսի ալիքի երկարության և դրա ամպլիտուդի տարբերությունները (այսինքն՝ գույնի և լույսի ուժգնության տարբերությունները), սակայն ունակ չէ տարբերակելու լույսի ալիքի փուլի տեղաշարժը: Մանրէների չներկված բջիջները լավ տեսանելի են սովորական լուսային մանրադիտակով միայն այն դեպքում, երբ

դրանց միջով անցնող լույսի էներգիայի զգալի մասը կլանվում է: Այդ դեպքում օբյեկտից (մանրէային բջջից) դուրս եկող լուսային ալիքը ունի ավելի փոքր ամպլիտուդ, հետևաբար բջիջներն ընկալվում են հետազոտողի աչքով ավելի մուգ, քան միջավայրը: Սակայն բազմաթիվ մանրէներ, որոնց չափսերն ընկած են մանրադիտակի լուծող ունակության սահմաններում, քիչ են տարբերվում միջավայրից իրենց թափանցելիությամբ: Այդ մանրէներով անցնող լուսային ճառագայթի ամպլիտուդը գրեթե չի փոփոխվում, այդ պատճառով օբյեկտները վատ են տարբերակվում կամ նույնիսկ տեսանելի չեն լուսային մանրադիտակում:

Փուլացայտերանգային հարմարանքի կիրառումը թույլ չի տալիս մեծացնել մանրադիտակի լուծող ունակությունը, բայց թույլ է տալիս ավելի հստակ տեսնել թափանցիկ օբյեկտները և տարբերակել խոշոր բջիջների որոշ կառուցվածքներ:

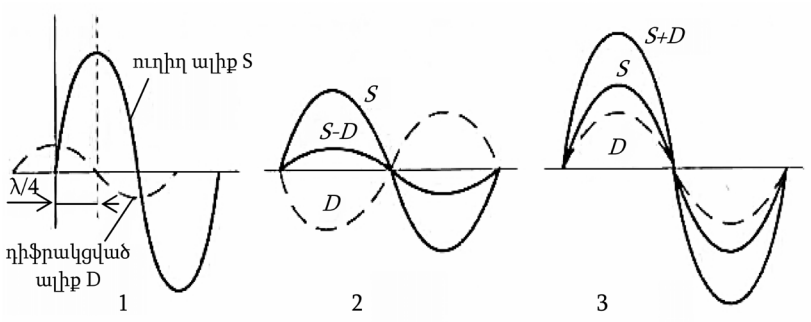
Փուլացայտերանգային մանրադիտակի օպտիկական համակարգը կազմված է փուլային թիթեղից և օղակաձև դիաֆրագմից: Փուլային թիթեղը գտնվում է օբյեկտիվի հետին կիզակետային հարթության վրա և իրենից ներկայացնում է մետաղյա օղակով թափանցիկ սկավառակ: Օղակաձև դիաֆրագմը գտնվում է կոնդենսորի տակ և իրենից ներկայացնում է օղակաձև թափանցիկ ճեղքով ոչ թափանցիկ թիթեղ (նկար 25):

Լույսի ալիքն անցնելով մանրէների բջիջների միջով՝ ուղիղ ճառագայթների համեմատությամբ ետ է մնում ըստ փուլի մոտավորապես 1/4 λ-ով: Մանրադիտակի օբյեկտիվում այդ երկու ալիքները ենթարկվում են ինտերֆերենցիայի: Առաջացած ալիքն ունի ուղիղ ալիքի երկարությունը և ամպլիտուդան, բայց որոշ չափով տարբերվում է դրանից իր փուլով: Այս տարբերությունը բավարար չէ, որպեսզի ինչ-որ մասնիկ տեսնել սովորական մանրադիտակում: Փուլերի տարբերությունն ամպլիտուդայինի փոխակերպման համար կիրառվում է փուլային թիթեղը, որը լրացուցիչ տեղաշարժում է դիֆրակցիայի ենթարկված ճառագայթը 1/4 λ-ով:



Նկար 25. Լույսի ալիքի ուղիղ փուլացայտերանգային հարմարանքով մանրադիտակելիս:

Փուլային էֆեկտը ստեղծվում է պատրաստուկի միջով անցնելիս չշեղված ուղիղ ճառագայթների և եզրային դիֆրակցիայի ենթարկված ճառագայթների ինտերֆերենցիայի հետևանքով: Եզրային ճառագայթներն անցնելով օբյեկտի և փուլային թիթեղի միջով կամ փուլով համընկնում են ուղիղ ճառագայթների հետ, կամ տեղաշարժվում են ուղիղ ճառագայթների նկատմամբ 1/2 λ-ով, այսինքն՝ գտնվում են հակափուլում: Առաջին դեպքում երկու ալիքները գումարվում են և օբյեկտը դառնում է ավելի լուսավոր, քան միջավայրը: Դա լուսավոր նեգատիվ ցայտերանգն է: Այդ սկզբունքով է աշխատում անոպտրային մանրադիտակը: Երկրորդ դեպքում դիֆրակցիոն ալիքը հանվում է ուղիղ ալիքից և օբյեկտը դառնում է ավելի մուգ: Դա մուգ պոզիտիվ ցայտերանգն է (նկար 26): Բացի դրանից, օղակաձև դիաֆրագմը նվազեցնում է կենտրոնական լույսի փնջի ուժգնությունը, որի հետևանքով նույնպես ուժեղանում է ցայտերանգը:



Նկար 26. Ճառագայթների ինտերֆերենցիան և ցայտերանգի ստեղծումը փուլացայտերանգային հարմարանքում:

1. Փուլերի շեղումը դիֆրակցված (D) և ուղիղ (S) ալիքների միջև, 2. Մուր պոզիտիվ ցայտերանգ, 3. Լուսային նեգատիվ ցայտերանգ:

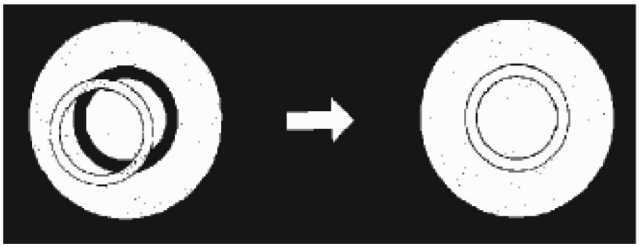
Լայն կիրառություն է գտել КФ-5У4.2 փուլացայտերանգային հարմարանքը, որը նախատեսվում է պոզիտիվ ցայտերանգ ստեղծելու համար: КФ-5У4.2 փուլացայտերանգային հարմարանքը կազմված է օժանդակ օկուլյարից, հատուկ փուլային օբյեկտիվներից և կոնդենսորից, որը պարունակում է դիաֆրագմների հավաք, որոնցից յուրաքանչյուրը համապատասխանում է որոշակի օբյեկտիվի փուլային թիթեղին: Օղակաձև դիաֆրագմները գտնվում են կոնդենսորի տակ տեղադրված պտտուն սկավառակում: Սկավառակը պտտելիս դրանք հեշտությամբ փոխվում են, ընդ որում, սկավառակի կափարիչի պատուհանում հայտնվում է թիվ, որը համապատասխանում է կիրառվող օբյեկտիվի խոշորացմանը: Բացի դրանից, պտտուն սկավառակում կա ազատ ճեղք կամ զրոյական դիաֆրագմ սովորական եղանակով դիտելու համար: Կոնդենսորի երկու պտուտակների օգնությամբ կարելի է օղակաձև դիաֆրագմը կենտրոնացնել օբյեկտիվի փուլային օղակի նկատմամբ: Բոլոր փուլային օբյեկտիվների վրա նշված են КФ տառերը (նկար 27):

Նկար 27. Փուլացայտերանգային հարմարանքի օպտիկական համակարգը:

Մանրէների կենդանի վիճակում հետազոտումը փուլացայտերանգային հարմարանքի օգնությամբ կատարվում է ստորև թվարկված հաջորդականությամբ:

- Լուսային մանրադիտակի սովորական կոնդենսորի փոխարեն տեղադրել փուլացայտերանգային կոնդենսորը: Կոնդենսորի պտտուն սկավառակը պտտել այնպես, որպեսզի պատուհանում հայտնվի 0 նիշը: Կոնդենսորի իրիսային դիաֆրագմը այդ դեպքում պետք է լինի ամբողջովին բաց:
- Մանրադիտակի օբյեկտիվները, փոխարինել փուլային օբյեկտիվներով, օրինակ՝ 40× խոշորացնող սովորական օբյեկտիվի փոխարեն տեղադրել 40× խոշորացնող փուլային օբյեկտիվը:
- Առարկայական սեղանիկի վրա տեղավորել կենդանի պատրաստուկը և կարգավորել մանրադիտակի լուսավորությունը:
- Սովորական օկուլյարը փոխարինել օժանդակ օկուլյարով և կոպիտ նշանառման պտուտակի օգնությամբ ստանալ օբյեկտիվի փուլային սկավառակի հստակ կիզակետումը. այն ունի մուգ օղակի ձև:
- Կոնդենսորի պտտուն սկավառակը պտտելով՝ հարմարեցնել 40× խոշորացնող օղակաձև դիաֆրագմով: Այս դեպքում մանրադիտակում արդեն երևում է ոչ միայն փուլային, այլ լուսավոր օղակը՝ դիաֆրագմի ճեղքը:

- Կոնդենսորի կենտրոնացնող պտուտակների միջոցով օղակաձև դիաֆրագմը տեղաշարժել այնպես, որպեսզի այն համընկնի փուլային օղակի հետ (նկար 28): Եթե փուլային թիթեղի մուգ օղակի լայնությունը մեծ է լուսավոր օղակի լայնությունից, ապա անհրաժեշտ է պտուտակների օգնությամբ կենտրոնացնել այդ օղակներն այնպես, որպեսզի լուսավոր օղակը գտնվի մուգ օղակի մեջ:
- Օժանդակ օկուլյարը փոխարինել սովորականով և կիզակետել պատրաստուկը:



Ա Բ

Նկար 28. Օղակաձև դիաֆրագմի և փուլային թիթեղիկի կենտրոնացումը:
Ա) Սխալ տեղադրվածություն, Բ) Ճիշտ տեղադրվածություն

- Այլ օբյեկտիվների հետ աշխատելիս հարմարեցնել համապատասխան օղակաձև դիաֆրագմները և յուրաքանչյուր անգամ ստուգել օղակների կենտրոնացումը օժանդակ օկուլյարի օգնությամբ:

Լուսարձակային մանրադիտակում

Լուսարձակային մանրադիտակի աշխատանքը հիմնված է լուսային ճառագայթներով ազդելիս կենսաբանական ծագմամբ բազմաթիվ նյութերի և ներկանյութերի լուսարձակման ունակության վրա: Լուսարձակման ունակ նյութերի մոլեկուլները կլանում են ընկնող լույսի էներգիան և անցնում գրգռված վիճակի, որը բնութագրվում է ավելի բարձր էներգիական մակարդակով: Գրգռված վիճակում մոլեկուլները գտնվում են կարճատև ժամանակահատվածում, որից հետո կրկին վերադառնում են ելակետային էներգիական մակարդակին: Այդ անցումը ուղեկցվում է լույսի ձևով էներգիայի ավելցուկի հետարձակմամբ, որն անվանում են լուսարձակում (լյումինեսցեն-

ցիա): Որպես կանոն լուսարձակման համար օբյեկտը լուսավորվում է 300-400 նմ երկարություն ունեցող ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով կամ 400-460 նմ երկարություն ունեցող կապտամանուշակագույն ճառագայթներով:

Կենսաբանական ծագման մի շարք նյութեր, օրինակ՝ քլորոֆիլները, վիտամին B_2-ը, ալկալոիդները, կարոտինոիդները, պորֆիրինները, կոֆակտորները, որոշ հակաբիոտիկներ և այլ միացություններ օժտված են լուսարձակման ունակությամբ: Կախված բջջում այդ նյութերի քանակից, որոշ մանրէներին, օրինակ՝ կանաչ ջրիմուռներին և մեթանածին արքեաներին, հատուկ է առաջնային լուսարձակումը: Սակայն մանրէների մեծ մասի բջիջները թույլ են լուսարձակում, ուստի դրանց մշակում են լուսարձակող ներկերով՝ ֆլուորոքրոմներով: Օբյեկտի լուսարձակումը ֆլուորոքրոմներով մշակումից հետո կոչվում է երկրորդային:

Ֆլուորոքրոմներից են՝ պրիմուլինը, ակրիդին օրանժը, բերբերին սուլֆատը, աուրոֆոսֆինը և այլ ներկեր: Կիրառում են ֆլուորոքրոմների 1:500 մինչև 1:100000 նոսրացված ջրային լուծույթները, որոնք թունավոր չեն կենդանի բջջի համար: Ֆլուորոքրոմները ներկում են մանրէների բջիջները, բայց և ընտրողաբար կուտակվում են բջջային որոշակի կառուցվածքներում՝ առաջացնելով դրանց լուսարձակումը: Կախված քիմիական կազմից՝ բջջային կառուցվածքները տարբեր չափով են կլանում ֆլուորոքրոմները, հետևաբար, լուսարձակում են տարբեր գույներով: Կենդանի և մեռած բջիջները միանման չեն կլանում ֆլոորոքրոմները:

Լուսարձակային մանրադիտակման դեպքում մեծանում է պատկերի ցայտերանգը, որը հնարավորություն է տալիս տարբերելու առանձին բջջային կառուցվածքները և նույնիսկ նկատելու դրանց փոփոխությունները բջջի տարբեր գործառութային վիճակներում: Այս մանրադիտակումը լայնորեն կիրառվում է բջջաբանական հետազոտություններում, հողերում, տիղմում, բույսերի ռիզոսֆերայում մանրէների կենդանի և մահացած բջիջների հայտնաբերման և ուսումնասիրման համար:

Տեսանելի լույսի կապտամանուշակագույն ճառագայթներում լուսարձակումը կարելի է դիտել սովորական մանրադիտակի օգնությամբ կապույտ ապակյա կամ հեղուկ լուսաֆիլտրի կիրառմամբ: Կապույտ ճառագայթները, որոնք խանգարում են լուսարձակման հայտնաբերմանը, կարելի է հեռացնել՝ մանրադիտակի օկուլյարի վրա տեղադրելով դեղին լուսաֆիլտր: Արդյունքում մութ ֆոնի վրա

երևում են լուսարձակող օբյեկտները:

Մանրէաբանական հետազոտություններում առավել կիրառական են լուսարձակային մանրադիտակները, որոնցում լուսարձակումը գրգռվում է ուլտրամանուշակագույն և կապտամանուշակագույն ճառագայթներով:

Կոնֆոկալ լազերային սքանավորող մանրադիտակում

Կոնֆոկալ (համակիզակետող) լազերային սքանավորող մանրադիտակումը (ԿԼՍՄ) (նկար 29) թույլ է տալիս ուսումնասիրվող օբյեկտները (հյուսվածքները, բուսական, կենդանական և բակտերիական բջիջները) հետազոտել իրենց բնական վիճակում՝ չենթարկելով ջրազրկման: Այս մանրադիտակն անփոխարինելի է կենսաթաղանթների, բույսերի մակերևույթի և հողային մասնիկների վրա բակտերիաների և սնկերի տարածական տեղաբաշխվածության ուսումնասիրության համար, ինչպես նաև այնպիսի մանրադիտակային հետազոտություններում, երբ անհրաժեշտ է պահպանել հետազոտվող օբյեկտի ամբողջականությունը:

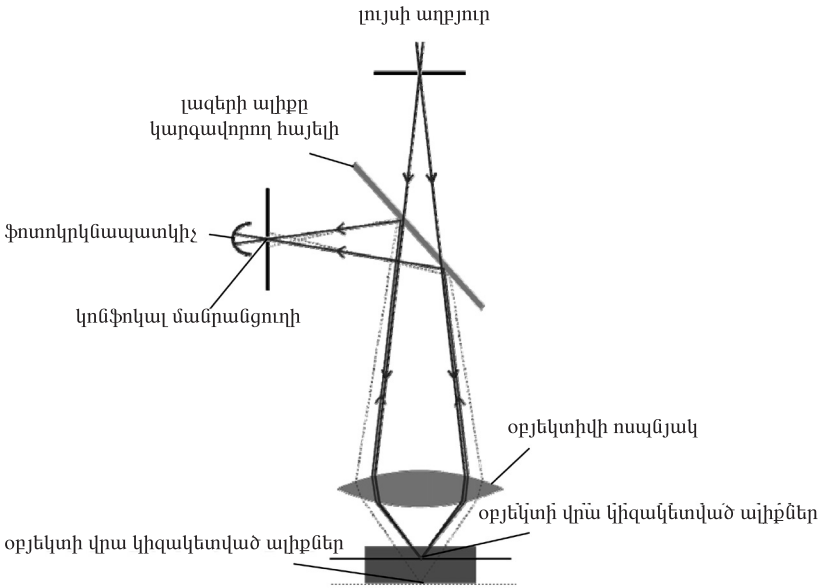
Ի տարբերություն լուսային մանրադիտակի, որում հետազոտվող օբյեկտից բեկվող ամբողջ լույսի փնջի սպեկտրն ընկնում է հետազոտողի աչքի կամ լուսազգաց համակարգի վրա, լազերային սքանավորող մանրադիտակում լազերային ալիքն այդ ալիքը ճեղքող տատանվող հայելու միջոցով անընդհատ և հաջորդաբար, գիծ առ գիծ սքանավորում է հետազոտվող օբյեկտի մակերեսը: Այդ ընթացքում օբյեկտի յուրաքանչյուր հատված, լազերային ալիքից գրգռվելով, լուսարձակում է և գրանցվում ալիքաչափով: Օգտագործվում է արգոնակրիպտոնային իոնային լազերներ, որոնք ապահովում են 488-512 նմ երկարությամբ ալիքներ, ինչպես նաև այլ իներտ գազերի հիմքով լազերներ՝ հելիումանեոնային (543 նմ), արգոնային (351-363 նմ): Գազի տեսակի, կամ խառնուրդի և լազերի էներգիական ուժգնության փոփոխությամբ կարելի է ստանալ գրգռող լույսի անհրաժեշտ երկարությունը: Ցանկացած դեպքում ֆոտոկրկնապատկիչի վրա ընկնում են միայն այն ալիքները, որոնք կիզակետված են եղել օբյեկտի վրա: Մնացած ալիքները հեռացվում են կոնֆոկալ մանրանցուղիներով: Ալիքի մեկանգամյա անցման դեպքում ձևավորվում է օբյեկտի միայն մեկ հարթ պատկեր: Այդպիսի հարթ պատկերների համադրմամբ ձևավորվում է օբյեկտի եռաչափ պատկերը, ընդ

որում, պատկերը ձևավորվում է միայն օբյեկտի վրա ամբողջությամբ կիզակետված ալիքներից, իսկ մնացած բոլոր ալիքները հեռացվում են:

Նկար 29. Կոնֆոկալ լազերային սքանավորող մանրադիտակ համակարգչային վերլուծությամբ:

Օբյեկտի յուրաքանչյուր հատվածի սքանավորման արագությունը տատանվում է 0.25-ից մինչև 4 վայրկյան: Պատկերն ավելի խոշորացնելու համար կարելի է փոփոխել օբյեկտի կիզակետման հեռավորությունը: Սքանավորման ընթացքում ձևավորվող պատկերը խտանում է կետային ձևով: Հետազոտման արդյունքները թվայնացվում են և գրանցվում համակարգչով, որը հնարավորություն է տալիս ստացված տվյալները ենթարկել մաթեմատիկական վերլուծության և վերծանել օբյեկտի եռաչափ կառուցվածքը:

ԿԼՍՄ հիմնական բաղադրամասերն են՝ մանրադիտակը, մեկ կամ մի քանի լազերներ, սքանավորող գլխիկը և ֆոտոկրկնապատկիչը: ԿԼՍՄ-ի գծապատկերը բերված է նկար 30-ում: ԿԼՍՄ-ով հնարավոր է նաև ստանալ օբյեկտի գունավոր պատկերը:



Նկար 30. Լազերային ալիքի ուղին ԿԼՍՄ-ով մանրադիտակելիս:

Մանրէների ուսումնասիրությունը լուսային մանրադիտակմամբ

Մանրէների բջիջների ձևաբանական առանձնահատկությունները կարելի է ուսումնասիրել մանրադիտակման տարբեր մեթոդների, այդ թվում՝ տարբերակիչ ներկման որոշ մեթոդների կիրառմամբ: Մանրադիտակային վերլուծության և ներկման եղանակի ընտրությունը որոշվում է հետազոտման նպատակով: Սակայն, գոյություն ունեն մի շարք սկզբունքներ, որոնք ընկած են բակտերիաների ձևաբանության և բջջաբանության ուսումնասիրման հատուկ մեթոդների, օրինակ՝ պատրաստուկների պատրաստման, ֆիքսման և ներկման մեթոդների հիմքում:

Պատրաստուկները, որպես կանոն, պատրաստում են առարկայական ապակիների վրա, որոնց հաստությունը չպետք է գերազանցի 1.2-1.4 մմ-ը: Ավելի հաստ ապակիները թույլ չեն տալիս լուսավորող հարմարանքի դիաֆրագմի եզրերից պատրաստուկի հարթությունում ստանալ հստակ պատկեր, քանի որ այն հայտնվում է ապակու

հաստության մեջ, իսկ դա խախտում է կոնդենսորի կիզակետումը և կտրուկ իջեցնում է պատկերի հստակությունը: Հաստ առարկայական ապակիների օգտագործումն անթույլատրելի է իմերսիոն օբյեկտիվով աշխատանքի դեպքում, երբ անհրաժեշտ է ամբողջությամբ օգտագործել համակարգի թվային ապերտուրան:

Էական նշանակություն ունի առարկայական ապակիների մակերեսների նախապատրաստումը, ինչը հատկապես կարևոր է ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստման ընթացքում: Ապակու մակերեսը պետք է մանրակրկիտ մաքրված և ճարպազրկված լինի, որպեսզի հեղուկի կաթիլը հավասարաչափ տարածվի ապակու վրա, ոչ թե հավաքվի փքված, դանդաղ չորացող կաթիլներով: Ճարպազրկման առավել ապահով միջոց է ապակիների մշակումը քրոմային խառնուրդով՝ ջրով և էթանոլով հաջորդաբար ողողմամբ: Առօրյա աշխատանքներում, սակայն, բավարար է լինում ապակիների օճառով լվացումը, որից հետո չորացվում է մաքուր անձեռոցիկով: Լավ ճարպազրկման կարելի է հասնել լվացված և չորացված ապակիները եթերով թրջված բամբակով (դրանից հետո ջրով լվացում անհրաժեշտ չէ) մաքրմամբ կամ ապակիների մակերեսը գազայրոցի բոցում (այդ դեպքում ճարպն այրվում է) ջերմամշակմամբ: Արգելվում է ապակիները եռացնել և երկարատև պահպանել ալկալիների լուծույթներում, այդ թվում՝ լվացող միջոցների լուծույթներում, քանի որ ալկալիները քայքայում են ապակին՝ դրա մակերեսը դարձնելով անհարթ: Մաքուր ճարպազրկված ապակիները կարելի է պահել չոր վիճակում կամ էթանոլում:

Մանրէների պատրաստուկների պատրաստման համար կիրառվող ծածկապակիները ևս պետք է լինեն մանրակրկիտ լվացված և չորացված: Ծածկապակիների հաստությունը չպետք է գերազանցի 0.15-0.17 մմ-ը: Ավելի հաստ ապակիները կտրուկ վատացնում են ստացված պատկերի հստակությունը:

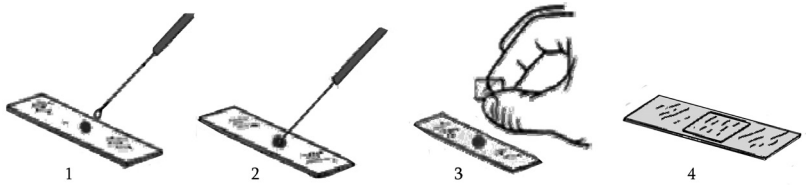
Տարբերում են մանրէների կենդանի (կամ ժամանակավոր) և ֆիքսված (կամ մշտական) մանրադիտակային պատրաստուկներ:

Մանրէների կենդանի պատրաստուկներ

Մանրէների կենդանի բջիջների ուսումնասիրման համար կիրառում են ճզմված կաթիլի, կախ կաթիլի, մատնահետքերի, միկրոկուլտուրա (ագարային թաղանթների) մեթոդներով պատրաստ-

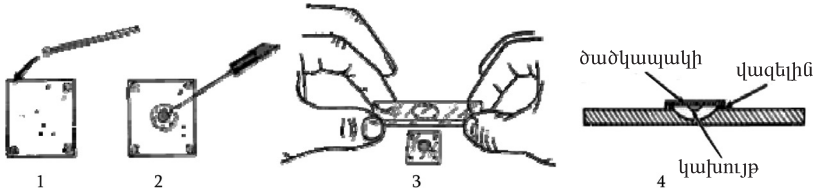
ված պատրաստուկները: Կենդանի բջիջների պատրաստուկները դիտարկում են մանրադիտակի չոր համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ: Պատրաստուկները մանրադիտակումից հետո նախ պետք է ընկղմել մանրէազերծող լուծույթի մեջ, ապա լվանալ:

Պատրաստուկ պատրաստված ճզմված կաթիլի մեթոդով: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցվում է ֆիլտրմամբ մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, որում տեղադրում են հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, խառնում և ծածկում են ծածկապակիով (նկար 31): Պինդ և հեղուկ սննդամիջավայրերում աճեցված մանրէային բջիջները ջրի կաթիլի մեջ տեղափոխում են մանրէաբանական օղակով: Հեղուկ սննդամիջավայրում աճեցված մանրէային բջիջները կարելի է տեղափոխել նաև մանրէազերծ պիպետով: Վերջին դեպքում առարկայական ապակու վրա ջրի կաթիլ կարելի է չդնել: Հետազոտվող կաթիլը պետք է այնքան փոքր լինի, որպեսզի ծածկապակիով ծածկելուց հետո հեղուկի ավելցուկ չառաջանա: Եթե այն գոյացել է, ապա անհրաժեշտ է հեռացնել ֆիլտրի թղթով: Երկարատև հետազոտման դեպքում պատրաստուկի չորացումը կանխելու նպատակով ծածկապակու եզրերը կարելի է լաքապատել:



Նկար 31. Պատրաստուկի պատրաստումը ճզմված կաթիլի մեթոդով:
1. Առարկայական ապակու վրա կաթեցված մանրէազերծված ջրի կաթիլի մեջ մանրէաբանական օղակով մանրէի կենսազանգվածի տեղադրում, 2. Կախույթի սրացում, 3. Կախույթի ծածկում ծածկապակիով, 4. Պատրաստի պատրաստուկ:

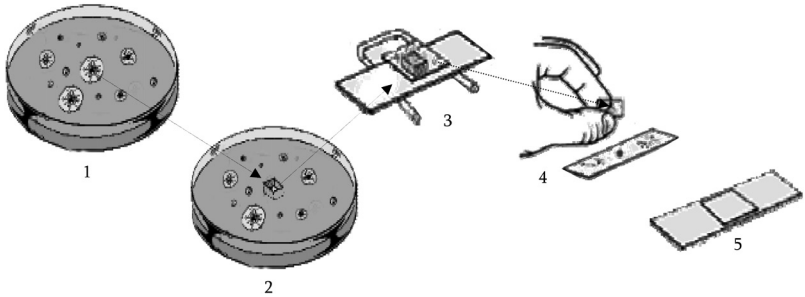
Պատրաստուկ պատրաստված կախ կաթիլի մեթոդով: Մանրէային կախույթի կաթիլը մանրէաբանական օղակով կաթեցնում են ծածկապակու վրա, որը զգուշությամբ տեղադրում են կենտրոնում փոսիկ ունեցող հատուկ առարկայական ապակու վրա և շրջում այնպես, որպեսզի կաթիլը ազատ կախվի ծածկապակուց՝ չհպվելով փոսիկի եզրերին և հատակին (նկար 32):



Նկար 32. Պատրաստուկի պատրաստումը կախ կաթիլի մեթոդով:
1. Ծածկապակու ծայրերի վազելինապատում, 2. Մանրէաբանական օղակով մանրէի կենսազանգվածի տեղադրում ծածկապակու կենտրոնում և կախույթի ստացում, 3. Փոսիկով առարկայական ապակու տեղադրում ծածկապակու վրա, 4. Պատրաստի պատրաստուկ:

Փոսիկի եզրերին նախապես քսում են վազելին, ինչը հնարավոր է դարձնում պատրաստուկի երկարատև ուսումնասիրությունը: Ավելի երկարատև ուսումնասիրությունների համար օգտագործում են մանրէազերծ ապակիներ, իսկ մանրէների կախույթը պատրաստում են հեղուկ սննդամիջավայրում: Բակտերիաների հետ աշխատանքում այս մեթոդը հազվադեպ է կիրառվում:

Պատրաստուկ պատրաստված մատնահետքերի մեթոդով: Մանրէների հոծ շերտով կամ առանձին գաղութների ձևով աճեցված ագարային սննդամիջավայրից նշտարով կտրում են ոչ մեծ խորանարդիկ և տեղափոխում առարկայական ապակու վրա այնպես, որպեսզի մանրէներով մակերեսը ուղղված լինի դեպի վեր: Այնուհետև մանրէային գաղութին հպում են մաքուր ծածկապակի, թեթև սեղմում են օղակով կամ ունելիով և անմիջապես հեռացնում (նկար 33):



Նկար 33. Պատրաստուկի պատրաստումը մատնահետքի մեթոդով:
1-2. Ագարային սննդամիջավայրի մակերեսից մանրէի գաղութով ագարային խորանարդիկի կտրում, 3. Ագարային խորանարդիկն առարկայական ապակու վրա ծածկված ծածկապակիով, 4. Ծածկապակու հեռացում և տեղադրում առարկայական ապակու վրա, 5. Պատրաստի պատրաստուկ:

Մատնահետքով ծածկապակին տեղադրում են ջրի կամ ներկանյութի, օրինակ՝ մեթիլենային կապույտի (1:40) կաթիլ պարունակող առարկայական ապակու վրա այնպես, որպեսզի ստացված մատնահետքն ընկղմվի կաթիլի մեջ: Մատնահետքը կարելի է ստանալ նաև առարկայական ապակու վրա՝ առարկայական ապակին հպելով գաղութի կամ գազոնի մակերեսին: Պատրաստուկ մատնահետքն օգտագործում են հիմնականում ստրեպտոմիցետների սպորագոյացումն ուսումնասիրելու համար:

Պատրաստուկ պատրաստված միկրոկուլտուրայի մեթոդով: Մանրէազերծված և տաքացված առարկայական ապակու վրա մանրէազերծ տաքացված պիպետով լցնում են տաք ագարային սննդամիջավայրի 0.2-0.3 մլ և բաշխում այն ապակու ամբողջ մակերեսով: Սննդամիջավայրի սառելուց հետո օղակով հեռացնում են ավելորդ ագար-ագարը՝ թողնելով թաղանթի երկու բարակ ծածկապակու մեծությամբ տեղամասեր: Քառակուսիների կենտրոնում մանրէաբանական օղակով կամ պիպետով կաթեցնում են մանրէների բջիջների հեղուկ կուլտուրայի կամ կախույթի կաթիլ: Ապակին նախ տեղադրում են խոնավ խցիկ (թաց ֆիլտրի թղթի շերտով Պետրիի թաս), ապա՝ ջերմապահարան: Մանրադիտակումից առաջ աճած միկրոկուլտուրայի թաղանթի վրա կաթեցնում են ներկի կաթիլ, կամ թաղանթի չորացման դեպքում՝ ջրի կաթիլ, այնուհետև զգուշորեն ծածկում ծածկապակիով:

Մանրէների աճեցումն անմիջապես առարկայական ապակու վրա թույլ է տալիս իրականացնել դրանց աճի և զարգացման գործընթացների մանրադիտակային հետազոտություն, ուսումնասիրել զարգացման կենսաշրջանը, բազմացման տիպը (բաժանում, բողբոջում), այդ գործընթացների վրա տարբեր գործոնների ազդեցությունը: Միկրոգաղութի աճեցումը կարելի է իրականացնել աերոբ կամ անաերոբ (լաքով հերմետիկացված ծածկապակու տակ) պայմաններում:

Ագարային շերտը կարելի է տեղադրել ծածկապակու վրա և պատրաստել կախ կաթիլ պատրաստուկը: Այդպիսի պատրաստուկները թույլ են տալիս ուսումնասիրել բակտերիաների շարժումը:

Մանրէների ֆիքսված պատրաստուկներ

Ֆիքսված պատրաստուկների ստացումը ներառում է քսուկի պատրաստումը, չորացումը, ֆիքսումը և ներկումը:

Քսուկի պատրաստման համար ճարպազրկված առարկայական ապակու վրա տեղադրում են մանրէազերծ ծորակային ջրի կաթիլ, այնուհետև մանրէաբանական օղակով դրանում պատրաստում են հետազոտվող մանրէի կախույթը, ինչպես ճզմված կաթիլի մեթոդով պատրաստուկի պատրաստման դեպքում: Ստացված կախույթն օղակով հավասարաչափ և բարակ շերտով տարածում են 1-2 սմ^2 մակերեսով:

Քսուկը չորացնում են սենյակային ջերմաստիճանում: Եթե չորացումը դանդաղ է ընթանում, պատրաստուկը կարելի է թեթև տաքացնել տաք օդի հոսքում գազայրոցի բոցի վրա՝ պահելով ապակին քսուկով դեպի վեր կամ տեղադրելով հատուկ չորացնող հարմարանքների վրա (նկար 34): Այս գործողությունը պետք է իրականացնել զգույշ՝ խուսափելով գերտաքացումից, այլապես մանրէների բջիջները կարող են ձևախախտվել:

Նկար 34. Առարկայական ապակու վրա պատրաստված քսուկը չորացնող հարմարանքներ:

Պատրաստուկի ֆիքսումը մի քանի նպատակ է հետապնդում. սպանել մանրէներին՝ անվտանգ դարձնելով դրանց հետ աշխատանքը, ապահովել բջիջների առավելագույն հպումն ապակուն, դյուրացնել ներկումը, քանի որ մահացած բջիջներն ավելի հեշտ են ներկվում, քան կենդանի բջիջները: Ֆիքսման ամենատարածված մեթոդը ջերմային մշակումն է: Դրա համար պատրաստուկը սովորաբար երեք անգամ անց են կացնում գազայրոցի բոցի ամենատաք հատվածով՝ պահելով առարկայական ապակին քսուկով դեպի վեր: Քսուկը չպետք է չափից շատ տաքացնել, քանի որ այդ դեպքում տեղի են ունենում բջջային կառուցվածքների և արտաքին տեսքի կոպիտ ձևախախտումներ: Բջջի նուրբ կառուցվածքն ուսումնասիրե-

լու համար ֆիքսումը կատարում են տարբեր քիմիական նյութերով: Ֆիքսող հեղուկը լցնում են քսուկի վրա կամ պատրաստուկը ընկղմում են ֆիքսող լուծույթով բաժակի մեջ:

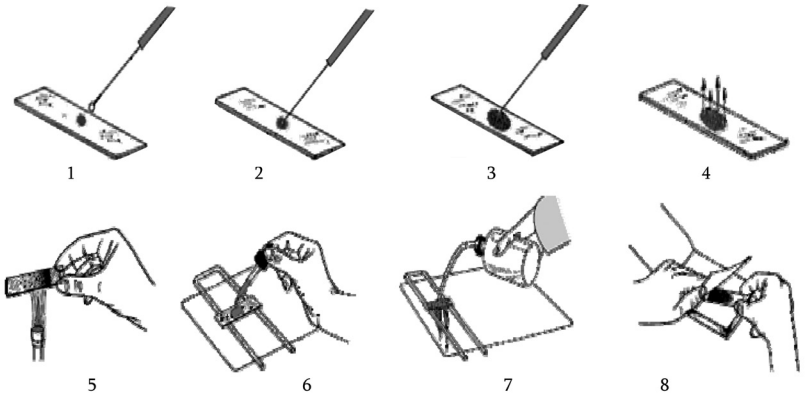
Մանրէային բջիջները ներկում են գլխավորապես անիլինային ներկերով: Տարբերում են թթվային և հիմնային ներկեր: Թթվայինների են դասվում այն ներկերը, որոնց ներկող հատկություններով օժտված է անիոնը, իսկ հիմնային ներկերի քրոմոֆորը կատիոնն է: Թթվային ներկերի օրինակներ են էոզինը, էրիթրոզինը, նիգրոզինը, թթվային ֆուքսինը, դրանք բոլորն էլ ամուր կապվում են բջջի ցիտոպլազմի բաղադրիչների հետ: Հիմնային ներկեր են մեթիլենային կապույտը, հիմնային ֆուքսինը, գենցիանային մանուշակագույնը, բյուրեղային վիոլետը, սաֆրանինը, որոնք ավելի ուժգին կապվում են բջջի կորիզային բաղադրիչների հետ: Բջիջներում ԴՆԹ-ի և ռիբոսոմային ՌՆԹ-ի բարձր կոնցենտրացիան բակտերիաներին ավելի զգայուն է դարձնում հիմնային ներկերի նկատմամբ: Այդ պատճառով մանրէների ֆիքսված պատրաստուկների ներկման համար մեծամասամբ կիրառվում են հիմնային ներկեր:

Տարբերում են մանրէների պարզ և տարբերակիչ ներկման եղանակներ: Առաջին դեպքում ամբողջ բջիջը ներկվում է այնպես, որպեսզի լավ տեսանելի դառնան դրա ձևը և չափսերը, երկրորդ դեպքում ներկվում են բջջի որոշակի կառուցվածքները և պաշարային նյութերը:

Մանրէային բջիջների պարզ ներկման համար առավել հաճախ օգտագործում են ֆուքսին, գենցիանային մանուշակագույն, մեթիլենային կապույտ: Պատրաստուկը ներկում են 1-3 րոպեի ընթացքում: Ներկման ընթացքում քսուկի վրա ներկը չպետք է չորանա, անհրաժեշտության դեպքում պետք է ավելացնել ներկի նոր չափաբաժին (նկար 35):

Ներկումից հետո պատրաստուկը լվանում են ջրով մինչև թափվող կաթիլի անգունանալը: Այնուհետև պատրաստուկը չորացնում են ֆիլտրի թղթով, ներկված քսուկի վրա կաթեցնում իմերսիոն յուղ և մանրադիտակում իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվով: Ավելի մաքուր պատրաստուկներ ստանալու համար ներկը կաթեցվում է ֆիլտրի թղթով ծածկված քսուկի վրա: Ճիշտ ներկված և լավ լվացված պատրաստուկում տեսադաշտը լուսավոր է և մաքուր, ներկված են միայն բջիջները:

Ֆիքսել և ներկել կարելի է նաև պատրաստուկ մատնահետքը: Ֆիքսված և ներկված պատրաստուկները կարելի է երկարատև պահպանել:



Նկար 35. Մանրէների ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստումը:
1. Առարկայական ապակու վրա կաթեցված մանրէազերծված ջրի կաթիլի մեջ մանրէաբանական օղակով մանրէի կենսազանգվածի տեղադրում, 2. Կախույթի ալրացում, 3. Կախույթի տարածում 1-2 սմ² մակերեսով, 4. Պատրաստուկի չորացում, 5. Ֆիքսում, 6. Ներկում, 7. Լվացում, 8. Պատրաստուկի չորացումը ֆիլտրի թղթով:

Բջիջների ձևը և դրանց տեղադրությունը (շղթաներ, ողկույզներ, փաթեթներ, տետրադներ և այլն), որպես կանոն, հայտնաբերում են ճզմված կաթիլի մեթոդով պատրաստված պատրաստուկներում լուսավոր դաշտով սովորական լուսային կամ փուլացայտերանգային մանրադիտակմամբ: Փոքր ձողաձև բակտերիաների, օրինակ՝ *S. marcescens*-ի բջիջների ձևի որոշման համար պատրաստում են ֆիքսված բջիջների պատրաստուկ և կատարում պարզ ներկում: Ելուստներ առաջացնող բակտերիաները (օրինակ՝ *Caulobacter, Labrys, Prosthecomicrobium, Stella* և մի քանի այլ ցեղերի ներկայացուցիչները) նպատակահարմար է հետազոտել մթնեցված դաշտում փուլացայտերանգային մանրադիտակմամբ:

Անհրաժեշտ է հիշել, որ կուլտուրայի տարիքը, սննդամիջավայրի կազմը և կուլտիվացման պայմաններն ազդում են մանրէների ձևաբանության և բջջաբանության վրա:

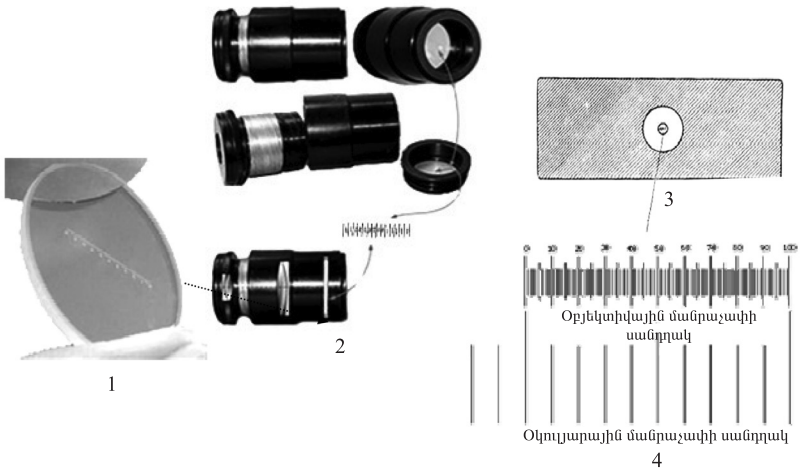
Մանրէների չափերի որոշումը

Մանրէների բջիջների չափերը որոշելու համար մանրադիտակային հետազոտության ընթացքում կիրառվում է օկուլյարային քա-

նոն՝ մանրաչափ կամ օկուլյարային պտուտակային մանրաչափ: Չափագրման համար ցանկալի է օգտագործել կենդանի բջիջներ, քանի որ բջիջների ֆիքսման և ներկման արդյունքում դրանց իրական չափսերը կարող են փոխվել: Բջջի չափսերը որոշելու համար օգտագործվում է փուլացայտերանգային հարմարանք: Եթե բջիջները շարժուն են, ապա պետք է պատրաստուկը թույլ տաքացնել կամ հետազոտվող կախույթի կաթիլին ավելացնել 0.1% ագար-ագարի ջրային լուծույթ: Բջիջների չափսերը արտահայտում են միկրոմետրերով:

Օկուլյարային մանրաչափն իրենից ներկայացնում է կենտրոնում 5 մմ երկարությամբ փորագրված քանոն պարունակող կլոր ապակյա թիթեղ: Քանոնը բաժանված է 50 մասի: Օկուլյարային մանրաչափը տեղադրում են օկուլյարում, որի համար ապապտուտակում են օկուլյարի ակնային ոսպնյակը, ապա դրա դիաֆրագմի վրա տեղադրում են օկուլյարային մանրաչափը սանդղակով դեպի ներքև և ամրացնում ոսպնյակը: Սակայն միայն օկուլյարային մանրաչափի միջոցով հնարավոր չէ չափագրել բջիջները, քանի որ վերջիններս դիտարկվում են օբյեկտիվի և օկուլյարի միջոցով, իսկ քանոնային սանդղակը՝ միայն օկուլյարի վերին ոսպնյակով (նկար 36): Այդ իսկ պատճառով մինչ չափագրումն անհրաժեշտ է որոշել տվյալ մանրադիտակի խոշորացման համար օկուլյարային մանրաչափի բաժանումների արժեքները: Դա իրականացնում են օբյեկտիվային մանրաչափի միջոցով:

Օբյեկտիվային մանրաչափն իրենից ներկայացնում է կենտրոնում շրջանաձև անցքով մետաղական թիթեղիկ: Անցքում տեղադրված է 1 մմ երկարությամբ քանոն պարունակող ապակի: Վերջինս բաժանված է 100 մասի, այսինքն՝ օբյեկտիվային մանրաչափի բաժանումները համապատասխանում են 0.01 մմ-ի: Օկուլյարային մանրաչափի բաժանման արժեքը որոշելու համար նախ օբյեկտիվային մանրաչափը տեղադրում են առարկայական սեղանիկի վրա և կիզակետում փոքր խոշորացման օբյեկտիվի օգնությամբ: Քանոնի պատկերը տեղավորում են դիտարկման հարթության կենտրոնում, որից հետո օբյեկտիվը փոխում են չափագրման համար նախատեսվող օբյեկտիվով: Պտտելով մանրադիտակի առարկայական սեղանիկը և օկուլյարը՝ օկուլյարային և օբյեկտիվային մանրաչափերը տեղադրում են այնպես, որպեսզի դրանց սանդղակները լինեն միմյանց զուգահեռ և վերածածկեն միմյանց:

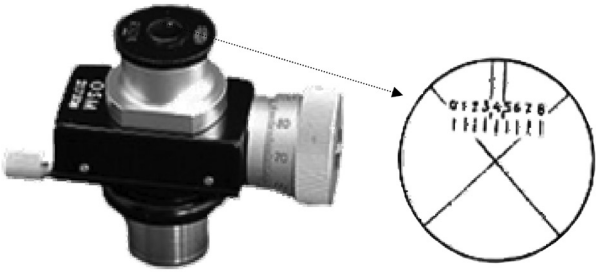


Նկար 36. Օկուլյարային և օբյեկտիվային մանրաչափեր:
1. Օկուլյարային մանրաչափ, 2. Օկուլյարային մանրաչափի տեղադրում օկուլյարում, 3. Օբյեկտիվային մանրաչափ, 4. Օկուլյարային և օբյեկտիվային մանրաչափերի սանդղակների համադրում:

Օկուլյարային մանրաչափի արժեքը որոշում են նոնիուսի սկզբունքով, այսինքն՝ համապատասխանեցնում են օկուլյարի և օբյեկտիվի սանդղակի մի բաժանումը մյուսով և գտնում դրանց հաջորդ համընկնումը: Հաշվարկվում է, թե օբյեկտիվային մանրաչափի քանի բաժանումն է համապատասխանում օկուլյարային մանրաչափի մեկ բաժանմանը: Օրինակ՝ եթե օբյեկտիվային մանրաչափի 2 բաժանումը (20 մկմ) համապատասխանում է օկուլյարային մանրաչափի 5 բաժանումներին, ապա օկուլյարային մանրաչափի մեկ բաժանումը հավասար կլինի 4 մկմ-ի (20:5): Հետևաբար, եթե մանրադիտակի առարկայական սեղանիկի վրա տեղադրենք մանրէային բջիջներով պատրաստուկ և մանրադիտակենք նույն խոշորացմամբ, ապա կարող ենք չափագրել ուսումնասիրվող մանրէային բջջի մեծությունը: Դրա համար որոշում են, թե օկուլյարային քանոնի որքան բաժանումներին է համապատասխանում բջջի չափսը և այդ թիվը բազմապատկում են օկուլյարային մանրաչափի բաժանումների արժեքին:

Բջջի չափսերը որոշելու համար հարմար է օգտագործել նաև օկուլյարային պտուտակային մանրաչափ (նկար 37): Վերջինս ամրացնում են մանրադիտակի փողակին՝ նախապես հեռացնելով օկուլյարը: Օկուլյարային պտուտակային մանրաչափը ունի խոշոր

օբյեկտների չափագրման համար նախատեսված 1 մմ բաժանման արժեքով անշարժ սանդղակ և տրամախաչման նշանով շարժուն ապակյա թիթեղիկ: Թիթեղիկը կապված է մանրաչափային պտուտակային թմբուկի հետ և պտտելիս տեղափոխվում է տրամախաչման նշանի հետ մեկտեղ:



1 2

Նկար 37. Օկուլյարային պտուտակային մանրաչափ (1) և օկուլյարում տրամախաչման նշանը (2):

Բջիջների երկարության որոշման համար մանրաչափային պտուտակային թմբուկի պտտմամբ տրամախաչման նշանը տեղափոխում են այնպես, որպեսզի այն հայտնվի բջջի մի ծայրին, և նշում են թմբուկի բաժանումների արժեքը: Այնուհետև թմբուկը շարունակում են պտտել այնպես, որպեսզի տրամախաչման նշանը հայտնվի բջջի մյուս ծայրին, և նշում են թմբուկի բաժանումների տվյալ արժեքը: Որոշում են, թե բջջի երկարությունը մանրաչափային պտուտակային թմբուկի որ բաժանումներին է համապատասխանում և ստացված թիվը բազմապատկում մանրադիտակի տվյալ խոշորացման դեպքում թմբուկի բաժանումների նախապես որոշված արժեքին:

Յուրաքանչյուր օբյեկտիվի թմբուկի բաժանումների արժեքը որոշում են օբյեկտիվային մանրաչափի միջոցով: Դրա համար տրամախաչման նշանը տեղադրում են օբյեկտիվային մանրաչափի մեկ բաժանման սկզբնամասում և նշում թմբուկի բաժանումը: Այնուհետև, թմբուկը պտտում են այնպես, որպեսզի տրամախաչման նշանը տեղափոխվի օբյեկտիվային մանրաչափի բաժանման վերջը և նշում են թմբուկի բաժանումը: Որոշում են, թե մանրաչափային պտուտակային թմբուկի քանի բաժանումներին է համապատասխանում օբյեկտիվային մանրաչափի մեկ բաժանումը: Դիցուք՝ եթե օբյեկտիվային մանրաչափի մեկ բաժանումը (10 մկմ) համապա-

տասխանում է մանրաչափային պտուտակային թմբուկի X բաժանումներին, ապա թմբուկի մեկ բաժանումը տվյալ խոշորացմամբ մանրադիտակի համար կլինի 10:X (մկմ):

Հավաստի տվյալներ ստանալու համար հարկավոր է չափել առնվազն 20-30 բջիջ: Գնդաձև բջիջների դեպքում որոշվում է տրամագիծը, այլ բջիջների համար՝ երկարությունը և լայնությունը, նշվում են բջջի միջին չափսերը և տատանման սահմանները (նվազագույն և առավելագույն արժեքները):

Էլեկտրոնային տրանսմիսիոն, սքանավորող և սքանավորող զոնդային մանրադիտակում

Ներկայումս հայտնի են էլեկտրոնային մանրադիտակների բազմաթիվ տարատեսակներ, որոնք տարբերվում են գործողության սկզբունքով, լուծող ունակությամբ և աշխատանքային մեծությունների տիրույթով: Մանրէաբանական հետազոտություններում կիրառվում են թափանցող կամ տրանսմիսիոն էլեկտրոնային մանրադիտակներ (ՏԷՄ), որոնք հնարավորություն են տալիս մինչև 100 հազար անգամ մեծացնել հետազոտվող օբյեկտը՝ տեսանելի դարձնելով նուրբ կառուցվածքները և մասնիկները: Լուսային ճառագայթների փոխարեն ՏԷՄ-ում օգտագործվում են էլեկտրոնների փնջեր, որոնք օժտված են ալիքային հատկություններով, ընդ որում, այդպիսի փնջերի էկվիվալենտ երկարությունը (Դե-Բրոյլի ալիքի երկարությունը) մի քանի կարգով փոքր է լուսայինից, ինչը ապահովում է այս տիպի էլեկտրոնային մանրադիտակների ավելի բարձր լուծող ունակությունը: Գործնականում (կենսաբանական օբյեկտների համար) լուծող ունակության մեծությունը ՏԷՄ-ի համար կազմում է 0.5 նմ, ընդ որում, այս սահմանը որոշվում է ոչ թե ՏԷՄ-ի բնութագրերով, այլ գերբարակ կտրվածքների հաստությամբ, որի դեպքում պատկերը բավականին ցայտերանգային է ստացվում: Օպտիմալ պայմաններում (գերբարակ մոնոբյուրեղային շերտերի վրա) ՏԷՄ-ի լուծող ունակությունը հասնում է 0.1 նմ:

Սքանավորող էլեկտրոնային մանրադիտակի (ՍԷՄ) հիմքում ընկած է էլեկտրոնաճառագայթային խողովակի էկրանի վրա հետազոտվող օբյեկտի մակերեսի հաջորդաբար ճառագայթմամբ սքանավորված պատկերի ձևավորման սկզբունքը: Ընդ որում, այս մանրադիտակմամբ միաժամանակ գրանցվում են մի շարք երկրոր-

դային ճառագայթումներ, ինչը ապահովում է բարձր տեղեկատվությունն ու մեծ լուծող ունակությունը, և որի շնորհիվ ուսումնասիրվում են տարբեր օբյեկտների ձևաբանությունը և մակերեսային կառուցվածքները: Շատ կարևոր է մանրէների առանձին բջիջների մակերեսի ռելիեֆի, կամ այդ բջիջները կազմող կառույցների, ինչպես նաև մեծ քանակությամբ մանրէներ պարունակող գաղութների, կոնգլոմերատների, կոնսորցիումների ուսումնասիրությունը: ՍԷՄ-ի առավել կարևոր առանձնահատկությունը կայանում է նաև դրա ցայտուն պատկերվող տարածության խորությունը (կիզակետման խորությունը): Դա ունի հատուկ նշանակություն մանրէների մակերեսային կառույցների և տարածության մեջ մանրէների ձևի ուսումնասիրման համար: ՍԷՄ-ի և ՏԷՄ-ի պատկերները բերված են նկար 38-ում:

ՍԷՄ-ով և ՏԷՄ-ով մանրադիտակման դեպքում օբյեկտը պետք է ֆիքսել, ջրազրկել և չորացնել մակերեսը, քանի որ այն ենթարկվում է խորը վակուումի պայմաններում (10^{-5}մմ սնդիկի սյան) արագացված էլեկտրոններով ուժգին ռմբակոծման: Արագացնող լարվածությունը ՍԷՄ-ի համար ավելի քիչ է (20 կՎ), քան ՏԷՄ-ինը: ՍԷՄ-ի դեպքում օբյեկտի ֆիքսումն ու հետագա մշակումը ընդգրկում է ավելի քիչ փուլեր, քան ՏԷՄ-ինը: ՍԷՄ-ի օգնությամբ կարելի է ստանալ ծավալադիտակային միկրոլուսանկարներ, որոնցով հնարավոր է դառնում հաշվարկել պատկերված մակերեսի երկու կետերի միջև իրական հեռավորությունը, վերծանել առանձին կառուցվածքների տեղաբաշխումը բջջում, ինչպես նաև տարածություն մեջ մանրէային բջիջների տեղաբաշխումը:

Նկար 38. Էլեկտրոնային մանրադիտակներ, ՍԷՄ (ձախից) և (ՏԷՄ) աջից:

Վերջին տարիներին մշակվել է ընդհուպ նանոմետրական լուծող ունակությամբ մեթոդ, որը թույլ է տալիս հետազոտել փայլարի, գրաֆիտի և այլ նյութերից պատրաստված երկէլեկտրիկ հարթակների վրա տեղադրված օբյեկտների մակերեսները ուսումնասիրվող մակերեսի և յուրահատուկ զոնդերի միջև հատուկ (թունելային) հոսանքների առաջացմամբ: Որպես զոնդեր օգտագործվում են պլատինե կամ վոլֆրամե ասեղները: Սքանավորող թունելային, ատոմաուժային և այլ տեսակի զոնդային մանրադիտակման տարբեր եղանակները հիմնված են էլեկտրոնային մանրադիտակումից տարբերվող ֆիզիկական օրինաչափությունների վրա: Սքանավորող զոնդային մանրադիտակման մեթոդները կիրառվում են մակերևույթների ատոմային մակարդակով թույլատրելի սահմաններով տեղագրության համար: Իրենց հնարավորություններով (նանոմետրերից փոքր չափեր) այս մեթոդները համադրելի են միայն ռենտգենակառուցվածքային վերլուծության հետ, սակայն ի տարբերություն վերջինիս, այս դեպքում օբյեկտի բյուրեղացումն անհրաժեշտ չէ: Նմուշները չեն քայքայվում բարձր էներգիայով օժտված էլեկտրոններով, ինչպես ավանդական էլեկտրոնային մանրադիտակման ընթացքում: Նանոմետրային տիրույթում նորագույն հետազոտությունների այս մեթոդները գտել են լայն կիրառություն նյութագիտության բնագավառում մետաղների, կիսահաղորդիչների, պոլիմերների, թաղանթային կառույցների, մոլեկուլային կլաստերների հետազոտության համար՝ նախադրյալ հանդիսանալով նանոտեխնոլոգիաների, այդ թվում՝ նանոկենսաբանության բուռն զարգացման համար: Այս մեթոդների կիրառմամբ կենսաբանական մի շարք օբյեկտների և մոլեկուլների կառուցվածքների, ինչպես նաև որոշ կենսաբանական գործընթացների կինետիկայի վերաբերյալ տվյալներ են ստացվել:

ԳԼՈՒԽ 6 ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՄԱՔՈՒՐ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՍԱՑՈՒՄԸ

Մանրէների ֆիզիոլոգիան, կենսաքիմիական հատկությունները և զարգացման փուլերը, որպես կանոն, ուսումնասիրվում են միայն մաքուր կուլտուրաների ստացումից հետո: Բնության մեջ գոյություն ունեցող մանրէների խառը պոպուլյացիաներից մեկ տեսակին պատկանող մանրէների մեկուսացման հմտությունը և մաքուր կուլտուրաների պահպանումը մանրէների հետ աշխատելու անհրաժեշտ պայման է: Մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը սովորաբար ներառում է երեք փուլ՝ 1. կուտակիչ կուլտուրայի ստացում; 2. մաքուր կուլտուրայի մեկուսացում; 3. մեկուսացված կուլտուրայի մաքրության որոշում:

Կուտակիչ կուլտուրայի ստացում

Մանրէային կուլտուրան, որում գերակշռում են մեկ ֆիզիոլոգիական խմբին կամ նույնիսկ մեկ տեսակին պատկանող մանրէներ, անվանվում է կուտակիչ կուլտուրա: Մանրէաբանական հետազոտություններում կուտակիչ կուլտուրաների ստացման մեթոդն առաջին անգամ օգտագործել են Ս. Ն. Վինոգրադսկին և Մ. Բեյերինկը: Դրա էությունն այնպիսի էլեկտիվ (ընտրողական) սննդամիջավայրի ստեղծումն է, որով ապահովվում է խառը պոպուլյացիայից հետազոտողի համար անհրաժեշտ կամ նպատակային մանրէների կամ մանրէների խմբի զարգացումը:

Էլեկտիվ պայմաններ ստեղծելիս անհրաժեշտ է իմանալ մեկուսացվող մանրէների ֆիզիոլոգիան կամ հստակ պատկերացնել դրանց առանձնահատկությունները: Շատ հաճախ էլեկտիվ պայմաններ ստեղծում են համապատասխան սննդամիջավայրերի ընտրությամբ, քանի որ տարբեր մանրէներ իրենց կենսագործունեության համար պահանջում են տարբեր սուբստրատներ: Օրինակ՝ դիազոտրոֆ մանրէները ունակ են աճելու սննդամիջավայրերում, որոնցում բացակայում են կապված ազոտի միացությունները: Ավտոտրոֆ մանրէների կուտակիչ կուլտուրան ստանում են այնպիսի սննդամիջավայրերում, որոնցում ածխածնի միակ աղբյուրն ածխաթթու

գազն է կամ միաձխածնային այլ միացությունները: Սննդամիջավայրում այլ ածխածնային միացությունների բացակայությունը չի նպաստում հետերոտրոֆների զարգացմանը: Սննդամիջավայրերը, որոնք բավարարում են գլխավորապես մեկ խմբին պատկանող մանրէների պահանջները, կոչվում են ընտրողական (էլեկտիվ), հաճախ կուտակիչ կամ սելեկտիվ սննդամիջավայրեր:

Երբեմն բնական պոպուլյացիաներից մանրէների մեկուսացման համար նախատեսված սննդամիջավայրերում ավելացնում են հակաբիոտիկներ, որոնք օժտված են մենահատուկ ազդեցությամբ և թույլ են տալիս ընտրողաբար ճնշել մանրէների որոշակի խմբերի աճը: Այսպես, գրամբացասական բակտերիաների համար էլեկտիվ պայմաններ կարելի է ստեղծել սննդամիջավայրում ավելացնելով 0.2-ից մինչև 100 մգ/լ պենիցիլին, որի առկայությամբ դանդաղում կամ ընկճվում է գրամդրական մանրէների մեծամասնության զարգացումը: Բակտերիաների աճի համար նպաստավոր պայմաններ ստեղծելու և, ընդհակառակը, միցելային սնկերի աճը ճնշելու համար, սննդամիջավայրում ավելացնում են 0.1-ից մինչև 20 մգ/լ նիստատին, կամ 1-ից մինչև 20 մգ/լ գրիզեոֆուլվին:

Էլեկտիվ պայմանների ստեղծման համար հարկավոր է հաշվի առնել օդավորման, ջերմաստիճանի, սննդամիջավայրի թթվայնության, լուսավորման և այլ պայմանների նկատմամբ մանրէների պահանջը: Այսպես, աերոբ մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացման համար ապահովում են սննդամիջավայրի առավել մեծ մակերեսի շփումը օդի հետ, իսկ անաերոբ մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացման համար՝ ստեղծվում են անաերոբ պայմաններ: Բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում աճեցումը (>50°C) բացառում է մեզոֆիլ մանրէների զարգացումը և ապահովում է թերմոֆիլների աճը: Ընտրողական գործոն կարող են հանդիսանալ նաև տարբեր մանրէների տվյալ ջերմաստիճանային պայմաններում ցուցաբերած աճի տարբեր արագությունները: Օրինակ՝ աճի տարբեր օպտիմալ ջերմաստիճանների արժեքների շնորհիվ, մինիմալ սննդամիջավայրում լուսավորման և 35°C ջերմաստիճանային պայմաններում հաջողվում է գրեթե ամբողջությամբ ճնշել կանաչ ջիրիմուռների աճը և ստանալ ցիանաբակտերիաներով հարստացած կուլտուրա:

Կուտակիչ կուլտուրա ստանալիս հարկավոր է հաշվի առնել նաև որոշ մանրէների էնդոսպորներ առաջացնելու ունակությունը: Սպոր առաջացնող մանրէների կուլտուրայի ստացման համար, որպես կանոն, սննդամիջավայր են ներմուծում նախապես պաստերացված

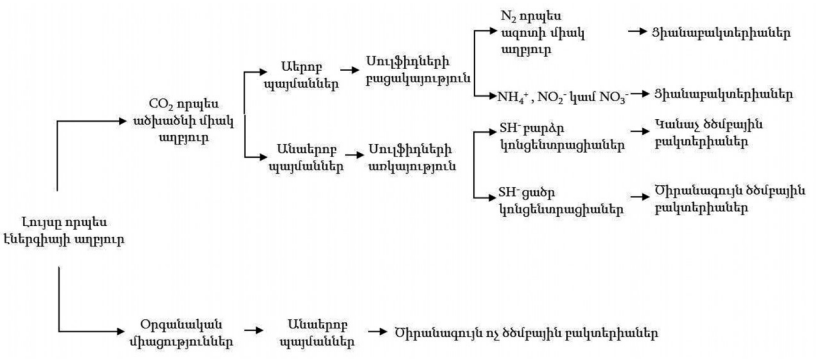
(ջերմամշակում 10 րոպե 75°C կամ 2-5 րոպե 80°C ջերմաստիճանում) բնական սուբստրատը: Այս եղանակով հնարավոր է բացառել սպոր չառաջացնող բակտերիաների զարգացումը:

Հարկ է նշել, որ էլեկտիվ պայմանները ոչ միշտ են բարենպաստ մեկուսացվող մանրէների աճի համար, սակայն դրանք առավել նպաստավոր են վերջիններիս, քան ուղեկցող մանրէների զարգացման համար:

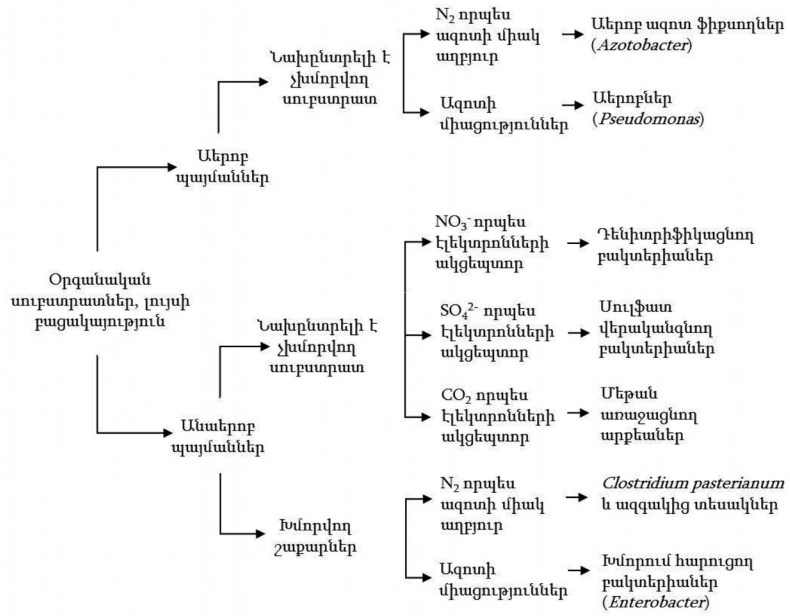
Կուտակիչ կուլտուրայի զարգացումը գնահատում են մեկուսացվող մանրէային կուլտուրային բնորոշ աճի նշանների՝ սննդամիջավայրի պղտորությամբ, գունանյութերի, փառի, նստվածքի կամ գազի առաջացմամբ: Բացի ակնառու փոփոխությունների նկարագրումից, կուտակիչ կուլտուրան մանրադիտակում են: Երբեմն անհրաժեշտ է որոշել նաև մեկուսացվող մանրէին բնորոշ նյութափոխանակության արգասիքների առկայությունը: Օրինակ՝ նիտրիֆիկացնող մանրէների զարգացումը բնորոշվում է սննդամիջավայրում նիտրիտների և նիտրատների առկայությամբ և ամոնիումի իոնների քանակի նվազեցմամբ կամ բացակայությամբ:

Տարբեր տիպի նյութափոխանակությամբ օժտված մանրէների կուտակիչ կուլտուրաների ստացման էլեկտիվ պայմանները ներկայացված են նկար 39-ում:

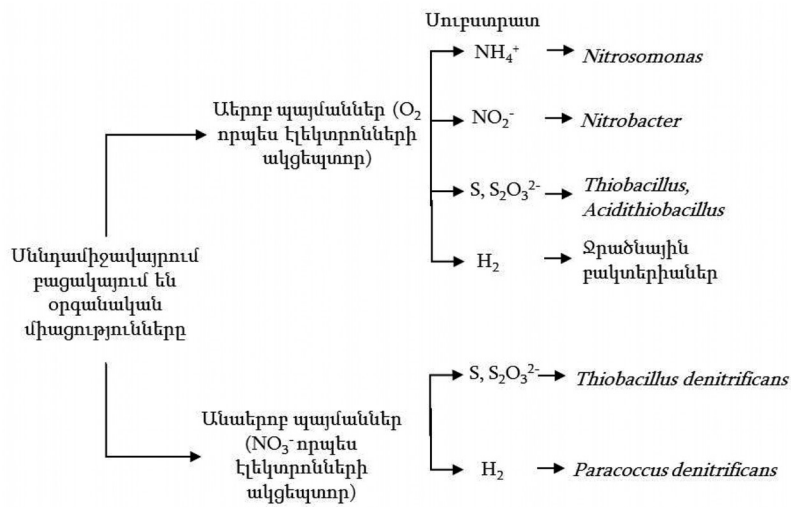
Ֆոտոտրոֆ մանրէներ



Քեմոհետերոտրոֆ մանրէներ



Քեմոլիթոավտոտրոֆ մանրէներ



Նկար 39. Տարբեր տիպի էներգիական փոխանակությամբ օժտված մանրէների կուտակիչ կուլտուրաների ստացման էլեկտիվ պայմանները:

Մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը

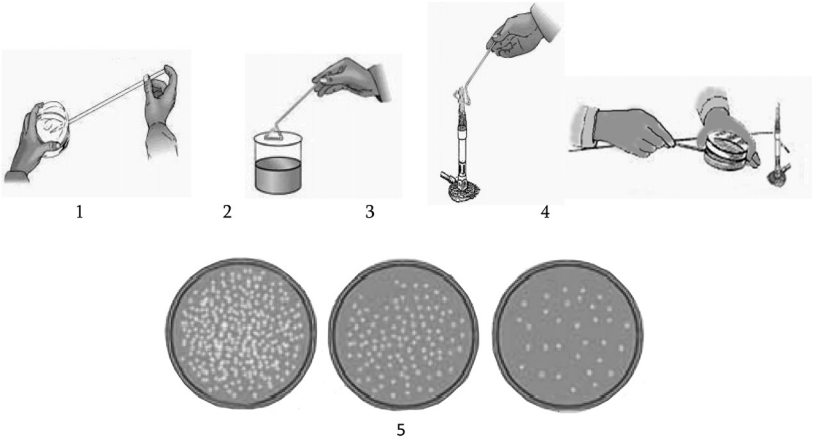
Կուտակիչ կուլտուրա ստանալուց հետո անջատում են մանրէի մաքուր կուլտուրան: Այն կարելի է մեկուսացնել առանձին գաղութից կամ մեկ բջջից:

Մաքուր կուլտուրայի անջատումը միայնակ գաղութից

Մանրէների մաքուր կուլտուրաների անջատման հիմնական մեթոդն առանձին գաղութից մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումն է: Այն առաջին անգամ կիրառել է գերմանացի մանրէաբան Ռ. Կոխը և ի պատիվ նրա կոչվել է Կոխի մեթոդ: Այս մեթոդը կիրառելի չէ այն մանրէների համար, որոնք չեն աճում կամ վատ են աճում պինդ սննդամիջավայրերի վրա: Այդպիսի մանրէների թվին են պատկանում որոշ բակտերիաներ, բազմաթիվ ջրիմուռներ և նախակենդանիներ:

Աերոբ մանրէների մաքուր կուլտուրաների անջատման համար կուտակիչ կուլտուրայի կախույթը տարածում են պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին: Աշխատանքի հաջորդականությունը հետևյալն է: Եռացող ջրային բաղնիքում հալեցված նախապես մանրէազերծված և մինչև 50^{0}C պաղեցված ագար-ագար կամ ժելատին պարունակող պինդ սննդամիջավայրը լցնում են մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ: Միջավայրի պնդանալուց հետո, դրա մակերեսին ավելացնում են կուտակիչ կուլտուրայի կամ մանրէազերծված ջրում դրա կախույթի մեկ կաթիլ և Դրիգալսկու մանրէազերծ ապակյա մածկաթիակով այն լավ տարածում են սննդամիջավայրի ողջ մակերեսով: Այնուհետև այդ նույն մածկաթիակը սահեցնում են հաջորդաբար երկրորդ, ապա երրորդ, անհրաժեշտության դեպքում նաև չորրորդ թասում լցված սննդամիջավայրի մակերեսով: Սովորաբար ինկուբացումից հետո առաջին երկու թասերում մանրէների աճը լինում է համատարած, իսկ հաջորդող թասերում՝ առանձին գաղութներով (նկար 40):

Կուտակիչ կուլտուրայից մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը կարելի է կատարել նաև նոսրացող գծերի մեթոդով: Այս դեպքում կուտակիչ կուլտուրան կամ մանրէազերծված ջրում դրա կախույթը մանրէաբանական օղակով տարածում են պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին գծերի այնպիսի հաջորդականությամբ, ինչպես ցույց է տրված նկար 41-ում: Յուրաքանչյուր նոր գծից առաջ մանրէաբանական

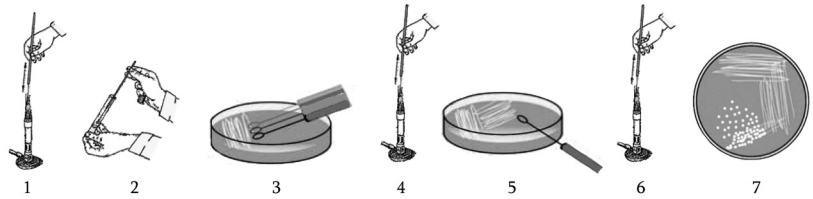


Նկար 40. Կուտակիչ կուլտուրայի տարածումը պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին մածկաթիակով:

1. Ապակյա պիպետով մանրէների կենսազանգվածի տեղադրում պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին, 2. և 3. Մածկաթիակի մանրէազերծում, 4. Կախույթի տարածում, 5. Մանրէների գաղութներ:

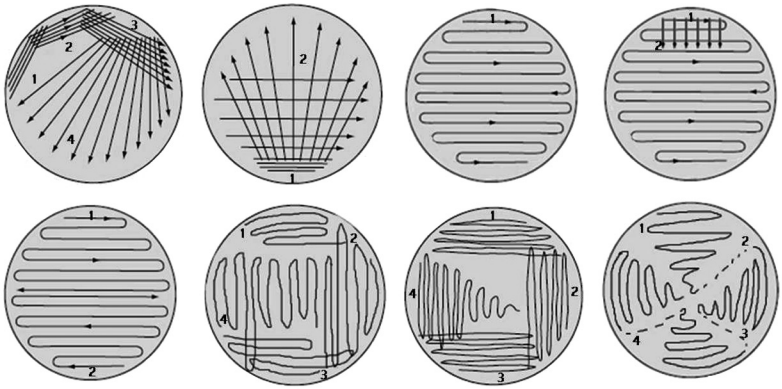
օղակը մանրէազերծում են գազայրոցի կամ սպիրտայրոցի բոցով: Միայնակ գաղութներ ստանալու համար պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին մանրէաբանական օղակով գծային ցանքը կարելի է իրականացնել գծերի տարբեր հաջորդականությամբ (նկար 42):

Ցանքից հետո Պետրիի թասերը տեղադրում են ջերմապահարան՝ կափարիչով դեպի ներքև շրջված, որպեսզի թասի կափարիչի վրա առաջացած ջրի կաթիլները պինդ սննդամիջավայրի վրա չկաթեն: Այլապես մանրէների առանձին-առանձին գաղութների փոխա-



Նկար 41. Մանրէային կուլտուրայի կախույթի ցանքը պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին մանրէաբանական օղակով:

1. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 2. Մանրէաբանական օղակով մանրէային կախույթի տեղադրում, 3. Առաջնային գծային ցանք, 4. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 5. Երկրորդային գծային ցանք, 6. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 7. Մանրէների գաղութներ:



Նկար 42. Գծային ցանքի տարբեր հաջորդականություններ:

րեն կառաջանա համատարած աճ՝ գազոն: Թասերը, կախված մանրէի աճման արագությունից, ինկուբացնում են ջերմապահարանում 1-7 օրվա ընթացքում: Առաջացած մեկուսացված գաղութները վերացանում են սրվակներում լցված շեղակի մակերեսին կամ հեղուկ սննդամիջավայրում:

Խորքային ցանքի մեթոդը: Միկրոաերոֆիլ և ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէների գաղութները հաճախ ստանում են խորքային ցանքի մեթոդով: Դրա համար պինդ սննդամիջավայրը (15-20-ական մլ) նախապես լցնում են սրվակների մեջ, և մանրէազերծում: Ցանքից առաջ սրվակներում պինդ սննդամիջավայրերը հալեցնում են եռացող ջրային բաղնիքում կամ միկրոալիքային վառարանում: Ցանքը կատարում են նախապես մանրէազերծված ծորակային ջրում կուտակիչ կուլտուրայի նոսրացված կախույթներից: Նոսրացումները պատրաստում են այն հաշվարկով, որպեսզի կախույթի 0.5-1 մլ-ի ցանքի դեպքում ստացվեն առանձին գաղութներ: Նոսրացման աստիճանը որոշվում է կուտակիչ կուլտուրայի խտությամբ:

Ցանքը, որպես կանոն, կատարում են վերջին 3-4 նոսրացումներից: Դրա համար հալեցված և մինչև 48-50°C պաղեցված սննդամիջավայր պարունակող սրվակի մեջ ներարկում են 0.5-1 մլ կուտակիչ կուլտուրայի նոսրացված կախույթը: Ցանքանյութը լավ խառնում են՝ պտտելով սրվակը ձեռքի ափերով: Այնուհետև, գազայրոցի կամ սպիրտայրոցի բոցի մոտ հանում են սրվակի խցանը՝ ջերմամշակելով սրվակի եզրերը գազայրոցի բոցով, և արագորեն սրվակի պարունակությունը լցնում մանրէազերծված Պետրիի թասի մեջ: Ագարային

սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո Պետրիի թասերը տեղադրում են ջերմապահարանում: Սննդամիջավայրի խորքում աճած գաղութները կտրում են մանրէազերծված նշտարով, մեկուսացնում են մանրէազերծված մազանոթային պիպետներով կամ ուղղակի մանրէաբանական ասեղով և տեղափոխում անջատվող մանրէների աճի և զարգացման համար բարենպաստ հեղուկ սննդամիջավայր:

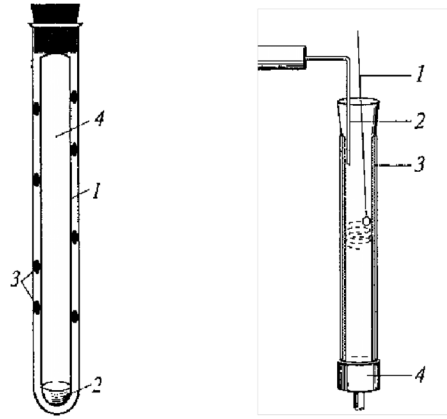
Հատկապես դժվար է մեկուսացնել օբլիգատ անաերոբ մանրէների մաքուր կուլտուրաները: Եթե մոլեկուլային թթվածնի հետ շփումը անմիջապես չի բերում բջիջների մահվան, ապա ցանքը կատարում են Պետրիի թասերում սննդամիջավայրի մակերեսին, բայց ցանքից հետո թասերն ինկուբացնում են անաերոբային տարայում (տե՛ս նկար 15) կամ անաերոստատներում (տե՛ս նկար 16): Սակայն հաճախ կիրառում են նոսրացման մեթոդը: Այս մեթոդի էությունը կայանում է նրանում, որ կուտակիչ կուլտուրայի նոսրացումներն իրականացնում են հալեցված և մինչև 45-50°C պաղեցված ագարային սննդամիջավայրում: Կատարում են 6-10 հաջորդական նոսրացումներ: Այնուհետև սրվակներում սննդամիջավայրն արագ սառեցնում են որպեսզի պնդանա, ապա օդի ներթափանցումը կանխելու նպատակով ավելացնում պարաֆինի և վազելինային յուղի (3:1 հարաբերությամբ) մարէազերծված խառնուրդ:

Երբեմն ագարացված սննդամիջավայրը ցանքից և լավ խառնումից հետո տեղափոխում են մանրէազերծված Բուրրիի խողովակների (տե՛ս նկար 13) մեջ: Կարելի է օգտագործել Պաստերյան մազանոթային պիպետները (տե՛ս նկար 4), որոնցում լցնում են հալեցված ագարային սննդամիջավայրում նոսրացված կուտակիչ կուլտուրայի կախույթը, ապա զոդում մազանոթի ծայրերը: Ինկուբացումից հետո սրվակներից (Պաստերյան պիպետներից, Բուրրիի խողովակներից) որևէ մեկում կարելի է հայտնաբերել մանրէների առանձին գաղութներ:

Առաջացած գաղութների մեկուսացումը կատարվում է հետևյալ կերպ: Մանրէազերծված ներարկիչով հեռացնում են պարաֆին-վազելինային շերտը, իսկ ագարային սննդամիջավայրի սյունը սրվակի պատի և ագարային սննդամիջավայրի միջև տեղադրված մազանոթի կամ ասեղի միջով թթվածին չպարունակող գազի հոսքի ճնշմամբ զգուշորեն դուրս են բերում սրվակից և տեղադրում մանրէազերծված Պետրիի թասի մեջ: Բուրիի խողովակից ագարացված սննդամիջավայրը ևս դուրս են բերում թթվածին չպարունակող գազի հոսքի ճընշմամբ:

Որոշ դեպքերում պինդ սննդամիջավայրը սրվակից դուրս են բերում տաքացմամբ՝ ամբողջ ընթացքում արագ պտտելով այն գազայրոցի կամ սպիրտայրոցի բոցի վրա: Այս դեպքում անմիջականորեն սրվակի պատին հարող ագար-ագարը հալվում է, և սրվակի պարունակությունը ագարային սյան ձևով հեշտությամբ սահում է մանրէազերծ Պետրիի թասի մեջ: Ագարե սյունը կտրտում են մանրէազերծված նշտարով և մեկուսացնում գաղութները՝առանձնացնելով դրանց մանրէազերծված մազանոթային պիպետներիով կամ մանրէաբանական ասեղով: Մեկուսացված գաղութները տեղափոխում են ուսումնասիրվող մանրէների զարգացման համար բարենպաստ հեղուկ սննդամիջավայրի մեջ: Եթե մեկուսացված գաղութները ստացվել են մազանոթում, ապա մազանոթի մակերեսը մանրէազերծելուց հետո այն կոտրում են մանրէազերծված ունելիով և մեկուսացված գաղութներ պարունակող մազանոթային կտորները տեղադրում մանրէազերծված սննդամիջավայրի մեջ:

Պտտվող սրվակների մեթոդ: Թթվածնի նկատմամբ բարձր զգայունություն ունեցող օբլիգատ անաերոբ մանրէների կուլտուրաները ստանում են Ռ. Հանգեյթի պտտվող սրվակների մեթոդով: Դրա էությունը կայանում է հետևյալում: Սրվակի մեջ լցված դեռևս հե-



Ա Բ

Նկար 43. Օբլիգատ անաերոբների կուլտուրաների ստացումը գազով լցված Ռ. Հանգեյթի պտտվող սրվակների մեթոդով (Ա) և այդ մեթոդի ձևափոխությամբ (Բ):

Ա) 1. Պինդ սննդամիջավայր, 2. Կոնդենսացված ջուր, 3. Բակտերիաների գաղութներ, 4. H_2 և CO_2 գազերի խառնուրդ, Բ) 1. Մանրէաբանական օղակ, 2. Մանրէազերծ իներտ գազի մղման խողովակ, 3. Սրվակի պատերին պնդացած սննդամիջավայր, 4. Սրվակը պտտող հարմարանք:

ղուկ ագարային սննդամիջավայրը թթվածնից զուրկ մանրէազերծված իներտ գազի մշտական հոսքի պայմաններում ինոկուլացնում են մանրէային կախույթով: Այնուհետև սրվակը փակում են ռետինե խցանով և հորիզոնական դիրքով տեղադրում սեղմակի մեջ, որը պտտում է սրվակը: Ագարային սննդամիջավայրն այդ դեպքում համաչափ բաշխվում է և, սառելով, բարակ շերտով պատում սրվակի պատերը: Գազային խառնուրդով լցված սրվակի ագարային սննդամիջավայրի բարակ շերտը թույլ է տալիս ստանալ մեկուսացված գաղութներ, որոնք լավ երևում են անզեն աչքով (նկար 43):

Կիրառում են նաև Ռ. Հանգեյթի մեթոդի ձևափոխությունը: Այդ դեպքում դեռևս հեղուկ ագարային սննդամիջավայրը մանրէազերծված իներտ գազի մշտական հոսքի պայմաններում լցնում են սրվակների մեջ: Այնուհետև սրվակը փակում են ռետինե խցանով և հորիզոնական դիրքով տեղադրում սեղմակի մեջ, որը պտտում է սրվակը: Երբ սննդամիջավայրը պնդանում է, մանրէազերծված գազի անընդհատ հոսքի պայմաններում մանրէաբանական օղակի միջոցով կատարում են ցանք՝ հպելով օղակը պտտվող սրվակի պատերին հատակից դեպի վեր ուղղությամբ:

Մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը մեկ բջջից

Մեկ բջջից մաքուր կուլտուրա կարելի է մեկուսացնել կաթիլային մեթոդով՝ կիրառելով միկրոմանիպուլյատոր կամ միկրոսելեկտոր:

Լինդկերի կաթիլային մեթոդը: Մեթոդը կիրառվում է խոշոր չափսեր ունեցող մանրէների՝ շաքարասնկերի, միցելիում առաջացնող սնկերի, ցիանաբակտերիաների, ջրիմուռների հետ աշխատելիս: Աշխատանքի հաջորդականությունը հետևյալն է: Կուտակիչ կուլտուրան նոսրացնում են մանրէազերծ սննդամիջավայրում այնպիսի հաշվարկով, որ ոչ մեծ կաթիլում լինեն մանրէների մեկական բջիջներ: Այնուհետև մի քանի մանրէազերծված ծածկապակիների մակերեսին մանրէազերծված պողպատե ծայրակալով կաթեցնում են նոսրացված կախույթից մեկական կաթիլ: Պատրաստում են պատրաստուկ կախ կաթիլի մեթոդով: Ծածկապակիների մակերեսին առկա կաթիլները մանրադիտակում են և նշում այն պատրաստուկները, որոնցում հայտնաբերվել է միայն մեկ բջիջ: Դրանից հետո պատրաստուկը տեղափոխում են խոնավ խցիկ, որն իրենից ներկայացնում է հատակին խոնավ ֆիլտրի թղթով Պետրիի թաս, և տեղադրում

ջերմապահարան: 12-24 ժամ անց նշված կաթիլները կրկին մանրադիտակում են: Այն կաթիլները, որոնցում դիտվում է միկրոգաղութների ձևավորում, մանրէազերծ ֆիլտրի թղթի կտորներով զգուշորեն հանում են ծածկապակու վրայից և թղթերը տեղափոխում մանրէազերծված սննդամիջավայրով սրվակների մեջ:

Առանձին բջիջների մեկուսացումը միկրոմանիպուլյատորի միջոցով: Միկրոմանիպուլյատորը մի սարք է, որը թույլ է տալիս հատուկ միկրոպիպետի կամ միկրոասեղի միջոցով կախույթից առանձնացնել մեկ բջիջ: Այս գործընթացը վերահսկում են մանրադիտակմամբ: Միկրոմանիպուլյատորն ունի երկու գործառութային շտատիվ, որոնց միջև տեղադրված է սովորական մանրադիտակ: Մանրադիտակի առարկայական սեղանի վրա տեղադրված է խոնավ խցիկ, որում տեղադրում են կախ կաթիլի պատրաստուկը: Գործառութային շտատիվների պրկիչներին ամրացված են միկրոպիպետներ (միկրոասեղներ), որոնց տեղաշարժումը մանրադիտակի տեսադաշտում պտուտակների և լծակների համակարգի շնորհիվ իրականանում է միկրոնի ճշտությամբ: Միկրոպիպետները տեղադրում են խոնավ խցիկում այնպես, դրանց ծայրերը հայտնվեն կախ կաթիլում: Կարելի է մեկուսացնել առանձին բջիջները միկրոպիպետների օգնությամբ և տեղափոխել դրանց մանրէազերծված սննդամիջավայրով սրվակների մեջ:

Միայնակ բջիջների մեկուսացումը Պերֆիլևի միկրոսելեկտորի օգնությամբ: Պերֆիլևի միկրոսելեկտորի կարևոր բաղադրամասն ապակյա միկրոմազանոթն է, որն ունի ուղղանկյուն հատույթ: Մանրէազերծված միկրոմազանոթը լցնում են հետազոտվող բջջային կախույթով պատրաստված ագարացված սննդամիջավայրով, և մանրադիտակի մեծ խոշորացմամբ գտնում մեկ բջջով հատված: Հատուկ հարմարանքի օգնությամբ մազանոթի այդ հատվածը մանրէազերծ պայմաններում դուրս են մղում և տեղափոխում մանրէազերծված սննդամիջավայր: Պերֆիլևի միկրոսելեկտորը կարելի է օգտագործել ինչպես խոշոր, այնպես էլ փոքր չափսեր ունեցող մանրէների մեկուսացման համար:

Մեկուսացված կուլտուրայի մաքրության որոշումը

Մանրէների մեկուսացված կուլտուրայի մաքրությունը պետք է մանրակրկիտ ստուգել: Դա սովորաբար իրականացվում է մի քանի

եղանակով՝ ակնադիտակմամբ, մանրադիտակմամբ և մի շարք սնը-նդամիջավայրերի վրա ցանքի միջոցով: Ակնադիտմամբ վերահիսկ-վում է մանրէների աճը շեղակի մակերեսին: Եթե աճը համասեռ չէ, ապա կուլտուրան մաքուր չէ: Այսպիսի վերահսկողությունը հնարա-վոր է միայն այն կուլտուրաների համար, որոնք ունակ են աճել պինդ սննդամիջավայրերի մակերեսին:

Մանրէների կուլտուրաների մաքրությունն անհրաժեշտ է վե-րահսկել մանրադիտակմամբ: Դրա համար պետք է պատրաստել ներկված բջիջների մշտական պատրաստուկ և դիտել այն իմեր-սիոն օբյեկտիվով կամ պատրաստել կենդանի բջիջների պատրաս-տուկ և դիտել այն փուլացայտերանգային հարմարանքով: Բազմա-թիվ մանրէների մաքուր կուլտուրաներ, որպես կանոն, ձևաբանորեն միատարր են և առկա են միայն բջիջների չափսերի աննշան տար-բերություններ: Սակայն հարկ է հիշել, որ որոշ մանրէների, օրինակ՝ միկոբակտերիաների, նոկարդիաների բջիջները շատ բազմաձև (պոլիմորֆ) են, հետևաբար դրանց մաքրության որոշումը մանրադի-տակմամբ որոշ բարդություններ է առաջացնում:

Մանրէների կուլտուրաների մաքրությունը ստուգվում է նաև տարբեր սննդամիջավայրերում ցանքով: Առաջին հերթին անջատ-ված կուլտուրան ցանում են դրա աճի համար բարենպաստ սննդա-միջավայրերի վրա: Աճած գաղութների միատարրությունը կուլտու-ռայի մաքրության վկայությունն է: Բազմաթիվ քեմոհետերոտրոֆնե-րի համար պարտադիր է նաև աճեցնել մսապեպտոնային ագարում (ՄՊԱ): Կուլտուրայի մաքրության չափանիշ է աճած գաղութների միատարրությունը կամ աճի բացակայությունը, եթե տվյալ մանրէ-ները ՄՊԱ-ում պարզապես չեն զարգանում:

Անհրաժեշտ է նկատի ունենալ, որ որոշ մանրէների մաքրության մասին եզրակացություն չի կարելի կատարել միայն ըստ ՄՊԱ-ում ցանքի արդյունքների: Դա հատկապես վերաբերում է ավտոտրոֆ մանրէներին, ինչպես նաև այն հետերոտրոֆների, որոնք ունակ են զարգանալու մեկ կամ մի քանի ուղեկից տեսակների հետ: Մանրէ-ների այդպիսի կուլտուրաների մաքրությունը ստուգում են նաև մի շարք այլ սննդամիջավայրերի, օրինակ՝ ածիկային քաղցու ագար, կարտոֆիլային օսլա պարունակող ագարացված սննդամիջավայրի վրա ցանքի մեթոդով: Սննդամիջավայրերի հավաքակազմը և դրանց բաղադրությունը որոշվում են ըստ մեկուսացված մանրէների, ինչ-պես նաև դրանց հնարավոր ուղեկից տեսակների նյութափոխանա-կային առանձնահատկություններով:

Մանրէների թվաքանակի որոշման մեթոդները

Սննդամիջավայրերում և բնական սուբստրատներում մանրէների աճի մասին դատում են միավոր ծավալում բջիջների թվաքանակի կամ կենսազանգվածի փոփոխությամբ: Այս ցուցանիշների որոշման մեթոդները կարող են լինել ուղղակի (մանրադիտակով բջիջների հաշվարկում, կենսազանգվածի կշռում) կամ անուղղակի: Անուղղակի մեթոդները հիմնված են այնպիսի ցուցանիշների փոփոխության վրա, որոնց արժեքները կախված են մանրէների թվաքանակից կամ կենսազանգվածից (օրինակ՝ բջիջների կախույթը պինդ սննդամիջավայրի վրա տարածելուց հետո առաջացած գաղութների թվով, կախույթի լույսը ցրելու կամ կլանելու չափով, կախույթում սպիտակուցի պարունակությամբ և այլն): Մեթոդի ընտրությունը կախված է հետազոտության նպատակից, սննդամիջավայրի կամ սուբստրատի կազմից, ինչպես նաև մանրէների աճի և ձևաբանության առանձնահատկություններից:

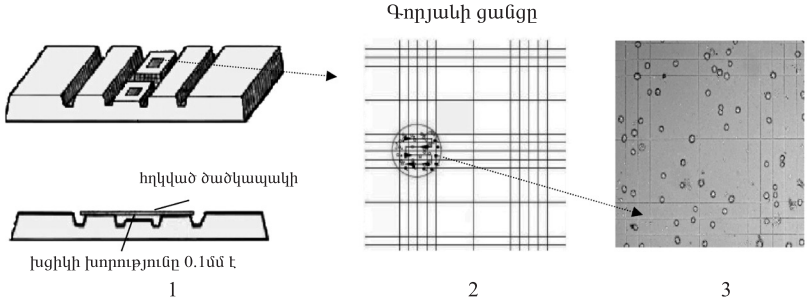
Մանրէների թվաքանակի հաշվարկման համար, հատկապես բնական սուբստրատներում, օրինակ՝ հողում, անհրաժեշտ է հիշել, որ դրանց բջիջները հաճախ գտնվում են հողային կնճիկին ամրացված (մակակլանված) վիճակում կամ միկրոգաղութների ձևով: Այդ պատճառով նախքան մանրէների թվաքանակի հաշվարկը դրանց անհրաժեշտ է առանձնացնել սուբստրատի մասնիկներից և միմյանցից բջջային կախույթի մեխանիկական խառնմամբ, տրորմամբ, ուլտրաձայնով մշակմամբ, մակերեսային ակտիվ նյութերի կիրառմամբ՝ հաշվի առնելով նաև հետազոտվող սուբստրատի առանձնահատկությունները:

Մանրէային բջիջների թվաքանակի որոշումը մանրադիտակով

Մանրադիտակով մանրէների բջիջների թվաքանակի հաշվարկման համար կիրառվում են հաշվիչ խցիկներ, առարկայական ապակիների կամ թաղանթային ֆիլտրերի վրա ֆիքսված և ներկված բջիջների պատրաստուկներ: Թվարկված մեթոդները թույլ են տալիս որոշել միավոր ծավալում բջիջների (ինչպես կենդանի, այնպես էլ մահացած) ընդհանուր թվաքանակը: Նշված մեթոդների հիմնական սահմանափակումը հետազոտվող սուբստրատի միավոր ծավալում բջիջների բավականին մեծ թվաքանակի անհրաժեշտությունն է:

Բջիջների թվաքանակի հաշվարկումը հաշվիչ խցիկների կիրառմամբ

Այս մեթոդը խորհուրդ է տրվում օգտագործել խոշոր օբյեկտների՝ շաքարասնկերի, միաբջիջ ջրիմուռների, սնկերի կոնիդիումների, որոշ համեմատաբար խոշոր բակտերիաների հաշվարկման համար: Դիցուք՝ Գորյաևի-Տոմի խցիկը (նկար 44) իրենից ներկայացնում է հաստ առարկայական ապակի, որը բաժանված է ակոսներով: Ապակու կենտրոնում գտնվում է 0.1 մմ խորությամբ փոսիկ՝ հաշվիչ խցիկ, որի հատակին տեղադրված է մեծ և փոքր քառակուսիներից բաղկացած ցանց: Խցիկի բարձրությունը (0.1 մմ) և մեծ ու փոքր քառակուսիների մակերեսները (համապատասխանաբար 1/25 և 1/400 մմ^2) նշված են առարկայական ապակու վրա:



Նկար 44. Գորյաևի-Տոմի խցիկի կառուցվածքը (1) և պատկերը մանրադիտակով 40× (2) և 90× խոշորացմամբ (3):

Հաշվիչ խցիկի հետ աշխատելիս անհրաժեշտ է հետևել խցիկը կախույթով լցնելու որոշակի կանոններին: Ցանցավոր փոսիկը ծածկում են հատուկ հղկված ծածկապակիով և, թեթևակի սեղմելով, կատարում հակառակ ուղղություններով պտտական տեղաշարժումներ մինչև ինտերֆերենցիայի պատկերի (Նյուտոնի օղակների) հայտնվելը, որը վկայում է խցիկի պատերին ծածկապակու ամրացված լինելու մասին: Միայն այս դեպքում է խցիկի ծավալը համապատասխանում հաշվարկայինին: Նախապես հաշվիչ խցիկի մեջ կաթոցիկով լցնում են հետազոտվող մանրէի կախույթը և այն տեղադրում մանրադիտակի առարկայական սեղանի վրա: Խորհուրդ է տրվում բջիջների հաշվարկը սկսել նշված գործողությունից 2-3 րոպե հետո, որպեսզի բջիջներն անշարժանան հպվելով խցիկի պատերին և ման-

ռադիտակման ընթացքում գտնվեն մեկ հարթության վրա: Շարժուն բջիջները կարելի է անշարժացնել ջերմամշակմամբ կամ 0.5% ֆորմալինի լուծույթով մշակմամբ:

Բջիջների թվաքանակը հաշվում են կիրառելով 8 և 10, հազվադեպ 40 անգամ մեծացնող օբյեկտիվ: Չի կարելի աշխատել իմերսիոն օբյեկտիվով, քանի որ այդ օբյեկտիվի աշխատանքային հեռավորությունները փոքր են խցիկի ապակու հաստությունից: Սովորաբար հաշվում են հաշվիչ խցիկի ցանցի 10 մեծ կամ 20 փոքր քառակուսիներում մանրէների թվաքանակը՝ տեղաշարժելով մանրադիտակի առարկայական սեղանը անկյունագծով: Հաշվարկում են այն բոլոր բջիջները, որոնք գտնվում են քառակուսու ներսում կամ քառակուսու վերին և աջ կողմերին: Մեծ քառակուսիներում բջիջների թվաքանակի հաշվարկման դեպքում բջիջների թիվը չպետք է գերազանցի 20-ը, իսկ փոքր քառակուսիներում՝ 10-ը, հակառակ դեպքում սկզբնական կախույթը լուծում են ծորակային ջրով (ցանկալի է նախապես մանրէազերծված):

Առավել ճշգրիտ տվյալներ ստանալու համար վերոնշյալ գործողությունը կրկնում են 3-5 անգամ՝ յուրաքանչյուր անգամ նորովի նախապատրաստելով խցիկը և հաշվելով մանրէների թվաքանակը մանրէային կախույթի նոր մասնաբաժնում: Բջիջների քանակությունը (M) 1 մլ հետազոտվող կախույթում հաշվարկում են հետևյալ բանաձևով.

$$M = \frac{a \times n}{h \times S} \times 10^3,$$

որտեղ a-ն բջիջների թվաքանակի միջին մեծությունն է ցանցի մեկ քառակուսու մեջ, h-ը՝ հաշվիչ խցիկի բարձրությունը (մմ), S-ը՝ հաշվարկային քառակուսու մակերեսը (մմ^2), 10^3-ը՝ սմ^3-ից մմ^3 հաշվարկման հաստատունը, n-ը՝ հետազոտվող կախույթի նոսրացումների թիվը:

Մանրէների ուղղակի հաշվարկման մազանոթային մեթոդ

Մանրէների հաշվարկման նպատակով Բ.Վ. Պերֆիլևը մշակել է հատուկ բազմուղի հաշվիչ մազանոթներ՝ բաղկացած հարթ զուգահեռ ապակիներից, որոնք ունեն ուղղանկյուն հատույթ, և հաշվարկման սկզբունքով նման են հաշվիչ խցիկներին: Դրանց բարձրությունն

ու լայնությունը որոշվում են մազանոթի կառուցվածքով և իրենցից ներկայացնում են հաստատուն մեծություններ, իսկ երկարությունը սովորաբար համապատասխանում է մանրադիտակի տեսադաշտի տրամագծին կամ չափելի է: Ի տարբերություն Գորյանի-Տոմի խցիկի, Պերֆիլևի մազանոթների մանրադիտակման համար կարելի է օգտագործել մեծ խոշորացումով օբյեկտիվներ, այդ թվում՝ իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվներ, և, հետևաբար, կարելի է հաշվարկել նաև փոքր չափսեր ունեցող մանրէների թվաքանակը: Բազմուղի մազանոթներն իրենցից ներկայացնում են մի քանի (սովորաբար 5) զուգահեռ մազանոթային խցիկներից բաղկացած կառույցներ, որոնք տեղադրված են հատուկ առարկայական ապակու վրա: Մանրէային բջիջները նախ հաշվարկում են յուրաքանչյուր մազանոթային խցիկում, իսկ հետագայում ընդհանուր հաշվարկի համար միջինացնում ստացված արդյունքները:

Սուբստրատի մեջ տեղադրելիս մազանոթային հատկությունների շնորհիվ մազանոթը լցվում է սուբստրատով: Այնուհետև մազանոթը տեղադրում են առարկայական ապակու վրա, ծայրը փակում են պարաֆինով (դա թույլ է տալիս պահպանել մազանոթի պարունակությունը չորացումից) և հաշվարկում են բջիջները՝ օգտագործելով 40× կամ 90× խոշորացնող օբյեկտիվներն կամ փուլացայտերանգային հարմարանք:

Հավաստի տվյալներ ստանալու համար յուրաքանչյուր խցիկում հաշվարկում են 50-100 տեսադաշտերում բջիջների թվաքանակը, ապա հաշվարկում միջինը: 1 մլ հետազոտվող սուբստրատում բջիջների թվաքանակը (M) որոշվում է հետևյալ բանաձևով.

$$M = \frac{a \times n}{h \times l \times d} \times 10^3,$$

որտեղ a-ն մանրադիտակի տեսադաշտի տրամագծի երկայնքով մազանոթի մեջ բջիջների միջին թվաքանակն է, h-ը՝ մազանոթի բարձրությունը (մմ), l-ը՝ մազանոթի լայնությունը (մմ), d-ն՝ տեսադաշտի տրամագիծը (մազանոթի երկարությունը) մանրադիտակի տվյալ խոշորացման պայմաններում (մմ), 10^3-ը՝ սմ^3-ից մմ^3 հաշվարկման հաստատունը, n-ը՝ հետազոտվող կախույթի նոսրացումների թիվը:

Բջիջների հաշվարկը մշտական (ներկված) պատրաստուկում (Վինոգրադսկու-Բրիդի մեթոդ)

Այս մեթոդը կիրառվում է տարբեր բնական սուբստրատներում՝ հողում, աղտոտված ջրում, օպտիկապես անթափանց, ջրում չլուծվող բաղադրամասեր (օրինակ՝ օսլա, սոյայի ալյուր և այլն) պարունակող սննդամիջավայրերում մանրէների թվաքանակի որոշման համար: Մեթոդի առավելությունը ներկված մշտական պատրաստուկների երկարատև պահպանման հնարավորությունն է, որի շնորհիվ հաշվարկը կարելի է իրականացնել հետազոտողի համար հարմար պահին:

Պատրաստուկը պատրաստում են հետևյալ կերպ: Առարկայական ապակին տեղադրում են միլիմետրական թղթի վրա, որի վրա նշագծված է 4 կամ 6 սմ^2 մակերեսով ուղղանկյուն: Այնուհետև ապակու վրա տեղադրում են հստակ ծավալով հետազոտվող կախույթը (10, 20 կամ 30 մկլ), իսկ որոշ դեպքերում ավելացնում են նաև մեկ կաթիլ 0.03-0.1% ագար-ագարի ջրային լուծույթ: Կախույթը մանրէաբանական օղակով հավասարաչափ տարածում են միլիմետրական թղթի վրա նշագծված ուղղանկյան մակերեսով: Պատրաստուկը չորացնում են օդում, 10-20 րոպե ֆիքսում էթանոլով (96%) և ներկում մեթիլեն կապույտով, ֆուքսինով կամ այլ ներկանյութով: Այնուհետև պատրաստուկը լվանում են՝ հաջորդաբար տեղադրելով ջրով լցված 4-5 անոթների մեջ, (լվանալ հոսող ջրի տակ չի կարելի) և կրկին չորացնում օդում: Այս ձևով պատրաստուկները լավ են պահպանվում:

Պատրաստուկը մանրադիտակում են իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվով: Բջիջների թվաքանակը հաշվարկում են օկուլյարային ցանցի քառակուսիներում, որը տեղադրում են օկուլյարի մեջ կուտակիչ և ակնային ոսպնյակների միջև: Ցանցի բացակայության դեպքում հաշվարկվում է բջիջների թվաքանակը մանրադիտակի տեսադաշտում: Օկուլյարային ցանցի քառակուսիներում և հաշվիչ խցիկների ցանցի քառակուսիներում հաշվարկման կանոնները նույնն են: Որպեսզի ստացված տվյալը հավաստի լինի, խորհուրդ է տրվում մանրէների բջիջները հաշվարկել 50-100 տեսադաշտերում: 1 մլ հետազոտվող սուբստրատում բջիջների թվաքանակը (M) որոշվում է հետևյալ բանաձևով.

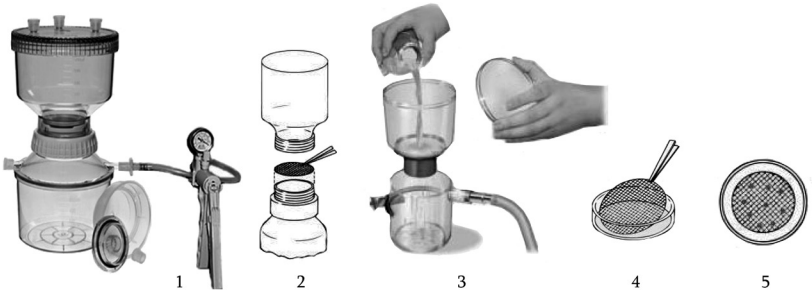
$$M = \frac{a \times S \times n}{s \times V},$$

որտեղ a-ն օկուլյարային ցանցի քառակուսում (կամ մանրադիտակի տեսադաշտում) բջիջների միջին թիվն է, s-ը՝ օկուլյարային ցանցի վանդակի մակերեսը, մմ^2, V-ն՝ ապակու վրա տեղադրված կախույթի ծավալը, մլ, S-ը քսուքի մակերեսը, մմ^2, n-ը՝ հետազոտվող կախույթի նոսրացումների թիվը:

Ցանցի քառակուսու կամ տեսադաշտի մակերեսը որոշվում է օբյեկտ-միկրոչափով: Այն տեղադրում են մանրադիտակի սեղանի վրա պատրաստուկի փոխարեն և խոշորացմամբ, որով իրականացվել էր մանրէների բջիջների հաշվարկը, որոշում են օկուլյարային ցանցի քառակուսու կողմը կամ տեսադաշտի տրամագիծը: Տեսադաշտի մակերեսը հաշվարկում են $S = \pi r^2$ բանաձևով:

Թաղանթային ֆիլտրերի օգնությամբ բջիջների հաշվարկում

Այս մեթոդը կիրառվում է մանրէների ցածր խտությամբ սուբստրատներում բջիջների թվաքանակի հաշվարկման համար: Այն կիրառում են ջրամբարներում մանրէների թվաքանակի որոշման համար, սանիտարամանրէաբանական և այլ հետազոտություններում: Հայտնի ծավալով նմուշի ֆիլտրումը (մի քանի միլիլիտրից մինչև մի քանի լիտր) թույլ է տալիս ֆիլտրի մակերեսին կուտակել նմուշում առկա մանրէային բջիջները: Այնուհետև այն ներկում են և հաշվում ֆիլտրի վրա կուտակված մանրէների թվաքանակը (նկար 45):



Նկար 45. Հեղուկ նմուշի ֆիլտրման համար նախատեսված ֆիլտր (1) և ֆիլտրման ընթացքը (2-5):

1. Նմուշի ֆիլտրման համար նախապատրաստված հարմարանք միացված վակուումային պոմպին, 2. Թաղանթային ֆիլտրի տեղադրում, 3. Հետազոտվող հեղուկի ֆիլտրում, 4. Թաղանթային ֆիլտրի ներկում, 5. Ներկված բջիջներ:

Այս նպատակով կիրառվող ֆիլտրի ծակոտիների տրամագիծը չպետք է գերազանցի մանրէների միջին չափերի տրամագծին: Օդի և լուծիչների մնացորդների հեռացման նպատակով օգտագործումից առաջ ֆիլտրերը եռացնում են թորած ջրում: Ջուրն անհրաժեշտ է 2-3 անգամ փոխել (եռացումը պետք է լինի հանդարտ, այլ կերպ ֆիլտրերը ոլորվում են): Այնուհետև, ֆիլտրը թավշյա մակերեսով վեր տեղադրում են հատուկ կրիչի վրա և ֆիլտրում հստակ ծավալով հեղուկ:

Ինչքան շատ է բջիջների խտությունը հետազոտվող նմուշում, այդքան քիչ պետք է լինի հետազոտվող նմուշի ծավալը և հակառակը: Ֆիլտրի վրա մնացած մանրէների բջիջները ներկում են կարբոլային էրիթրոզինով: Դրա համար ֆիլտրը ստորին մակերեսով տեղադրում են Պետրիի թասի մեջ տեղադրված և նախապես ներկանյութով ներծծված թղթե ֆիլտրի վրա, փակում կափարիչով և թողնում 3-5 ժամ կամ մեկ օր: Բջիջների հավասարաչափ ներկման համար թաղանթային ֆիլտրը պետք է պինդ հպվի էրիթրոզինով ներծծված թղթե ֆիլտրին: Այնուհետև թաղանթային ֆիլտրը լվանում են՝ ներկանյութից պարբերաբար տեղափոխելով թորած ջրով ներծծված թղթե ֆիլտր պարունակող Պետրիի թասերի մեջ այնքան, մինչև այլևս չի ներկում թղթե ֆիլտրը: Պատրաստուկը լվանալուց հետո ֆիլտրը չորացնում են օդում և պատրաստում մանրադիտակման: Առարկայական ապակու վրա ավելացնում են իմերսիոն յուղի մեկ կաթիլ և այդ կաթիլի վրա տեղադրում ներկված թաղանթային ֆիլտրն այնպես, որպեսզի մանրէների բջիջները լինեն վերևից: Թաղանթային ֆիլտրի մակերեսին ավելացնում են ևս մեկ կաթիլ իմերսիոն յուղ և ֆիլտրը ծածկում ծածկապակիով:

Մանրէային բջիջների թվաքանակը հաշվարկում են իմերսիոն օբյեկտիվի օգնությամբ օկուլյարային ցանցի քառակուսում կամ մանրադիտակի տեսադաշտում: Հաշվարկման կանոնները նույնն են ինչպես Վինոգրադսկու-Բրիդի մեթոդի դեպքում: 1 մլ հետազոտվող սուբստրատում բջիջների թվաքանակը (M) հաշվարկվում է հետևյալ բանաձևով՝

$$M = \frac{a \times F}{s \times V} \times 10^6,$$

որտեղ a-ն օկուլյարային ցանցի քառակուսում կամ տեսադաշտում առկա մանրէների միջին թվաքանակն է, F-ը՝ թաղանթային ֆիլտրի մակերեսը, մմ^2, V-ն՝ ֆիլտրված հեղուկի ծավալն է, մլ, s-ը՝ օկուլյարային ցանցի քառակուսու (կամ տեսադաշտի) մակերեսը:

Մանրէների հայտնաբերման և քանակական հաշվարկման համար լայնորեն կիրառվում է նաև լուսարձակային մանրադիտակումը: Մանրէային պատրաստուկները պատրաստում են անմիջապես հետազոտվող կախույթից կամ դրա նոսրացումներից կամ էլ հատուկ մշակված չլուսածորող ֆիլտրերով նախապես ֆիլտրմամբ: Պատրաստուկները և մանրէներով ֆիլտրերը մշակում են ակրիդինային նարնջագույնով կամ այլ լուսածորող ներկանյութով: Լուսային և լուսարձակային մանրադիտակմամբ մանրէների բջիջների հաշվարկման սկզբունքները նույնն են: Ֆլուորոքրոմներով ներկված բջիջներն ավելի հստակ են երևում մթնադաշտային մանրադիտակման ընթացքում, դրանց ավելի հեշտ է տարբերակել ոչ կենսաբանական օբյեկտներից (տիղմի մասնիկներից, հողից և այլն) և իրականացնել ավելի ստույգ հաշվարկ:

Լուսարձակային մանրադիտակումը հնարավորություն է տալիս նաև հետազոտվող նմուշում հայտնաբերել և որոշել առանձին խմբերի մանրէների թվաքանակը: Այդ նպատակով կիրառում են հատուկ ֆլուորոքրոմներ, օրինակ՝ կալկոֆլուոր սպիտակը կիրառվում է սնկերի հայտնաբերման համար:

Կենդանի և մահացած մանրէների ընդհանուր թվաքանակի հաշվարկի համար օգտագործվում են լուսածորող նյութեր՝ ակրիդին օրանժ, 4,6-երկամինա-2-ֆենիլինդոլ, ֆլուորեսցեին իզոթիոցիանատ և այլն: Կենդանի, ակտիվ կենսագործող մանրէների հաշվարկի համար օգտագործվում են երկքացախաթթվային ֆլուորեսցեին և երկքացախաթթվային 5-սուլֆոֆլուորեսցեին: Հետևաբար, միևնույն հետազոտվող նմուշում միաժամանակ կենդանի և մահացած բջիջների հաշվարկի համար անհրաժեշտ է պատրաստել երկու պատրաստուկ:

Ներկայումս մշակվել են համալիր ներկանյութեր, որոնք թույլ են տալիս միևնույն պատրաստուկում հաշվարկել միաժամանակ և՛ կենդանի, և՛ մահացած բջիջները, օրինակ՝ Live/Dead Bac-համալիրը:

Մանրէների թվաքանակի որոշումը սննդամիջավայրերում ցանքի մեթոդով

Ի տարբերություն մանրէների թվաքանակի որոշման մանրադիտակային մեթոդի, սննդամիջավայրում ցանքի միջոցով մանրէների թվաքանակի հաշվարկման մեթոդը հնարավորություն է տալիս որո-

շել մանրէային պոպուլյացիայի միայն կենսունակ բջիջների թիվը: Քանի որ գոյություն չունեն սննդամիջավայրեր, որոնք պիտանի են միաժամանակ բոլոր մանրէների աճի համար, ցանքի մեթոդով մանրէների թվաքանակի հաշվարկման մեթոդը հնարավորություն է տալիս որոշել միայն այն մանրէների թվաքանակը, որոնք ունակ են աճել տվյալ կազմով սննդամիջավայրում: Ընդ որում, այս մեթոդով հնարավոր չէ հաշվել այդ սննդամիջավայրում չաճող (ներառյալ մանրէների այսպես կոչված կենսունակ, բայց չկուլտիվացվող ձևերը) կամ դանդաղ աճող մանրէների քանակությունը: Դա հատկապես կարևոր է հաշվի առնել բնական սուբստրատների (օրինակ՝ հողի, ջրի և այլնի) վերլուծության դեպքում:

Մանրէների թվաքանակի որոշումը պինդ սննդամիջավայրերի վրա ցանքի մեթոդով (Կոխի մեթոդով)

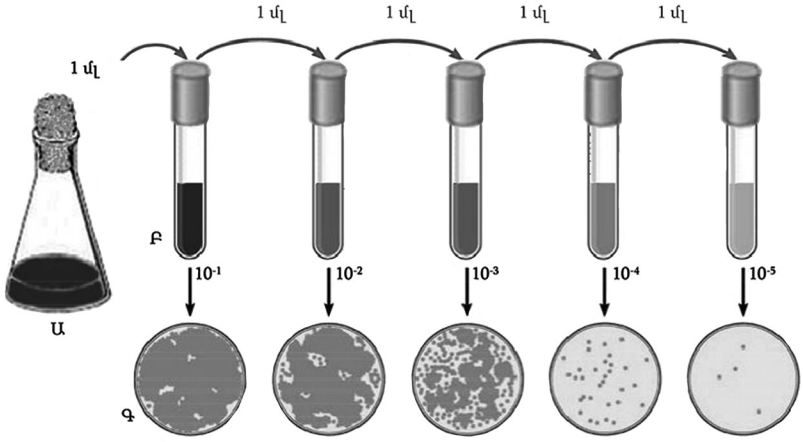
Այս մեթոդը լայնորեն կիրառում են տարբեր սուբստրատներում և լաբորատոր կուլտուրաներում կենսունակ բջիջների քանակի որոշման համար: Դրա հիմքում ընկած է Կոխի մոտեցումը, համաձայն որի մանրէային յուրաքանչյուր գաղութը մեկ մանրէային բջջից առաջացած պոպուլյացիա է: Հետևաբար, ըստ պինդ սննդամիջավայրի վրա առաջացած գաղութների թվի կարելի է հաշվարկել որոշակի ծավալով հետազոտվող կախույթում մանրէների բջիջների նախնական թիվը: Կոխի եղանակով մանրէների քանակական որոշման տվյալները հաճախ արտահայտում են ոչ թե բջիջների թվով, այլ պայմանական, այսպես կոչված, գաղութ առաջացնող միավորներով (ԳԱՄ):

Այս եղանակով մանրէների թվաքանակի որոշումն ընդգրկում է երեք փուլ. նոսրացումների պատրաստում, ցանք Պետրիի թասերում լցված պինդ սննդամիջավայրի վրա և առաջացած գաղութների հաշվարկում:

Նոսրացումների պատրաստումը: Մանրէների պոպուլյացիաների թվաքանակը սովորաբար շատ մեծ է, այդ պատճառով մեկուսացված գաղութների ստացման համար անհրաժեշտ է մանրէային կախույթը հաջորդական նոսրացնել: Նոսրացումները կատարում են մանրէազերծված ծորակային ջրում կամ 0.85% NaCl լուծույթում (ֆիզիոլոգիական լուծույթ): Փորձի ընթացքում նպատակահարմար է օգտագործել նոսրացման միևնույն գործակիցը, օրինակ՝ 10, որը

նվազեցնում է սխալի հավանականությունը:

Նոսրացման համար մանրէազերծված ծորակային ջուրը (9 մլ) լցնում են մանրէազերծված չոր սրվակների մեջ: Այնուհետև հետազոտվող կախույթը (1 մլ) մանրէազերծված պիպետով տեղափոխում են 9 մլ մանրէազերծված ջուր պարունակող սրվակի մեջ և լավ խառնում ստացված կախույթը: Դա առաջին նոսրացումն է՝ 10^{-1}: Այնուհետև ստացված կախույթից 1 մլ տեղափոխում են երկրորդ սրվակի մեջ՝ ստանալով երկրորդ նոսրացումը՝ 10^{-2} (նկար 46): Նույն սկզբունքով կատարում են հաջորդ նոսրացումները: Նոսրացման աստիճանը կախված է հետազոտվող մանրէների պոպուլյացիայի խտությունից, և, համապատասխանաբար, ինչքան մեծ է պոպուլյացիայի խտությունն, այնքան մեծ է նոսրացման աստիճանը: Յուրաքանչյուր նոսրացման համար անհրաժեշտ է օգտագործել նոր պիպետ: Այդ կանոնի անտեսումը հանգեցնում է սխալ տվյալի ստացմանը մանրէային բջիջների ապակու մակերեսին ամրանալու բարձր ունակության պատճառով:

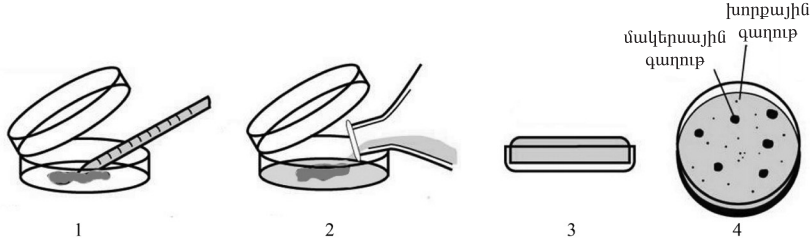


Նկար 46. Նոսրացումների պատրաստման և ցանքի հաջորդականությունը:
Ա) Կուրակիչ կուլտուրա, Բ) Հաջորդական նոսրացումներ, Գ) Համապատասխան նոսրացման ցանքից հետո առաջացած գաղութներ:

Ցանք: Մանրէների կախույթը կարելի է ցանել մակերեսային կամ խորքային եղանակով: Մակերեսային ցանք կատարելիս նախապես հալեցված ագարացված սննդամիջավայրը (15-20 մլ) լցնում են մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ՝ թողնելով դրանք անշարժ մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը: Ագարացված սննդամիջավայրե-

րի մակերեսից կոնդենսացված ջուրը հեռացնելու համար կարելի է Պետրիի թասերը շրջել (կափարիչներով ներքև) և 2-3 օր տեղադրել ջերմապահարանում: Այնուհետև սննդամիջավայրի վրա լցնում են համապատասխան նոսրացմամբ հստակ ծավալով մանրէային կախույթը (0.05 կամ 0.1 մլ) և ապակյա մածկաթիակով լավ տարածում սննդամիջավայրի ամբողջ մակերեսով: Պինդ սննդամիջավայրերի վրա ցանքը կատարում են վերջին երեք նոսրացված կախույթներից, ընդ որում, յուրաքանչյուրը 2-4 կրկնօրինակներով: Ցանքը կարելի է կատարել նույն պիպետով, բայց այդ դեպքում պետք է սկսել ամենափոքր խտություն ունեցող (ամենանոսր) կախույթից: Յուրաքանչյուր նոսրացման համար օգտագործում են նոր մանրէազերծված մածկաթիակ: Ցանքից հետո կափարիչներով ներքև շրջված Պետրիի թասերը տեղադրում են ջերմապահարանում:

Խորքային ցանքի դեպքում հստակ ծավալով (0.1, 0.5 կամ 1 մլ) նախնական նմուշը կամ համապատասխան նոսրացված կախույթն ավելացնում են սրվակներում լցված և տաքացմամբ հալեցված, բայց մինչև 45-50°C պաղեցված ագարացված սննդամիջավայրին, լավ խառնում են և անմիջապես լցնում Պետրիի թասերի մեջ՝ թողնելով սենյակային պայմաններում մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը: Մեծածավալ փորձերի դեպքում համապատասխան նոսրացված մանրէային կախույթը (1 մլ) մանրէազերծված պիպետով տեղադրում են 2-4 Պետրիի թասերի մեջ: Այնուհետև թասերի մեջ լցնում են 15-20 մլ տաքացմամբ հալեցված, բայց մինչև 45-50°C պաղեցված ագարացված սննդամիջավայրը, և խառնում սննդամիջավայրը ցանքանյութի հետ ժամսլաքի և հակառակ ուղղություններով դանդաղ պտուտակային շարժումներով: Թասերը թողնում են սենյակային ջերմաստիճանի պայմաններում մինչև սննդամիջավայրի պնդանա-



Նկար 47. Մանրէների կախույթի ցանքը խորքային եղանակով:

1. Մանրէների կախույթի տեղադրում Պետրիի թասի մեջ, 2. Պաղեցված սննդամիջավայրի ավելացում, 3. Բնկուբացում, 4. Բնկուբացումից հետո առաջացած գաղութներ:

լը, այնուհետև, կափարիչներով ներքև շրջված ինկուբացնում ջերմապահարանում (նկար 47):

Անաերոբ մանրէների բջիջների թվաքանակի որոշման համար Պետրիի թասերը պետք է ինկուբացնել անաերոստատում (տե՛ս նկար 16) կամ անաերոբային տարայում (տե՛ս նկար 15): Երբեմն անաերոբների թվաքանակի որոշման համար ագարային հեղուկ սննդամիջավայրը մանրէային կախույթով ինոկուլացնելուց հետո թողնում են սրվակներում: Պնդանալուց հետո օդի մուտքը սահմանափակելու համար սննդամիջավայրի մակերեսին ավելացնում են պարաֆին և ինկուբացնում ջերմապահարանում: Խիստ անաերոբ մանրէների թվաքանակի որոշման համար անհրաժեշտ է կիրառել Ռ. Հանգեյթի տեխնիկան:

Առաջացած գաղութների հաշվարկ: Կախված մանրէների աճի արագությունից գաղութների հաշվարկը կատարում են 1-15 օր ինկուբացնելուց հետո: Հաշվարկը, որպես կանոն, պետք է կատարել չբացելով Պետրիի թասերը: Հարմարավետության համար յուրաքանչյուր հաշված գաղութ Պետրիի թասի հատակի արտաքին մակերեսին նշում են կետով: Գաղութների մեծ թվաքանակի դեպքում թասի հատակը բաժանում են հատվածների, հաշվում գաղութների թիվը յուրաքանչյուր հատվածում և ընդհանրացնում ստացված տվյալները: Երբեմն հաշվարկման համար օգտագործում են հատուկ կիսաավտոմատ հաշվիչներ (նկար 48):

Նկար 48. Ագարացված սննդամիջավայրի վրա առաջացած գաղութների հաշվարկման համար կիսաավտոմատ հաշվիչ:

Ճիշտ է համարում այն նոսրացումը, երբ կախույթի ցանքից հետո Պետրիի թասում աճում են 30-50-ից մինչև 100-150 գաղութներ: Եթե գաղութների թիվը պակաս է 10-ից, ապա այդ տվյալները չեն օգ-

տագործվում նախնական նմուշում բջիջների թվաքանակի որոշման համար: Յուրաքանչյուր նոսրացված կախույթի միաժամանակ կատարված ցանքերի կրկնօրինակների տվյալները ընդհանրացնում են և հաշվում մեկ թասում առաջացած գաղութների միջին թիվը:

Հետազոտվող սուբստրատի 1 մլ-ում գտնվող բջիջների թվաքանակը (M) հաշվում են հետևյալ բանաձևով.

$$M = \frac{a \times 10^n}{V},$$

որտեղ a-ն տվյալ նոսրացումից կատարված ցանքից հետո աճած գաղութների միջին թվաքանակն է, V-ն՝ ցանքի համար օգտագործված կախույթի ծավալը, n-ը ՝ նոսրացման գործակիցը:

Բջիջների թվաքանակի որոշումը հեղուկ սննդամիջավայրերում ցանքի մեթոդով (սահմանային նոսրացումների մեթոդ)

Տվյալ մեթոդը կիրառում են այն մանրէների հետազոտության համար, որոնք չեն աճում, կամ վատ են աճում պինդ սննդամիջավայրերում: Հեղուկ սննդամիջավայր պարունակող սրվակների մեջ ավելացնում են հստակ ծավալով տարբեր նոսրացումներով նմուշներ: Համապատասխան պայմաններում ինկուբացնելուց հետո, ելնելով այն սրվակների թվից, որոնցում դիտվել է մանրէների աճ կամ աճի բացակայություն, հաշվում են նախնական նմուշի 1 մլ-ում բջիջների ամենահավանական թիվը: Սահմանային նոսրացումների մեթոդով բջիջների թվաքանակի որոշումը ներառում է նոսրացումների պատրաստումը, ցանքը հեղուկ սննդամիջավայրում, ինկուբացումից հետո մանրէների աճի առկայության կամ բացակայության ստուգումը և նախնական սուբստրատի միավոր ծավալում բջիջների ամենահավանական թվաքանակի որոշումը:

Նոսրացումների պատրաստում: Նախնական կախույթի նոսրացումները ստանում են ինչպես Կոխի մեթոդով նոսրացումների դեպքում:

Ցանքը և տվյալների հաշվարկը: Մանրէազերծված սննդամիջավայրը նախապես լցնում են սրվակների կամ անոթների մեջ: Սրվակների (անոթների) մեջ անհրաժեշտ է լցնել խիստ հստակ ծավալով սննդամիջավայր: Ցանքը կատարում են յուրաքանչյուր նոսրացումից կամ վերջին 4-5-րդ նոսրացված կախույթից, ընդ որում, յուրա-

քանչյուր նոսրացումից ցանում են 3-5 կրկնօրինակներով՝ ավելացնելով միևնույն ծավալի ցանքանյութ (1 մլ): Մանրէներով ինոկուլացված սննդամիջավայրերով սրվակները ինկուբացվում են ջերմապահարանում: Ինկուբացման տևողությունը կախված հետազոտվող մանրէների աճի առանձնահատկություններից տևում է 2-ից 15 օր: Ինկուբացումից հետո մանրէների աճը որոշում են ըստ մի շարք ցուցանիշների, օրինակ՝ սննդամիջավայրի պղտորությամբ, փառի կամ նստվածքի առաջացմամբ, գազի կամ սննդամիջավայրում նյութափոխանակության տարբեր արգասիքների կուտակմամբ:

Աղյուսակ 7.

Նախնական կախույթի միավոր ծավալում մանրէների բջիջների առավել հնարավոր թվաքանակը (ըստ Մակ-Քրեդիի)

Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում				Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում				Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում			
	2	3	4	5		2	3	4	5		2	3	4	5
000	0	0	0	0	222	110	3.5	2	1.4	433	-	-	30	-
001	0.5	0.3	0.2	0.2	223	-	4	-	-	434	-	-	35	-
002	-	-	0.5	0.4	230	-	3	1.7	1.2	440	-	-	25	3.5
003	-	-	0.7	-	231	-	3.5	2	1.4	441	-	-	40	4
010	0.5	0.3	0.2	0.2	232	-	4	-	-	442	-	-	70	-
011	0.9	0.9	0.5	0.4	240	-	-	2	1.4	443	-	-	140	-
012	-	-	0.7	0.6	241	-	-	3	-	444	-	-	160	-
013	-	-	0.9	-	300	-	2.5	1.1	0.8	450	-	-	-	4
020	0.9	0.6	0.5	0.5	301	-	4	1.6	1.1	451	-	-	-	5
021	-	-	0.7	0.6	302	-	6.5	2	1.4	500	-	-	-	2.5
022	-	-	0.9	-	303	-	-	2.5	-	501	-	-	-	0.3
030	-	-	0.7	0.6	310	-	4.5	1.6	1.1	502	-	-	-	4
031	-	-	0.9	-	311	-	7.5	2	1.4	503	-	-	-	6
040	-	-	0.9	-	312	-	11.5	3	1.7	504	-	-	-	7.5
041	-	-	1.2	-	313	-	16.5	3.5	2	510	-	-	-	3.5
100	0.6	0.4	0.3	0.2	320	-	9.5	2	1.4	511	-	-	-	4.5
101	1.2	0.7	0.5	0.4	321	-	15	3	1.7	512	-	-	-	6
102	-	1.1	0.8	0.6	322	-	20	3.5	2	513	-	-	-	8.5
103	-	-	1	0.8	323	-	30	-	-	520	-	-	-	5
110	1.3	0.7	0.5	0.4	330	-	25	3	1.7	521	-	-	-	7
111	2	1.1	0.8	0.8	331	-	45	3.5	2	522	-	-	-	9.5
112	-	-	1.1	0.8	333	-	110	4	-	523	-	-	-	12
113	-	-	1.3	-	340	-	140	5	-	524	-	-	-	15
120	2	1.1	0.8	0.6	341	-	-	3.5	2	525	-	-	-	17.5

Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում				Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում				Թվային բնութագրիչ	Մանրէների առավել հավանական թիվը կրկնօրինակ սրվակների թվում			
	2	3	4	5		2	3	4	5		2	3	4	5
121	3	1.5	1.1	1.8	350	-	-	4.5	2.5	530	-	-	-	8
122	-	-	1.3	1	400	-	-	-	2.5	531	-	-	-	11
123	-	-	1.6	-	400	-	-	2.5	1.3	532	-	-	-	14
130	-	1.6	1.1	1.8	401	-	-	3.5	1.7	533	-	-	-	17.5
131	-	-	1.4	1	402	-	-	5	2	534	-	-	-	20
132	-	-	1.6	-	403	-	-	7	2.5	535	-	-	-	25
140	-	-	1.4	1.1	410	-	-	6.5	1.7	540	-	-	-	13
141		-	1.7	-	411	-	-	5.5	2	541	-	-	-	17
200	2.5	0.9	0.6	0.5	412	-	-	8.2	2.5	542	-	-	-	25
201	5	1.4	0.9	0.7	412	-	-	8	-	543	-	-	-	30
202	-	2	1.2	0.9	414	-	-	14	-	544	-	-	-	35
203	-	-	1.6	1.2	420	-	-	6	2	545	-	-	-	45
210	6	1.5	0.9	0.7	421	-	-	6.5	2.5	550	-	-	-	25
211	13	2	1.3	0.9	422	-	-	17	-	551	-	-	-	35
212	2	3	1.6	1.2	423	-	-	13	3	552	-	-	-	60
213	-	-	2	-	424	-	-	20	-	553	-	-	-	90
220	25	2	1.3	0.9	430	-	-	11.5	1.5	554	-	-	-	100
221	70	3	1.6	1.2	431	-	-	16.5	3	555	-	-	-	180
					432	-	-	20	4					

Աղյուսակ 8.

Մանրէների թվաքանակի որոշման օրինակներ

Նախնական կախույթի նոսրացումներ	**Օրինակ 1**					**Օրինակ 2**				
	0	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**	**10^{-6}**
Սրվակների թիվը, որոնցում կատարվել է ցանք	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3
Սրվակների թիվը, որոնցում դիտվել է աճ	4	4	3	1	0	3	3	2	0	0
Թվային բնութագրիչ	431	-	-	-	-	320	-	-	-	-
Մանրէների առավել հավանական թիվը	16.5	-	-	-	-	9.5	-	-	-	-
Նախնական կախույթի 1 մլ-ում մանրէների առավել հավանական թիվը	165	-	-	-	-	9.5×10^{3}	-	-	-	-

Միավոր ծավալում մանրէների ամենահավանական թվաքանակի հաշվարկը կատարվում է ըստ Մակ-Քրեդիի աղյուսակի (աղյուսակ 7), որը կազմված է համաձայն վարիացիոն-վիճակագրական մեթոդի: Դրա համար նախ կազմում են թվային բնութագրիչ, որը ընդ-

գրկում է երեք թիվ: Ձախից առաջին թիվը ցույց է տալիս սրվակների թիվը այն վերջին նոսրացված կախույթի, որի ցանքից բոլոր կրկնօրինակներում դիտվել է մանրէների աճ: Մյուս երկու թվերը ցույց են տալիս սրվակների թիվը, որոնցում դիտվում է մանրէների աճը երկու հաջորդական նոսրացումներից:

Այնուհետև աղյուսակով գտնում են մանրէների առավել հավանական թիվը, որը համապատասխանում է տվյալ նշանակության թվային բնութագրիչին: Նախնական սուբստրատի 1 մլ-ում (1 գ-ում) մանրէների թվաքանակը համապատասխանում է այդ թվին՝ բազմապատկած այն նոսրացումների թիվը, որը վերցվել է թվային բնութագրիչի առաջին թվի ստացման համար: Աղյուսակ 8-ում բերված են օրինակներ:

Մանրէների թվաքանակի որոշման յուրաքանչյուր եղանակի ճշտությունը սահմանափակված է մեթոդի սխալով, որն առաջանում է կախույթում բջիջների պատահական բաշխման հետևանքով, ինչպես նաև տեխնիկական սխալներով, որոնց պատճառ կարող են լինել ոչ ճիշտ նոսրացված կախույթները, ոչ ճիշտ նախապատրաստված մազանոթային կամ Գորյաևի-Տոմի խցիկը, նույն գաղութի կրկնակի հաշվարկը և այլն: Անհրաժեշտ է հիշել, որ փորձի վիճակագրական վերլուծությունը հնարավոր է միայն նվազագույն տեխնիկական սխալների դեպքում: Կոխի և սահմանային նոսրացումների մեթոդները պահանջում են աշխատանքի բոլոր փուլերի հատուկ զգուշություն և ճշգրտություն: Անհրաժեշտ է նաև պահպանել պիպետների, սրվակների և սննդամիջավայրերի մանրէազերծվածությունը և խուսափել կոնտամինացումից:

Կենսազանգվածի որոշումը կշռելով

Այս մեթոդը լայնորեն կիրառվում է հեղուկ սննդամիջավայրում մանրէների աճը գնահատելու համար: Մեթոդը կիրառելի չէ, երբ մանրէներն աճեցվում են բարդ կազմությամբ և ջրում չլուծվող միացություններ պարունակող սննդամիջավայրերում Այս մեթոդը կարելի է օգտագործել նաև պինդ սննդամիջավայրերի վրա աճեցված մանրէների կենսազանգվածը որոշելու համար, սակայն այդ դեպքում անհրաժեշտ է նախօրոք ֆիզիոլոգիական լուծույթով կամ ջրով մանրէային բջիջները լավ լվանալ սննդամիջավայրի մակերեսից և ստանալ մանրէների կախույթ:

Կենսազգվածի որոշումն ընդգրկում է երեք հաջորդական գործողություններ՝ կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակների կամ ֆիլտրերի զանգվածները հաստատուն արժեքների բերելը, կախույթից բջիջների տարանջատումը, դրանց զանգվածի որոշումը: Ավելի հաճախ որոշում են բջիջների չոր զանգվածը, սակայն երբեմն կարելի է սահմանափակվել թաց քաշի որոշմամբ: Թաց քաշը որոշելիս առաջին փուլի իրականացումն անհրաժեշտ չէ, պետք է միայն կշռել կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակը կամ ֆիլտրը: Կենսազանգվածը սովորաբար արտահայտում են գրամներով կամ միլիգրամներով 1 լիտր կախույթում:

Կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակների կամ ֆիլտրերի զանգվածի հաստատուն արժեքների բերելը: Այս նպատակով Պետրիի թասերի մեջ նախօրոք տեղադրված ֆիլտրերը կամ կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակները (ոչ պլաստիկ) տեղադրում են ջերմախցիկներ և չորացնում 1-2 ժամ 80-85°C կամ 90-100°C ջեմաստիճանային պայմաններում: Այնուհետև ֆիլտրերը կամ սրվակները ջերմախցիկից տեղափոխում են կալցիումի քլորիդ ($CaCl_2$) կամ խիտ ծծմբական թթու պարունակող էքսիկատորի մեջ: Էքսիկատորը տեղադրում են վերլուծական կշեռքի մոտ: Մեկ ժամ հետո ֆիլտրերը (կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակները) կշռում են 0.0001 գ ճշգրտությամբ: Չորացումն ու կշռումը կրկնում են, պահպանելով վերը նշված գործողությունների հաջորդականությունը, մինչև զանգվածը կհասնի հաստատուն արժեքի, այսինքն՝ զանգվածի արժեքների տատանումները չեն գերազանցի միլիգրամի մեկ տասներորդ մասը:

1 2 3

Նկար 49. Կենտրոնախուսակներ (1, 3) և կենտրոնախուսման համար օգտագործվող սրվակներ (2):

Սննդամիջավայրից կենսազանգվածի տարանջատումը կարելի է իրականացնել կենտրոնախուսմամբ կամ ֆիլտրմամբ: Կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակի մեջ (նկար 49) լցնում են հստակ չափված ծավալով (կախված խտությունից՝ 5-20 մլ) լավ խառնված մանրէային կախույթ: Կենտրոնախուսման տևողությունը և պտույտների քանակությունը կախված են բջիջների չափսերից: Ինչքան փոքր են բջիջները, այնքան ավելի շատ պետք է լինի պտույտների թիվը և կենտրոնախուսման տևողությունը: Առավել հաճախ կենտրոնախուսում են 15-20 րոպե 3-5000 g արագացմամբ: Կենտրոնախուսումից հետո վերնստվածքային հեղուկը զգուշությամբ թափում են, նստվածքը լվանում թույլ թթվային թորած ջրով (1 մլ խիտ HCl-ը ավելացնել 1 լ թորած ջրին) և նորից կենտրոնախուսում: Վերնստվածքային հեղուկը թափում են անմիջապես կենտրոնախուսումն ավարտելուց հետո, քանի որ հակառակ դեպքում նըստվածքի մի մասը կարելի է կորցնել:

Ակտինոմիցետների և սնկերի միցելն առանձնացնում են ֆիլտրելով: Թղթե ֆիլտրը տեղադրում են ապակյա ձագարի մեջ, և հստակ չափված ծավալով (5-10 մլ) մանրային կախույթը ֆիլտրում են: Կենսազանգվածը մի քանի անգամ լվանում են թույլ թթվեցված թորած ջրով:

Բակտերիաների տարանջատման համար օգտագործում են թաղանթային ֆիլտրեր: Թաղանթային ֆիլտրերի ծակոտիների չափսերը պետք է լինեն ավելի փոքր, քան բակտերիաների բջիջների մեծությունը: Թաղանթային ֆիլտրը տեղադրում են անոթի մեջ տեղադրված հատուկ ծակոտկեն թիթեղի վրա: Ֆիլտրումն արագացնելու համար հարմարանքը միացնում են վակուումային պոմպին (տե՛ս նկար 22): Նստվածքը մի քանի անգամ լվանում են թույլ թթվեցրած թորած ջրով:

Կենսազանգվածի որոշումը: Բջիջների չոր զանգվածի որոշման համար մանրէների բջիջների նստվածքով սրվակը կամ ֆիլտրը տեղադրում են ջերմապահարան, չորացնում և կշռում: Չորացման և կշռման պայմանները նույնն են, ինչ որ կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակների կամ ֆիլտրերի չորացման և կշռման պայմանները: Չոր կենսազանգվածը (M, գ/լ) որոշում են հետևյալ բանաձևով.

$$M = \frac{(A - B)}{V} \times 10^3,$$

որտեղ A-ն նստվածքով սրվակի (ֆիլտրի) զանգվածն է (գ), B-ն՝ առանց նստվածքի կենտրոնախուսման համար նախատեսված սրվակի (ֆիլտրի) զանգվածը (գ), V-ն՝ կենտրոնախուսման կամ ֆիլտրման համար օգտագործած մանրէային կախույթի ծավալը (մլ): Մեթոդի ճշտությունը կախված է սննդամիջավայրի բաղադրամասերից, բջիջների առանձնացման և կշռման հստակությունից:

Բջիջների թվաքանակի և կենսազանգվածի որոշումը պղտորաչափական մեթոդով

Կենսազանգվածի որոշումն օպտիկական պղտորաչափական (նեֆելաչափական, տուրբիդաչափական) մեթոդով լայն կիրառություն է ստացել մանրէաբանական հետազոտություններում, քանի որ հնարավորություն է տալիս արագ և բավականին ճշգրիտ որոշել բջիջների խտությունը կախույթում:

Այս մեթոդի հիմքում ընկած է բջիջների կախույթով անցնելիս լուսային փնջի ուժգնության փոփոխության չափումը: Որոշակի սահմաններում այն հիմնականում պայմանավորված է բջիջներով լույսի ցրմամբ և համեմատական է դրանց կոնցենտրացիային: Այս ցուցանիշի արժեքը կախված է շատ գործոններից (բջիջների ձևից և չափերից, կախույթի օպտիկական հատկություններից, լույսի ալիքի երկարությունից և այլն), այդ պատճառով պղտորաչափական եղանակը հարմար է կիրառել միայն այն մանրէների թվաքանակը կամ կենսազանգվածը որոշելու համար, որոնց աճն ընթանում է սննդամիջավայրի համաչափ պղտորմամբ և չի ուղեկցվում բջիջների ձևի և չափսերի կտրուկ փոփոխությամբ, միցելիումի, փառի, նստվածքի կամ այլ կուտակումների առաջացմամբ:

Մանրէների աճի համար սննդամիջավայրը, որում լույսի ցրմամբ որոշվում է մանրէների բջիջների թիվը, պետք է լինի օպտիկապես թափանցելի:

Լույսի ուժգնության փոփոխությունը չափում են պղտորաչափով, լուսաէլեկտրագունաչափով կամ սպեկտրալուսաչափով՝ ընտրելով ալիքի այն երկարությունը (սովորաբար 540-650 նմ սահմաններում), որում տվյալ բջջային կախույթի կլանումը նվազագույնն է (նկար 50): Կախույթում բջիջների բարձր կոնցենտրացիայի դեպքում տեղի է ունենում լույսի երկրորդային ցրում, ինչը հանգեցնում է տվյալների աղճատման:

Որոշ դեպքերում բջջային կախույթի խտությունն արտահայտում են պղտորաչափի ցուցմունքներով: Սակայն հաճախ կառուցում են լուսացրման ցուցանիշների և բջիջների թվաքանակի կամ միավոր ծավալում չոր կենսազանգվածի միջև համադրելի կորեր: Այդպիսի կորերը կառուցում են հետևյալ կերպ: Չափում են բջիջների տարբեր կոնցենտրացիաներով կախույթների օպտիկական խտությունները և յուրաքանչյուրում որոշում բջիջների թվաքանակը կամ կենսազանգվածը վերը նշված որևէ մեթոդով: Ստացված տվյալներն արտահայտում են գրաֆիկորեն, օրդինատների առանցքում նշելով պղտորաչափի տվյալները, իսկ աբսցիսների առանցքում՝ 1 մլ կախույթում եղած բջիջների թիվը կամ կենսազանգվածը, գ/լ-ով: Յուրաքանչյուր մանրէի համար պետք է կառուցել իրեն համապատասխան համադրելի կոր:

Նկար 50. Սպեկտրալուսաչափ (աջից) և լուսաէլեկտրագունաչափ (ձախից):

Որոշ դեպքերում կախույթում բջիջների թվաքանակը բավական է լինում որոշել՝ համեմատելով պղտորության չափորոշիչների հետ: Պղտորության չափորոշիչներն իրենցից ներկայացնում են թորած ջրում պիրեկս ապակու կախույթներ: Որպես պղտորության չափորոշչի միավոր պայմանականորեն ընդունվում է ֆիզիոլոգիական լուծույթում 100 մլն/մլ կոնցենտրացիայով տիֆի հարուցչի կախույթի պղտորությունը: Պղտորության չափորոշիչն ընդգրկում է չորս էտալոն 11, 10, 9 և 5 միավորներով, որոնք համապատասխանում են 1 մլ կախույթում համապատասխանաբար 1.1×10^9; 1×10^9; 0.9×10^9 և 0.5×10^9 բջիջների թվաքանակին: Բջիջների թվաքանակի որոշման համար սրվակը հետազոտվող կախույթով տեղադրում են էտալոն 10-ի կող-

քին և դիտում են կենտրոնում սև գծեր ունեցող սպիտակ թղթի ֆոնի վրա անդրադարձվող և թափանցող լույսում: 9 և 11 էտալոնները համարվում են օժանդակ, որոնք թույլ են տալիս առավել հստակ համեմատել հետազոտվող բակտերիաների կախույթը էտալոնի հետ: Բակտերիաների կախույթի պղտորության չափորոշումը (առավել հաճախ թեստ օրգանիզմների դեպքում) կարևոր նշանակություն ունի հաջորդական փորձերում ցանքանյութի պատրաստման համար, օրինակ՝ ագարում դիֆուզիայի մեթոդով հակաբակտերիական ակտիվությունը որոշելիս:

Հոսքային բջջաչափման մեթոդ

Հոսքային բջջաչափման մեթոդը և համապատասխան սարքը մշակվել էր արյան ձևավոր տարրերի հաշվարկման նպատակով: Որոշակի կատարելագործումից հետո հոսքային բջջաչափը սկսեցին օգտագործել նաև մանրէային բջիջների հաշվարկման նպատակով (նկար 51): Մեթոդի սկզբունքը հիմնված է մազանոթով մասնիկի անցման ընթացքում լուսային կամ էլեկտրոնային ազդակի գրանցման վրա: Տարբեր բջիջներ լուսային ճառագայթը տարբեր կերպ են ցրում, ուստի կարելի է տարբերակված ձևով իրականացնել տարբեր բջիջների հաշվարկը: Սակայն այս սարքը գրանցում է ինչպես անցնող բջիջը (մահացած կամ կենդանի), այնպես էլ՝ ցանկացած այլ մասնիկ: Դա շրջանցելու համար նմուշներում բջիջները նախա-

Նկար 51. Հոսքային բջջաչափ:

պես ներկում են հատուկ լուսածորող ներկանյութերով և հաշվարկում միայն լուսածորող բջիջները: Եթե մանրէային կախույթը նախապես մշակվի տարբեր լուսածորող ներկանյութերով, որոնք տարբեր կերպ են ներկում կենդանի և մահացած բջիջները, ապա միևնույն նմուշում հնարավոր կլինի տարբերակված հաշվարկել կենդանի և անկենդան բջիջների թվաքանակը:

ԳԼՈՒԽ 7 ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՅԻՆ, ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԵՎ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Մի շարք խնդիրների լուծման համար բավական է որոշել մանրէների կուլտուրաների միայն որոշ դրսևորվող հատկանիշները և ֆիզիոլոգիական ու կենսաքիմիական առանձնահատկությունները: Դրանց իմացությունը մանրէների ձևաբանական բնութագրի հետ մեկտեղ երբեմն թույլ է տալիս պարզաբանել հետազոտվող մանրէի պատկանելությունը այս կամ այն տաքսոնին՝ դասին, կարգին, ընտանիքին:

Կուլտուրային հատկությունները

Կուլտուրային կամ մակրոձևաբանական հատկություններին են վերագրվում մանրէների աճի բնութագրական առանձնահատկությունները պինդ և հեղուկ սննդամիջավայրերում աճելիս:

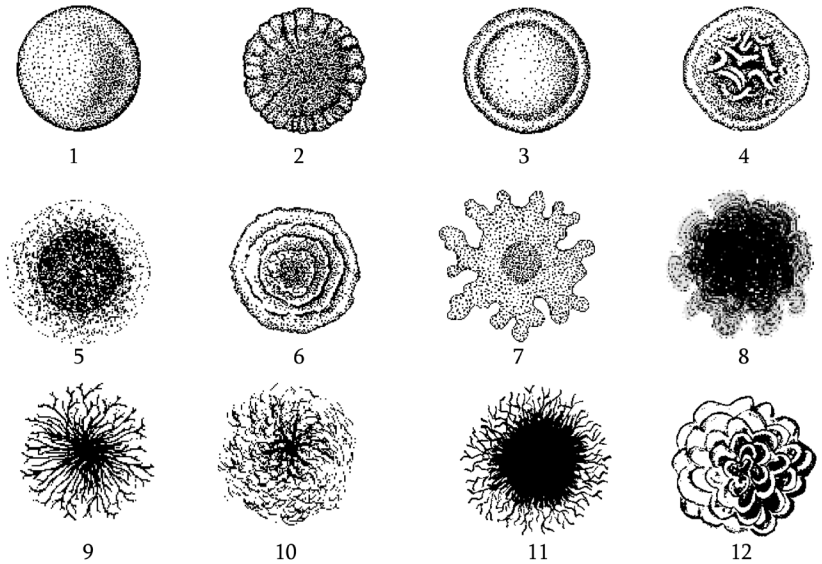
Աճը պինդ սննդամիջավայրերի վրա

Կախված ցանքի բնույթից պինդ սննդամիջավայրերի մակերեսին մանրէները կարող են աճել առանձին գաղութների, գծային կամ համատարած աճի (գազոնի) տեսքով: Գաղութ են անվանում մեկ տեսակի բջիջների մեկուսացված կուտակումը, որն առաջացել է մեկ բջջից: Կախված, թե որտեղ են զարգանում բջիջները՝ պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին, դրա խորքում, թե անոթի հատակին, տարբերում են մակերեսային, խորքային և հատակային գաղութներ: Պինդ սննդամիջավայրի վրա մակերեսային գաղութների առաջացումը բազմաթիվ մանրէների աճի բնութագրական առանձնահատկությունն է: Մակերեսային գաղութները տարբերվում են մեծ բազմազանությամբ: Դրանց նկարագրման ընթացքում հաշվի են առնում հետևյալ առանձնահատկությունները.

- ձևը (կլոր, ամեոբաձև, տձև, արմատաձև և այլն) (նկար 52),
- չափսը կամ տրամագիծը (չափում են միլիմետրերով, իսկ եթե

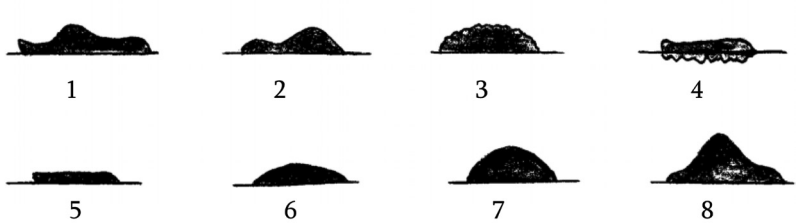
գաղութի չափսերը չեն գերազանցում 1 մմ-ը, ապա դրանց անվանում են կետային),

- մակերեսը (հարթ, խորդուբորդ, ակոսավոր, ծալքավոր, կընճռոտ, խիտ շրջաններով կամ ճառագայթային գծապատկերով),
- պրոֆիլը (տափակ, ուռուցիկ, խառնարանային, կոնաձև և այլն) (նկար 53),
- փայլը և թափանցիկությունը (փայլուն, անփայլ, պղտոր, փոշենման, թափանցիկ),
- գույնը (անգույն կամ գունավոր՝ սպիտակ, դեղին, ոսկեգույն, նարնջագույն, մանուշակագույն, կարմիր, սև և այլն՝ նշելով գունանյութի արտազատումը սուբստրատի մեջ, իսկ ակտինոմիցետների գաղութների նկարագրման ընթացքում՝ նշելով նաև օդային և սուբստրատային միցելիումի գունավորվածությունը),
- եզրը (հարթ, ալիքաձև, ատամնաձև, ծոփքավոր և այլն) (նկար 54),
- կառուցվածքը (միասեռ, մանր կամ խոշոր հատիկավոր, շիթանման և այլն (նկար 55), ընդ որում, գաղութի եզրը և կառուցվածքը որոշում են խոշորացույցի օգնությամբ կամ մանրադիտակի փոքր խոշորացմամբ՝ Պետրիի թասը կափարիչը նեքն շրջված տեղադրելով մանրադիտակի առարկայական սեղանիկի վրա,
- կազմությունը կամ կոնսիստենցիան (որոշում են՝ մանրէաբանական ասեղը հպելով գաղութի մակերեսին. գաղութը կարող է հեշտությամբ պոկվել ագարից, լինել խիտ, փափուկ կամ սերտաճած ագարի մեջ, լորձային (կպչում է ասեղին), մածուցիկ, ունենալ թաղանթի տեսք (պոկվում է ամբողջությամբ), լինել փխրուն և հեշտությամբ կոտրվել ասեղով դիպչելիս):



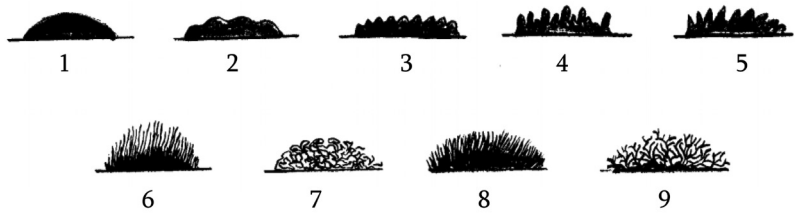
Նկար 52. Գաղութի ձևը:

1. Կլոր, 2. Կլոր ժանևրիզավոր, 3. Կլոր թմբաշև եզրով, 4. Կնճռոտ, 5 և 6. Համակենտրոն, 7. Ամեոբաշև, 8 և 9. Ճառագայթաշև, 10. Թելաշև, 11. Կլոր ճառագայթաշև եզրերով, 12. Բարդ:

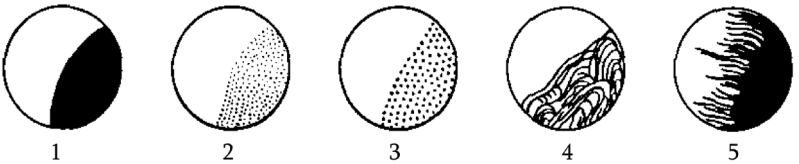


Նկար 53. Գաղութի պրոֆիլը:

1. Կորացած, 2. Խառնարանային, 3. Բլրածածկ, 4. Սենդամիջավայրի մեջ ներածած, 5. Տափակ, 6. Ուռուցիկ, 7. Կաթիլային, 8. Կոնաշև:



Նկար 54. Գաղութի եզրը:
1. Հարթ, 2. Ալիքաձև, 3. Ատամնաձև, 4. Թիակաձև, 5. Անկանոն, 6. Թարթչաձև, 7. Թելաձև, 8. Ծոփքավոր, 9. Ճյուղավորված:



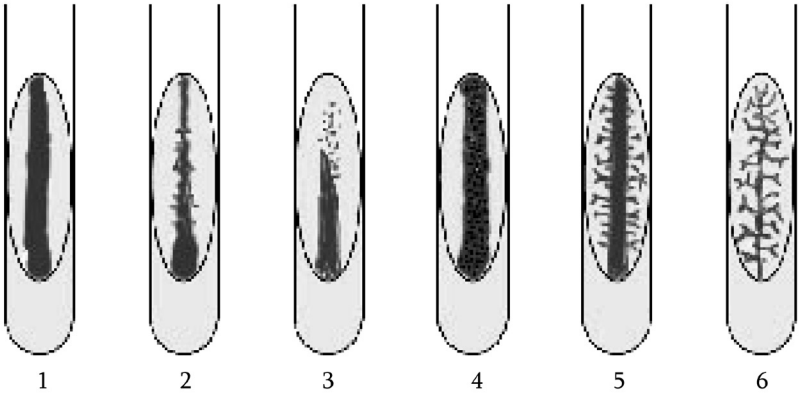
Նկար 55. Գաղութի կառուցվածքը:
1. Միասեռ, 2. Մանր հատիկավոր, 3. Խոշոր հատիկավոր, 4. Շիթանման, 5. Թելանման:

Խորքային գաղութները, ընդհակառակը, բավականին միատարր են, հաճախ դրանք ոսպաձև են, պրոեկցիայում ձվաձև են՝ սրացած եզրերով: Որոշ բակտերիաների խորքային գաղութները սննդամիջավայրում հիշեցնում են թելաձև ելուստներով բամբակի փնջեր կամ ձյան փաթիլներ: Ածխաթթու կամ այլ գազերի բուռն արտադրությամբ բնորոշվող մանրէների խորքային գաղութների առաջացման ընթացքում պինդ սննդամիջավայրերը հաճախ ճեղքվում են:

Տարբեր մանրէների հատակային գաղութները սովորաբար ունեն անոթի հատակին կպած բարակ թափանցիկ շերտերի տեսք:

Գաղութի չափսերը և բազմաթիվ այլ առանձնահատկություններ կարող են փոփոխվել տարիքի հետ և կախված են սննդամիջավայրի կազմից: Այդ պատճառով դրանց նկարագրելիս նշում են կուլտուրայի տարիքը, սննդամիջավայրի կազմը և աճեցման ջերմաստիճանը: Մանրէների գծային աճը նկարագրելիս նշում են հետևյալ առանձնահատկությունները՝ սակավ, չափավոր կամ առատ աճը, պինդ, հարթ կամ ալիքաձև եզրերը, պարզ նկատելի, առանձին գաղութների շղթաներից կազմված (համրիչանման), տարածված, փետրաձև կամ արմատաձև տեսքը (նկար 56): Բնութագրում են փառի օպտիկական հատկությունները՝ գույնը, մակերևույթը և կազմությու-

նը: Առանձին գաղութները կամ գծային տեսքով աճը նկարագրելու համար մանրէները հաճախ աճեցվում են ՄՊԱ-ի կամ ժելատինային սննդամիջավայրերի վրա:



Նկար 56. Մանրէների գծային աճը:
1. Համապարած հարթ եզրով, 2. Համապարած ալիքաձև եզրով, 3. Համրիչանման, 4. Տարածվող, 5. Փետրաձև, 6. Արմատաձև:

Աճը հեղուկ սննդամիջավայրում

Մանրէների աճը հեղուկ սննդամիջավայրում ավելի միատեսակ է և ուղեկցվում է սննդամիջավայրի պղտորությամբ, փառի կամ նստվածքի առաջացմամբ: Բնութագրելով մանրէների աճը հեղուկ սննդամիջավայրերում՝ նշում են պղտորության աստիճանը՝ թույլ, չափավոր կամ ուժեղ, փառի առանձնահատկությունները՝ բարակ, պինդ կամ փխրուն, հաստ կամ ծալքավոր, իսկ նստվածքի առաջացման դեպքում նշում են այն սակավ է, թե՞ առատ, պինդ է, թե՞ փլխրուն, լորձային է, թե՞ փաթիլանման:

Հաճախ մանրէների աճը ուղեկցվում է հոտի առաջացմամբ, սննդամիջավայրի գունավորմամբ, գազային նյութերի արտազատմամբ: Վերջինս հայտնաբերում են փրփուրի, պղպջակների առաջացմամբ, ինչպես նաև լողանների օգնությամբ: Լողանը տեղադրում են սրվակի մեջ փակ ծայրով դեպի վեր նախքան սննդամիջավայրի մանրէազերծումը և հետևում են, որպեսզի այն ամբողջությամբ լցված լինի սննդամիջավայրով: Գազառաջացման դեպքում գազը կու-

տակվում է լողաններում պղպջակների տեսքով:

Հեղուկ սննդամիջավայրերում մանրէների աճի նկարագրման համար դրանց աճեցնում են մսապեպտոնային արգանակում կամ աճը լավ ապահովող այլ սննդամիջավայրերում:

Ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունները

Մանրէների ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական առանձնահատկությունների բնութագիրը ներառում է տարբեր սննդամիջավայրերի վրա աճելու և այդ սննդամիջավայրերի բաղադրության մեջ մտնող նյութերի որոշակի փոխակերպումներ առաջացնելու ունակության նկարագրությունը: Հաշվի են առնվում ածխածնի, ազոտի և ծծմբի տարբեր միացությունների յուրացումը, մոլեկուլային թթվածնի նկատմամբ վերաբերմունքը, հակաբիոտիկային նյութեր առաջացնելու և որոշակի սուբստրատների նկատմամբ ֆերմենտային ակտիվություն դրսևորելու ունակությունը: Որոշ դեպքերում որոշվում է նաև մանրէների զգայունությունն այս կամ այն հակաբիոտիկի նկատմամբ:

Ածխածնի միացությունների յուրացումը

Մանրէները բնութագրվում են ածխածնի տարբեր միացությունները յուրացնելու ոչ միանման ունակությամբ: Ածխածին պարունակող այս կամ այն նյութերի հաշվին մանրէների աճի ունակությունը պարզելու համար դրանք սովորաբար ցանում են սինթետիկ սնընդամիջավայրերում, որոնք որպես ածխածնի միակ աղբյուր պարունակում են տարբեր մոնո-, երկ- և բազմաշաքարներ, բազմատոմ սպիրտներ, օրգանական թթուներ, ածխաջրածիններ: Ածխաջրերից և բազմատոմ սպիրտներից որպես կանոն, փորձարկում են հետևյալ միացությունները՝ արաբինոզ, քսիլոզ, ռամնոզ, գլյուկոզ, ֆրուկտոզ, մաննոզ, գալակտոզ, սորբոզ, սախարոզ, լակտոզ, մալտոզ, տրեգալոզ, ցելոբիոզ, ռաֆինոզ, դեքստրին, օսլա, ինուլին, ցելյուլոզ, գլիցերոլ, էրիթրիտոլ, մանիտոլ, դուլցիտոլ, սորբիտոլ, ինոզիտոլ, սալիցին:

Մանրէների ածխաջրեր և սպիրտներ յուրացնելու ունակության որոշումը: Պատրաստում են սննդամիջավայրի հիմնական ֆոնը, որն ունի հետևյալ բաղադրությունը (գ/լ). պեպտոն 5, K_2HPO_4 1, թորած

ջուր: Կախված մանրէների ֆիզիոլոգիական առանձնահատկություններից կարելի է կիրառել սննդամիջավայրի հիմնական ֆոնի այլ կազմ: Օրինակ՝ կորինեբակտերիաների համար խորհուրդ է տրվում կիրառել հետևյալ բաղադրությամբ ֆոնային սննդամիջավայրը (գ/լ). $(NH_4)_2SO_4$ 2.6, KH_2PO_4 2.4, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, միկրոտարրերի լուծույթ 0.1 մլ, թորած ջուր: Միկրոտարրերի լուծույթի բաղադրությունն է՝ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.64 գ, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11 գ, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.79 գ, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 գ, թորած ջուր 100 մլ: Լուծույթը պատրաստում են առանձին և պահում 3-5°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Մանրէների աճն ածխաջրերով կամ բազմատոմ սպիրտներ պարունակող սննդամիջավայրերում հաճախ ուղեկցվում է օրգանական թթուների, չեզոք արգասիքների, գազերի կուտակմամբ: Թթուների առաջացումը գրանցում են սննդամիջավայրի pH-ի փոփոխությամբ: Դրա համար հիմնական ֆոնին ավելացնում են հայտանյութ: Սովորաբար 1 լ սննդամիջավայրին ավելացնում են 2 մլ հայտանյութի 1.6% սպիրտային լուծույթ: Որպես հայտանյութ հաճախ կիրառվում է բրոմթիմոլկապույտը, որը սննդամիջավայրի գույնը pH 6-7.6 միջակայքում փոխում է դեղինից կապույտ, կամ բրոմկրեզոլ ծիրանագույնը, որը սննդամիջավայրի գույնը pH 6.8-5.2 միջակայքում փոխում է ծիրանագույնից դեղին: Սննդամիջավայրի հիմնական ֆոնը հայտանյութ ավելացնելուց հետո լցնում են սրվակների մեջ (8-10 մլ-ական), յուրաքանչյուր սրվակի մեջ տեղադրում են լողան և մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 5 րոպեի ընթացքում:

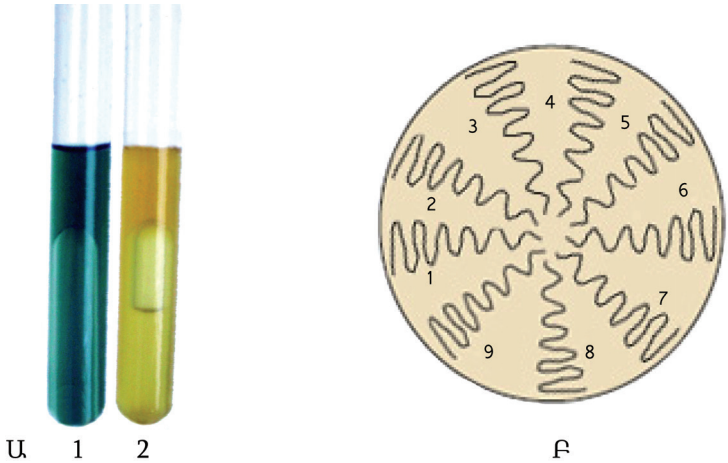
Ածխաջրերը և բազմատոմ սպիրտները պատրաստում են 10-40% ջրային լուծույթների ձևով և մանրէազերծում են ավտոկլավում սննդամիջավայրի հիմնական ֆոնից առանձին 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում կամ ֆիլտրմամբ: Սննդամիջավայրի բաղադրամասերի առանձին մանրէազերծումը պայմանավորված է ֆոսֆատների և սննդամիջավայրի այլ բաղադրամասերի առկայությամբ ավտոկլավում մանրէազերծելիս շաքարների մասամբ քայքայմամբ և մանրէների համար թունավոր միացությունների առաջացմամբ: Մանրէազերծված լուծույթները սննդամիջավայրի հիմնական ֆոնին ավելացնում են այն քանակությամբ, որպեսզի շաքարի (կամ բազմատոմ սպիրտի) վերջնական կոնցենտրացիան սննդամիջավայրում կազմի 10 գ/լ: Սննդամիջավայրերը ինոկուլացնում են մանրէների բջիջների կախույթով և պահում 1-5 օր համապատասխան ջերմաստիճանային պայմաններում: Դանդաղ աճող մանրէները ինկուբացնում են 7-10 օր: Աճը կամ դրա բացակայությունը ածխածնի

տվյալ աղբյուրով սննդամիջավայրում որոշում են սննդամիջավայրի պղտորությամբ, փառի կամ նստվածքի առաջացմամբ: Հայտանյութի գույնի փոփոխությունը վկայում է նյութափոխանակության թթու կամ հիմնային (պեպտոնի քայքայման հետևանքով) արգասիքների առաջացման մասին: Գազառաջացման մասին վկայում է գազի պղպջակների կուտակումը լողաններում (նկար 57 Ա): Ուսումնասիրությունների արդյունքները համեմատում են մանրէների աճի ցուցանիշների հետ ստուգիչ (ֆոնային) սննդամիջավայրում, որում չի պարունակվում փորձարկվող ածխածնի աղբյուրը:

Ածխաջրեր և բազմատոմ սպիրտներ յուրացնելու մանրէների ունակությունը կարելի է որոշել՝ դրանք աճեցնելով պինդ սննդամիջավայրի վրա: Տվյալ դեպքում ածխաջրի կամ սպիրտի մանրէազերծված լուծույթն ավելացնում են մանրէազերծված, ագարացված և հալեցված սննդամիջավայրին, լավ խառնում են և լցնում մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ: Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո Պետրիի թասի հատակի արտաքին մակերեսը թանաքով կամ մատիտով բաժանում են հատվածների: Այնուհետև մանրէների հետազոտվող կուլտուրաներից յուրաքանչյուրը մանրէաբանական օղակով ճառագայթային կամ զիգզագաձև գծերով տարածում են սնընդամիջավայրի մակերեսի առանձին հատվածներում (նկար 56 Բ):

Որպես ցանքանյութ օգտագործում են բջիջների կախույթները, որոնք ստացվում են շեղակների մակերեսից բջիջների լվացմամբ: Աճեցման տևողությունը 2-10 օր է: Արդյունքների մասին դատում են մանրէների աճի ցուցանիշներով՝ համեմատելով ածխածնի համապատասխան աղբյուր չպարունակող ստուգիչ սննդամիջավայրի մակերեսին մանրէի աճի ցուցանիշների հետ: Այս մեթոդը թույլ է տալիս մեկ Պետրիի թասերում միաժամանակ ստուգելու մի քանի մանրէային կուլտուրաների այս կամ այն սուբստրատը յուրացնելու ունակությունը:

Բազմաթիվ մանրէներ որպես ածխածնի միակ աղբյուր ունակ



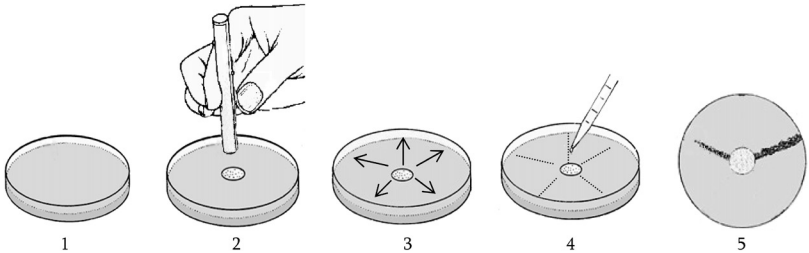
Նկար 57. Մանրէների ածխաջրեր յուրացնելու ունակության որոշում:
Ա) Որոշումը հեղուկ սննդամիջավայրում. 1. Ստուգիչ, 2. Ածխաջրերի խմորումն ընթանում է թթվառաջացմամբ, որը դիտվում է սննդամիջավայրի գույնի փոփոխությամբ, իսկ գազառաջացումը՝ լողանում գազի կուտակմամբ, Բ) Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին տարբեր մանրէների (1-9) ցանք:

են յուրացնելու նաև օրգանական թթուները: Օրգանական թթուներ պարունակող սննդամիջավայրերում մանրէների աճի ունակությունը որոշելու համար պատրաստվում է հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայր (գ/լ). $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 0.1, ագարագար 15, օրգանական թթու՝ Na-ական կամ K-ական աղի ձևով 2, pH 6.8: Մինչև մանրէազերծումը սննդամիջավայրին ավելացնում են 20 մլ հայտանյութի (օրինակ՝ մեթիլռոտի) 0.04% ջրային լուծույթ, որը սննդամիջավայրի գույնը փոխում է դեղինից կարմիր pH 6.8-8.4 միջակայքում: Հայտանյութ պարունակող սննդամիջավայրը լցնում են սրվակների մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Ցանքը կատարում են մանրէաբանական ասեղով վերը նշված ձևով: Աճեցման տևողությունը 2-14 օր է՝ կախված մանրէների աճի առանձնահատկություններից: Օրգանական թթուների յուրացման մասին վկայում են մանրէաբանական ասեղով ցանքի հետագծով և սննդամիջավայրի pH-ի հիմնայնացման արդյունքում հայտանյութի գույնի փոփոխությամբ (նկար 58):

Որոշ մանրէներ ունակ են յուրացնելու նաև քիմիապես կայուն

Նկար 58. Na-ցիտրատը յուրացնելու մանրէների ունակության որոշումը:
1. Սննդամիջավայրի գույնի անփոփոխ մնալը վկայում է, որ Na-ցիտրատը չի յուրացվել, 2. Սննդամիջավայրի գույնի փոփոխությունը վկայում է Na-ցիտրատի յուրացման մասին:

այնպիսի միացություններ, ինչպիսիք են ածխաջրածինները: Հեղուկ չցնդող ածխաջրածիններն օքսիդացնելու մանրէների ունակությունը կարելի է հայտնաբերել՝ մանրէները աճեցնելով հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայրի մակերեսին (գ/լ). KNO_3 4, KH_2PO_4 0.6, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8, ագար-ագար 20, pH 7.2: Սննդամիջավայրը մանրէազերծում են ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում, ապա հաստ շերտով լցնում Պետրիի թասերի մեջ: Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո ագարային շերտի կենտրոնում շրջանաձև կտրվածք (փոսիկ) են անում: Այդ նպատակով կարելի է օգտագործել սովորական դակիչ (տրամագիծը 8-10 մմ) (նկար 59), որը մանրէազերծում են սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցով: Մանրէները ցանում են ճառագայթաձև հետագծերով և կենտրոնախույս ուղղությամբ՝ փոսիկից մինչև թասի ծայրերը (նկար 59): Փոսիկի մեջ լցնում են նախապես ֆիլտրմամբ մանրէազերծված հետազոտվող ածխաջրածնի 2-3 կաթիլ: Միևնույն թասում կարելի է ստուգել մի քանի մանրէային կուլտուրաների աճը: Թասերը հորիզոնական դիրքով և առանց շրջելու (կափարիչները դեպի վեր) տեղադրում են ջերմապահարանում: 7-10 օր ինկուբացնելուց հետո նշում են ցանքի հետագծով աճի առկայությունը կամ բացակայությունը՝ համեմատելով ածխաջրածին չպարունակող ստուգիչ սննդամիջավայրի վրա աճի հետ:



Նկար 59. Մանրէների ածխաջրածին յուրացնելու ունակության որոշումը:
1. Պինդ սննդամիջավայր, 2. Դակիչով պինդ սննդամիջավայրի կենտրոնում փոսիկի դակում, 3. Մանրէների ցանք կենտրոնախույս ուղղությամբ, 4. Մանրէազերծված ածխաջրածնի ավելացում փոսիկում, 5. Մանրէների աճ:

Ազոտի միացությունների յուրացումը

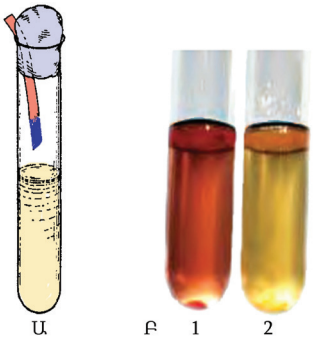
Ազոտի այս կամ այն միացությունը յուրացնելու մանրէների ունակությունը որոշելու համար դրանք աճեցնում են համապատասխան սննդամիջավայրերի վրա:

Ազոտ պարունակող օրգանական նյութերի յուրացումը

Բազմաթիվ մանրէներ ունակ են յուրացնել ազոտ պարունակող օրգանական միացությունները, օրինակ՝ պեպտոնները, ամինաթթուները և սպիտակուցները: Սպիտակուցի ֆերմենտային հիդրոլիզի արդյունքում առաջացած ամինաթթուները անմիջականորեն օգտագործվում են կամ բջջում ընթացող կենսասինթեզի գործընթացներում, կա՛մ շնչառության, կա՛մ խմորման գործընթացներում ճեղքվում են ավելի պարզ միացությունների: Սպիտակուցի քայքայումը միշտ ուղեկցվում է կողմնակի արգասիքների, օրինակ՝ ամոնիակի (ամոնիֆիկացման գործընթացում), ծծմբաջրածնի կամ ինդոլի առաջացմամբ, որոնք անջատվում են համապատասխանաբար դեզամինացման, ծծումբ պարունակող ամինաթթուների (ցիստին, ցիստեին, մեթիոնին) քայքայման և տրիպտոֆանի քայքայման արդյունքում: Հետևաբար, այս արգասիքների հայտնաբերումը սննդամիջավայրում մանրէների աճի ընթացքում վկայում է ամինաթթուները յուրացնելու մանրէների ունակության մասին: Ավելին՝ ամոնիֆիկացման գործընթացը միշտ ուղեկցվում է սննդամիջավայրի հիմնայնացմամբ:

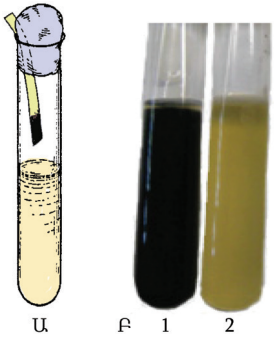
Ամոնիակի հայտնաբերումը: Դեզամինացման գործընթացում ամոնիակ առաջացնելու մանրէների ունակությունը կարելի է հայտնաբերել՝ դրանք աճեցնելով մսապեպտոնային արգանակում: Դրա համար յուրաքանչյուր սրվակի մեջ լցնում են 8-10 մլ մսապեպտոնային արգանակ և մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Ցանքից հետո սրվակի և բամբակյա խցանի միջև տեղադրում են նախապես մանրէազերծված լակմուսային թղթի նեղ կտորն այնպես, որպեսզի այն չդիպչի սննդամիջավայրին: Լակմուսային թուղթը, տեղադրելով Պետրիի թասի մեջ, մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Ինկուբացման ընթացքում ամոնիակի ցնդումը կանխելու նպատակով ցանկալի է սրվակի խցանը փաթաթել պոլիէթիլենով: Ամոնիակի առաջացման դեպքում կարմիր լակմուսը կապտում է (նկար 60 Ա):

Եթե որպես սննդամիջավայր օգտագործում են 4% պեպտոնաջուրը, ապա ամոնիակի առաջացումը հայտնաբերում են Նեսլերի ռեակտիվով (ռեակտիվի պատրաստումը տես հավելված 2-ում): Հախճապակյա թիթեղի վրա կաթեցնում են պեպտոնաջրում աճեցված մանրէային կախույթի մի քանի կաթիլ և ավելացնում մեկ կաթիլ Նեսլերի ռեակտիվ: Նեսլերի ռեակտիվը կարելի է անմիջապես ավելացնել նաև մանրէային կախույթին: Ամոնիակի հետքերի առկայության դեպքում հեղուկը ներկվում է դեղին գույնով, իսկ ամոնիակի մեծ քանակության դեպքում առաջանում է շագանակագույն կամ դարչնագույն նստվածք (նկար 60 Բ):



Նկար 60. Մանրէների ամոնիֆիկացման ունակության հայտնաբերումը:
Ա) Առաջացած ամոնիակի ազդեցությամբ լակմուսային թղթի կապտում, Բ) Կախույթի մշակումը Նեսլերի ռեակտիվով. 1. Առաջացնում են ամոնիակ, 2. Ամոնիակ չեն առաջացնում:

Ծծմբաջրածնի հայտնաբերումը: Ծծմբաջրածին արտադրելու մանրէների ունակության որոշումը հիմնված է մետաղների սուլֆիդների առաջացման ռեակցիայի վրա: Առավել տարածված եղանակը քացախաթթվային կապարով փորձն է: Դրա համար նախ մանրէներն աճեցնում են մսապեպտոնային արգանակում, որը պարունակում է 0.01% ցիստին և ցիստեին: Այս ամինաթթուները սննդամիջավայրին ավելացնում են թթվային թորած ջրային լուծույթի ձևով՝ նախապես մանրէազերծելով ֆիլտրմամբ: Հետազոտվող մանրէային կուլտուրայի ցանքից հետո սրվակի և բամբակյա խցանի միջև տեղադրում են մանրէազերծված ֆիլտրի թղթի նեղ կտոր, որը ներծծված է քացախաթթվային կապարի լուծույթով (պատրաստումը տե՛ս հավելված 2-ում): Քացախաթթվային լուծույթով ներծծված ֆիլտրի թղթի կտորները տեղադրում են Պետրիի թասի կամ սրվակի մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամմ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Ինկուբացման ընթացքում (7-10 օր) ծծմբաջրածնի ցընդումը կանխելու նպատակով ցանկալի է սրվակի բամբակյա խցանը ծածկել պոլիէթիլենով: Ծծմբաջրածնի անջատումը ուղեկցվում է կապարի սուլֆիդի առաջացման հետևանքով ֆիլտրի թղթի սևացմամբ (նկար 61 Ա):

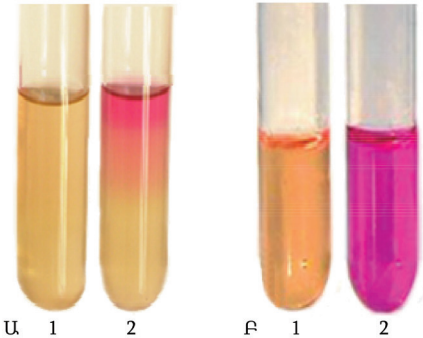


Նկար 61. Ծծմբաջրածին արտադրելու մանրէների ունակության հայտնաբերումը:
Ա) Ծծմբաջրածնի առկայությամբ ֆիլտրի թղթի սևացումը, Բ) Սննդամիջավայրում ծծմբաջրածնի հայտնաբերումը. 1. Դիտվում է ծծմբաջրածնի առաջացում, 2. Չի դիտվում ծծմբաջրածնի առաջացում:

Առավել ճշգրիտ արդյունքներ են ստացվում հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայրի կիրառման դեպքում (գ/լ). պեպտոն 10, NaCl 5, NH_4Fe-ի ցիտրատ 0.3, ագար-ագար 15, շաքարասնկային լուծամզվածք 2 մլ, ծորակի ջուր, pH 7: Սննդամիջավայրը լցնում են

սրվակների մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Մանրէազերծումից հետո ստանում են շեղակ և կատարում գծային ցանք: Կարելի է պատրաստել նաև հեղուկ սննդամիջավայր: Ծծմբաջրածնի անջատման մասին դատում են երկաթի սուլֆիդի առաջացման հետևանքով սննդամիջավայրի սևացմամբ (նկար 61 Բ):

Ինդոլի հայտնաբերումը: Ինդոլը հայտնաբերում են Էրլիխի ռեակտիվի կիրառմամբ որակական ռեակցիայի միջոցով (տե՛ս հավելված 2): Ինդոլի հայտնաբերման համար կարելի է օգտագործել զանազան սննդամիջավայրեր. 0.01% տրիպտոֆան պարունակող մսապեպտոնային արգանակ, որին ավելացվում է 1% կազեինային ջուր (գ/լ կազեին 10, Na_2HPO_4 2, NaCl 3) կամ 2-3% պեպտոնաջուր (գ/լ պեպտոն 25, Na_2HPO_4 2, NaCl 3), pH 7.2-7.4: Սննդամիջավայրերը լցնում են սրվակների մեջ 8-10 ական մլ, մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Տրիպտոֆանն ավելացնում են մանրէազերծված արգանակին լուծույթի ձևով, որը պատրաստում են հետևյալ եղանակով: Տրիպտոֆանը լուծում են ջրում և կաթիլներով ավելացնում NaOH-ի 5-10% լուծույթ մինչև դրա ամբողջությամբ լուծվելը: Ստացված լուծույթը մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Մանրէների ցանքից հետո ինկուբացնում են 5-7 օր և որակական ռեակցիայով ստուգում են սննդամիջավայրում ինդոլի առկայությունը: Դրա համար սննդամիջավայրին ավելացնում են 1-2 մլ Էրլիխի ռեակտիվ: Կարմիր գունավորման առաջացումը վկայում է ինդո-



Նկար 62. Մանրէների ամոնիֆիկացման ունակության հայտնաբերումը:
Ա) Ինդոլի առաջացման հայտնաբերումը. 1. Չի դիտվում ինդոլի առաջացում, 2 Դիտվում է ինդոլի առաջացում, Բ) Միզանյութի ամոնիֆիկացիա. 1. Միզանյութը չի յուրացվում, 2. Միզանյութը յուրացվում է:

լի առկայության մասին: Զուգահեռ ստուգվում է մանրէազերծված սննդամիջավայրում ինդոլի առկայությունը (նկար 62 Ա):

Ամոնիֆիկացման համար սուբստրատ կարող են ծառայել նաև ազոտի ավելի պարզ օրգանական միացությունները, օրինակ՝ միզանյութը: Միզանյութի ֆերմենտային հիդրոլիզը մինչև ամոնիակ և ածխաթթու գազ ունակ են իրականացնելու մանրէները, որոնք սինթեզում են ուրեազ: Առաջացած ամոնիակն այս մանրէներն օգտագործում են որպես ազոտի աղբյուր: Միզանյութի ամոնիֆիկացումը ուղեկցվում է սննդամիջավայրի հիմնայնացմամբ (նկար 62 Բ):

Միզանյութը յուրացնելու մանրէների ունակության հայտնաբերման համար հաճախ օգտագործում են հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայր (գ/լ). $(NH_2)_2CO$ 5, K_2HPO_4 0.5, խնձորաթթվային, կիտրոնաթթվային կամ գինեթթվային Na 5: Առանց միզանյութի սննդամիջավայրը բարակ շերտով լցնում են կոնաձև անոթների մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Առանձին պատրաստում են միզանյութի 20% լուծույթ (թթվեցված թորած ջրում) և մանրէազերծում ֆիլտրմամբ կամ ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Միզանյութն ավելացնում են մանրէազերծված սննդամիջավայրին այնքան, որպեսզի դրա վերջնական կոնցենտրացիան սննդամիջավայրում կազմի 20%: Սննդամիջավայրը մանրէներով ինոկուլացնելուց հետո սրվակի և բամբակյա խցանի միջև տեղադրում են նախապես մանրէազերծված կարմիր լակմուսային թղթի մի կտոր: Ինկուբացման տևողությունը 3-5 օր է: Ամոնիակի առաջացումը հայտնաբերում են լակմուսային թղթի գույնի փոփոխությամբ կամ Նեսլերի ռեակտիվով որակական ռեակցիայով (տե՛ս նկար 60 Բ):

Ազոտի հանքային միացությունների յուրացումը

Մանրէների ունակությունը յուրացնելու ամոնիումի աղերը կամ նիտրատները որպես ազոտի աղբյուր ստուգում են սինթետիկ սննդամիջավայրերում: Պատրաստում են սննդամիջավայրի երկու տարբերակ: Հիմնական սննդամիջավայրի բաղադրությունը հետևյալն է. (գ/լ) գլյուկոզ 20, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, ագար-ագար 15, pH 7.1-7.2: Հիմնական սննդամիջավայրին առաջին տարբերակում ավելացնում են 1գ NH_4Cl և 5գ $CaCO_3$ (քանի որ ամոնիումի քլորիդը ֆիզիոլոգիապես թթու աղ է), իսկ երկրորդ

տարբերակում՝ 1գ KNO_3: Սննդամիջավայրերը լցնում են սրվակների մեջ, մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Մանրէազերծումից հետո ստանում են շեղակներ և կատարում գծային ցանք: Ինկուբացման տևողությունը 2-10 օր է: Աճը կամ դրա բացակայությունը վկայում են ազոտի հանքային միացությունների յուրացման մասին: Ամոնիումի աղերը կամ նիտրատները յուրացնելու ունակությունը կարելի է ստուգել նաև նույն բաղադրությամբ հեղուկ սննդամիջավայրերում: Այդ դեպքում նպատակահարմար է որոշել ինկուբացումից հետո տվյալ աղի ամբողջական յուրացումը: Այդ նպատակով մանրէային կախույթում որոշում են ամոնիումի իոնների կամ նիտրատների առկայությունը որակական ռեակցիաներով: Որպես ստուգիչ կիրառում են համապատասխան մանրէազերծված սննդամիջավայրերը:

Մոլեկուլային ազոտի յուրացումը

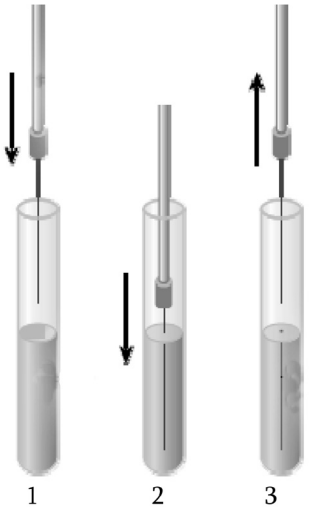
Մոլեկուլային ազոտը յուրացնելու աերոբ մանրէների ունակության մասին կարելի է դատել ազոտ չպարունակվող Էշբիի սննդամիջավայրում ըստ դրանց աճի: Էշբիի սննդամիջավայրը ունի հետևյալ բաղադրությունը (գ/լ). մաննիտ 20, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 0.2, K_2SO_4 0.1, $CaCO_3$ 5, ագար-ագար 20, pH 7.1-7.3: Սննդամիջավայրը լցնում են սրվակների մեջ, մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում, որից հետո ստանում շեղակ: Կատարում են գծային ցանք: Ինկուբացման տևողությունը 7-10 օր է: Անհրաժեշտ է նշել, որ Էշբիի սննդամաջավայրի վրա կարող են աճել ոչ միայն մանրէները, որոնք ֆիքսում են մոլեկուլային ազոտը, այլ նաև օլիգոնիտրոֆիլ մանրէները, այսինքն՝ մանրէները, որոնք ունակ են յուրացնելու քիմիական ռեակտիվներում, ջրում և օդում կապված ազոտի աննշան քանակությունները: Առատ աճն Էշբիի սննդամիջավայրի վրա կարող է վկայել այն մասին, որ մանրէները պատկանում են դիազոտրոֆներին:

Մոլեկուլային ազոտը կարող են ֆիքսել նաև աներոբ մանրէները: *Clostridium* ցեղի ներկայացուցիչների այդ ունակության հայտնաբերման համար օգտագործում են սննդամիջավայր հետևյալ բաղադրությամբ (գ/լ). շաքարասնկային լուծամզվածք 0.015, գլյուկոզ 20, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.5, $MnSO_4$-ի և $FeSO_4$-ի հետքեր (1-ական մլ յուրաքանչուր աղի 1% ջրային լուծույթից), $CaCO_3$ 20, pH

7: Սննդամիջավայրը լցնում են սրվակների մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Մանրէազերծումից հետո սրվակները գրեթե մինչև խցանը լցվում են մանրէազերծված սննդամիջավայրով և լուծված թթվածնի հեռացման համար 20-30 ր. տաքացվում եռացող ջրային բաղնիքում: Այնուհետև սրվակներն արագ սառեցնում են սառը ջրի շիթի տակ և կատարում ցանք՝ մանրէների կախույթը պիպետով ներարկելով մինչև սրվակի հատակը: Ինկուբացման տևողությունը 2-7 օր է: Անաերոբ դիազոտրոֆների աճը ուղեկցվում է սննդամիջավայրի պղտորմամբ, գազառաջացմամբ, կարագաթթվի հոտի առաջացմամբ:

Մոլեկուլային թթվածնի նկատմամբ մանրէների վերաբերմունքը և աճը անաերոբ պայմաններում

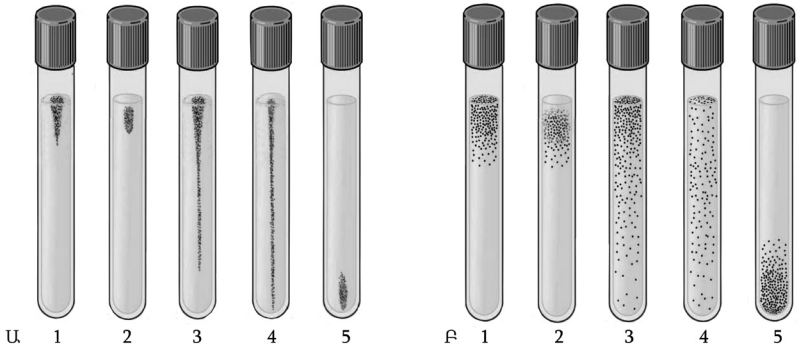
Ըստ մոլեկուլային թթվածնի նկատմամբ վերաբերմունքի տարբերում են մանրէների հետևյալ խմբերը՝ օբլիգատ անաերոբ, միկրոաերոֆիլ, ֆակուլտատիվ աերոբ կամ անաերոբ, աերոտոլերանտ և օբլիգատ անաերոբ մանրէներ (տե՛ս գլուխ 1): Այս կամ այն խմբին



Նկար 63. Մանրէային կուլտուրայի ցանքը մանրէաբանական ասեղով:
1. Մանրէաբանական ասեղով մանրէային կուլտուրայի ներմուծում սննդամիջավայր, 2. Մանրէային կուլտուրայի ներարկում սննդամիջավայրի մեջ, 3. Մանրէաբանական ասեղի հեռացում:

մանրէների պատկանելության մասին դատելու համար մանրէային կախույթն ավելացնում են սրվակների մեջ լցված դեռևս հեղուկ (40-45°C) ագարացված սննդամիջավայրի մեջ, լավ թափահարում և ինկուբացնում հետազոտվող մանրէի աճի համար բարենպաստ պայմաններում: Ցանքը կարելի է կատարել նաև մանրէաբանական ասեղի միջոցով մանրէային կուլտուրան դեռևս կիսահեղուկ ագարային սննդամիջավայր ներարկելով (ներարկմամբ ցանք), ինչպես ցույց է տրված նկար 63-ում:

Աերոբներն աճում են սննդամիջավայրի մակերեսին կամ դրա վերին շերտերում, միկրոաերոֆիլները՝ մակերեսից ոչ շատ խորը շերտերում, իսկ ֆակուլտատիվ անաերոբները սովորաբար զարգանում են սննդամիջավայրի ամբողջ հատույթում: Խիստ անաերոբներն աճում են միայն սննդամիջավայրի խորքում՝ սրվակի հատակամերձ մասում (նկար 64):



Նկար 64. Մանրէների աճը ագարացված սննդամիջավայրում:
Ա) Աճը ագարացված սննդամիջավայրում մանրէաբանական ասեղով ցանքից հետո, Բ) Աճը ագարացված սննդամիջավայրում մանրէային կախույթի ավելացնելուց ու թափահարելուց հետո. 1. Աերոբ, 2. Միկրոաերոֆիլ, 3. Ֆակուլտատիվ անաերոբ, 4. Աերոտոլերանտ, 5. Անաերոբ:

Ֆակուլտատիվ անաերոբները (կամ ֆակուլտատիվ աերոբները) լավ աճում են և՛ աերոբ, և՛ անաերոբ պայմաններում: Անաերոբ պայմաններում դրանցից շատերը շնչառական շղթայում որպես էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտոր ունակ են օգտագործել ոչ թե թթվածինը, այլ օրինակ՝ նիտրատը: Այդ գործընթացը կոչվում է նիտրատային շնչառություն, որի արդյունքում նիտրատները վերականգվում են մինչև նիտրիտներ, ապա մինչև N_2O և N_2: Նիտրատային շնչառությունը, որն ուղեկցվում է ազոտի գազային միացություններ-

րի առաջացմամբ կոչվում է դենիտրիֆիկացում (կամ դիսիմիլյացիոն նիտրատվերականգնում): Որոշ ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէներ կարող են անաերոբ պայմաններում շնչառությունից անցնել խմորման: Այդ դեպքում ածխաջրերով հարուստ սննդամիջավայրերում մանրէների աճի հետևանքով կուտակվում են զգալի քանակությամբ օրգանական թթուներ և նյութափոխանակության այլ արգասիքներ:

Դենիտրիֆիկացման ունակությունը

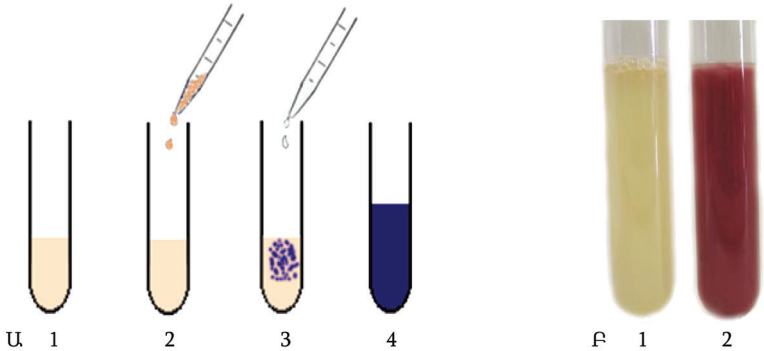
Դենիտրիֆիկացման հատկությունը սննդամիջավայրում որոշում են հետևյալ բաղադրությամբ՝ (գ/լ). գլիցերին 10, շաքարասնկային լուծամզվածք 5, $(NH_4)_2SO_4$ 2, KNO_3 10, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025, NaCl 0.5, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, ագար-ագար 1: Սննդամիջավայրը (5 և 10 մլ-ական) լցնում են սրվակների մեջ և մանրէազերծում ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Փորձարկվող մանրէները մանրէաբանական ասեղով ներարկում են 5 մլ սննդամիջավայր պարունակող սրվակների մեջ (առաջնային ցանք): 24 ժամ ինկուբացնելուց հետո առաջնային ցանքի մանրէային զանգվածը մանրէաբանական ասեղով տեղափոխում են 10 մլ դեռևս հեղուկ (40-45^{0}C) ագարացված սննդամիջավայր պարունակող սրվակների մեջ: Մանրէների ցանքից հետո սննդամիջավայրը խառնում են, հովացնում և անաերոբ պայմաններ ստեղծելու համար սննդամիջավայրին ավելացնում նախապես մանրէազերծված 2-3 մլ 1% ջրային ագար-ագար: Դենիտրիֆիկացման ունակ մանրէների աճը ուղեկցվում է սննդամիջավայրի պղտորմամբ և գազառաջացմամբ:

Նիտրատները վերականգնելու մանրէների ունակությունը կարելի է ստուգել նաև մսապեպտոնային արգանակում, որին ավելացնում են KNO_3-ի 0.2% լուծույթ: Սննդամիջավայրը (10-ական մլ) լցնում են սրվակների մեջ, որոնցից յուրաքանչյուրի հատակին իջեցնում են լողան և մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Ցանքը կատարում են՝ նախապես ստացված բջջային կախույթի մի քանի կաթիլ ավելացնելով սննդամիջավայրին: Ինկուբացման տևողությունը 2-5 օր է, որից հետո ստուգում են լողանում գազի (N_2) կուտակումը և որակական ռեակցիայով որոշում են սննդամիջավայրի կախույթում նիտրատների և նիտրիտների առկայությունը:

Նիտրատների հայտնաբերման որակական ռեակցիան իրակա-

նացնում են հետևյալ կերպ: Հախճապակյա թիթեղիկի վրա կաթեցնում են 1 կաթիլ խիտ ծծմբական թթու, ավելացնում դիֆենիլամինի մի քանի բյուրեղ և դրա լուծվելուց հետո ավելացնում են փորձարկվող կախույթի 1 կաթիլ: NO_3^- իոնների առկայության դեպքում հեղուկը ներկվում է մուգ կապույտ գույնով: Պետք է հաշվի առնել, որ նիտրիտները (NO_2^-) դիֆենիլամինի հետ ևս առաջացնում է կապույտ գունավորում, ուստի նիտրատների առկայության մասին դատելու համար պետք է բացառել սննդամիջավայրում նիտրիտների առկայությունը:

Նիտրիտների հայտնաբերման օսլա-յոդային որակական ռեակցիան հիմնված է թթվային միջավայրում նիտրիտով ZnI_2-ի օքսիդացման և արդյունքում I_2 անջատելու հատկության վրա: Անջատված յոդը հայտնաբերվում է օսլայի միջոցով: Ռեակցիայի իրականացման համար կախույթին ավելացնում են լուծույթ, որը պարունակում է $ZnCl_2$, KI, օսլա (ռեակտիվի պատրաստումը տե՛ս հավելված 2-ում) և HCl-ի լուծույթ: Սննդամիջավայրում նիտրիտի առկայության դեպքում առաջանում է կապույտ գունավորում (նկար 65 Ա):



Նկար 65. Մանրէների նիտրատները նիտրիտների վերականգնման ունակության հայտնաբերումը:

Ա) Օսլա-յոդային ռեակցիա. 1. Հետազոտվող մանրէային կախույթ, 2. $ZnCl_2$, KI և օսլա պարունակող լուծույթի ավելացում, 3. HCl-ի լուծույթի ավելացում, 4. Նիտրիտի առկայությամբ կապույտ գունավորման առաջացում, Բ) Գրիսի ռեակտիվով մշակում. 1. Ստուգիչ, 2. Նիտրիտի առկայությամբ կարմիր գունավորման առաջացում:

Նիտրիտների հայտնաբերման որակական ռեակցիան Գրիսի ռեակտիվով հիմնված է թթվային սննդամիջավայրում նիտրիտների և արոմատիկ ամինների (սուլֆոֆենոլային թթվի և α-նավթիլա-

մինի) փոխազդեցությամբ կարմրավարդագույն գունավորում ունեցող ազոմիացության առաջացման վրա: Ռեակցիայի իրականացման համար բջջային կախույթին ավելացնում են Գրիսի ռեակտիվ (ռեակտիվի պատրաստումը տե՛ս հավելված 2-ում): Կարմիր գունավորման առաջացումը վկայում է նիտրիտների առկայության մասին (նկար 65 Բ): Որպես ստուգիչ ռեակցիան զուգահեռ իրականացնում են բջիջներից զուրկ մանրէազերծված սննդամիջավայրում:

Խմորման ունակության որոշումը

Խմորման ունակությունը սովորաբար որոշում են ածխաջրերի համեմատաբար բարձր խտությամբ և պեպտոնի ոչ մեծ քանակությամբ սննդամիջավայրում: Սննդամիջավայրի բաղադրությունը հետևյալն է (գ/լ). ածխաջուր 1, պեպտոն 2, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.3, ագար-ագար 3: 100 մլ սննդամիջավայրին ավելացնում են 0.3 մլ 1% բրոմթիմոլկապույտի ջրային լուծույթ, սննդամիջավայրի pH 7.1-7.2: Սննդամիջավայրը առանց ածխաջրի ավելացման մանրէազերծում են ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Ածխաջրերը (գլյուկոզ, սախարոզ, լակտոզ) 20-40% լուծույթների ձևով մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում և ավելացնում նախապես մանրէազերծված սննդամիջավայրին: Այնուհետև սննդամիջավայրը լցնում են մանրէազերծված սրվակների մեջ 5-6 սմ շերտով և պաղեցնելուց հետո ինոկուլացնում են փորձարկվող մանրէային կուլտուրաներով: Ցանքը կատարում են մանրէաբանական ասեղով: Յուրաքանչյուր ածխաջրի համար օգտագործում են երկուական սրվակ: Ցանքից հետո սրվակներից մեկում գտնվող սննդամիջավայրին անաերոբ պայմաններ ստեղծելու նպատակով 1-2 սմ շերտով ավելացնում են մանրէազերծված պարաֆին կամ վազելինային յուղի և պարաֆինի խառնուրդ (1:1) կամ էլ՝ 1.5% ջրային ագար-ագար: Ինկուբացման տևողությունը 2-7 օր է: Փորձի վերջում գրանցում են սննդամիջավայրի pH-ի փոփոխությունը ըստ հայտանյութի գույնի փոփոխության: Աերոբ մանրէները, որոնք կատարում են շնչառություն և ունակ չեն խմորման, աճում են միայն առանց պարաֆինի սրվակներում սննդամիջավայրի մակերեսին և առաջացնում են թթուների ոչ մեծ քանակություն միայն սննդամիջավայրի վերին շերտերում: Պեպտոնի քայքայման արդյունքում առաջացած արգասիքներով այդ թթուների չեզոքացման

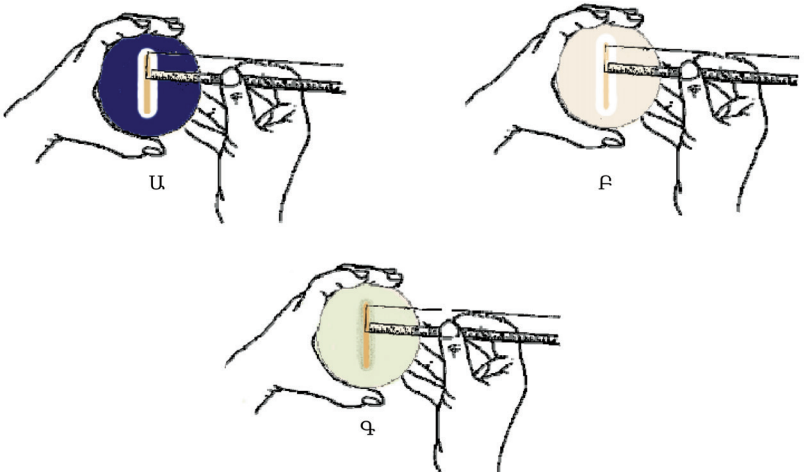
դեպքում սննդամիջավայրի մակերեսային շերտում դիտվում է հիմնային ռեակցիա: Մանրէները, որոնք ունակ են խմորել ածխաջրերը, աճում և առաջացնում են թթուներ երկու սրվակներում էլ, բայց անաերոբ պայմաններում թթվագոյացումը զգալիորեն ավելի շատ է լինում: Դա լավ նկատվում է հայտանյութի գույնի փոփոխությամբ: Եթե խմորումն ուղեկցվում է գազերի առաջացմամբ, ապա ագարացված սննդամիջավայրը նաև ճեղքվում է:

Արտաբջջային ֆերմենտներ սինթեզելու որոշումը

Ինչպես հայտնի է մանրէները ունակ են որպես սննդարար սուբստրատներ օգտագործել ամենատարբեր բարձրամոլեկուլային միացություններ՝ բազմաշաքարներ, սպիտակուցներ, նուկլեինաթթուներ, լիպիդներ և այլն: Սակայն մակրոմոլեկուլները չեն կարող ներթափանցել բջջաթաղանթով: Այդպիսի մակրոմոլեկուլները ենթարկվում են քայքայման հիդրոլազներին պատկանող արտաբջջային ֆերմենտներով: Դրանց մեծամասնությունը կատալիզում է պոլիմերի հիդրոլիզը մինչև լուծելի արգասիքների՝ դիմերների կամ մոնոմերների, որոնք բջիջ են ներթափանցում շնորհիվ հատուկ փոխադրող մեխանիզմների գործունեությամբ: Արտաբջջային ֆերմենտներ սինթեզելու ունակությունը լայն տարածված է մանրէների տարբեր կարգաբանական խմբերում: Հիդրոլազների ակտիվ արտադրիչներ հայտնաբերելու համար կիրառվում են հատուկ մեթոդներ: Դրանց էությունը հետևյալում է. մանրէներն աճեցնում են համապատասխան մակրոմոլեկուլային սուբստրատներ պարունակող ագարացված սննդամիջավայրի վրա: Եթե մանրէն սինթեզում է տվյալ մակրոմոլեկուլային միացությունը հիդրոլիզող արտաբջջային ֆերմենտները, ապա գաղութների շուրջ առաջանում են գոտիներ, որոնցում հայտնաբերվում են հիդրոլիզի արգասիքները:

Բազմաշաքարների հիդրոլիզը: Օսլան ճեղքվում է ամիլազների ազդեցությամբ, որոնց ակտիվ արտադրիչներ են բացիլները, պսևդոմոնադները, ստրեպտոմիցետները և միցելիումային սնկերը: Օսլան հիդրոլիզելու մանրէների ունակությունը հայտնաբերելու համար հաճախ օգտագործում են հետևյալ բաղադրությամբ սննդամիջավայրը. (գ/լ) պեպտոն 10, K_2HPO_4 5, լուծվող օսլա 2, ագար-ագար 15, pH 6.8-7: Սննդամիջավայրը մանրէազերծում են ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում և լցնում մանրէազերծված Պետ-

րիի թասերի մեջ: Երբ սննդամիջավայրը պնդանում է, կատարում են գծային ցանք: Ինկուբացման տևողությունը 2-10 օր է: Օսլայի հիդրոլիզը հայտնաբերում են Լյուգոլի լուծույթով ագարային շերտի մշակմամբ (տե՛ս հավելված 2): Օսլա պարունակող սննդամիջավայրը ներկվում է կապույտ, իսկ հիդրոլիզի գոտին մնում է անգույն (եթե օսլան ամբողջապես քայքայվել է) կամ ձեռք է բերում կարմրագորշավուն երանգ (եթե օսլան հիդրոլիզվել է մինչև դեքստրինների): Օսլայի հիդրոլիզի գոտին չափում են միլիմետրերով՝ գաղութի ծայրից մինչև լուսավոր գոտու սահմանը (նկար 66 Ա): Որքան մեծ է չգունավորված գոտու տրամագիծը, այնքան բարձր է ամիլազի ակտիվությունը:

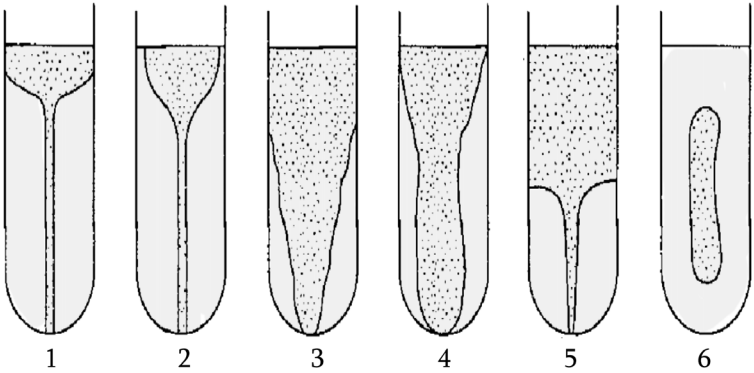


Նկար 66. Արտաբջջային ֆերմենտների հայտնաբերումը:
Ա) Օսլայի հիդրոլիզը, Բ) Կազեինի հիդրոլիզը, Գ) Լիպիդների հիդրոլիզը:

Սպիտակուցների հիդրոլիզը: Պրոտեազները կատալիզում են սպիտակուցների ճեղքումը պոլի- և օլիգոպեպտիդների: Պրոտեազների արտադրիչներ են բացիլները, ակտինոմիցետները և միցելիումային սնկերը: Արտաբջջային պրոտեազների ակտիվությունը որոշում են՝ որպես սուբստրատ ժելատին, կազեին և այլ սպիտակուցներ օգտագործելով:

Մանրէների ժելատինը հիդրոլիզելու ունակությունը հայտնաբերելու համար դրանք ցանում են մսապեպտոնային ժելատինում (ՄՊԺ): Պատրաստում են հետևյալ կերպ. 100 մլ մսապեպտոնային արգանակին ավելացնում են 10-15 գ ժելատին, թողնում են 20-30 ր-

պե, որպեսզի ուռչի, այնուհետև խառնուրդը տաքացնում են ջրային բաղնիքում մինչև ժելատինի լրիվ լուծվելը, և ստացված ՄՊԺ-ն 8-10-ական մլ լցնում են սրվակների մեջ: Մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամմ պայմաններում 15 րոպե: Ցանքը կատարում են մանրէաբանական ասեղով ներարկմամբ: Ինկուբացման տևողությունը 2-10 օր է: Ժելատինազայի առկայությունը որոշվում է սենյակային ջերմաստիճանում սննդամիջավայրի հեղուկացմամբ: Եթե ժելատինը քայքայվում է, ապա նշում են քայքայման ձևը և ուժգնությունը՝ շերտավոր, ձագարաձև, պարկանման, պղպջակի տեսքով և այլն (նկար 67):



Նկար 67. Տարբեր մանրէների ժելատին հիդրոլիզելու ունակությունը:
1. Խառնաբանաշն, 2. Շաղգամանման,. 3 Ձագարաշն, 4. Պարկանման, 5 Շերտավոր, 6. Պղպջականման (1-3 և 5 առաջացնում են աերոբ մանրէները, 4-ը՝ ֆակուլտատիվ անաերոբները, 6-ը՝ անաերոբները):

Կազեինը հիդրոլիզելու մանրէների ունակությունը հայտնաբերելու համար օգտագործում են սննդամիջավայր յուղազերծված կաթ: Որպես կանոն, սննդամիջավայրի պատրաստումից առաջ կաթը յուղազրկում են՝ կենտրոնախուսելով 15 ր. 650-1500 պտույտ արագությամբ: Ճարպերը, որոնք կաթի մակերևույթին առաջացնում են բավականին խիտ շերտ, հեռացնում են, իսկ կաթը մանրէազերծում են ավտոկալվում 0.5 ամմ պայմաններում 20 րոպե: Մանրէազերծումից հետո տաքացնում են և, անընդհատ խառնելով ավելացնում մանրէազերծված, հալեցված և մինչև 50°C պաղեցված 3 % ագար-ագար պարունակող ջրին: Ստացված սննդամիջավայրը լցնում են մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ: Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո մակերեսին կատարում են գծային ցանք: Ինկուբացման տևո-

ղությունը 2-10 օր է: Կազեինի հիդրոլիզը հայտնաբերվում է գաղութի կամ մանրէների ցանքի հետագծով աճած զանգվածի շուրջ սննդամիջավայրի թափանցիկ գոտու առաջացմամբ: Թափանցիկ գոտին հատկապես լավ երևում է եռքլորքացախաթթվի 5% լուծույթով ագարային շերտի մշակումից հետո: Կազեինի հիդրոլիզի գոտին չափում են միլիմետրերով՝ մանրէային գաղութի եզրից մինչև թափանցիկ գոտու սահմանը (նկար 66 Բ): Որքան մեծ է թափանցիկ գոտու տրամագիծը, այնքան բարձր է մանրէների կազեինալիտիկ ակտիվությունը:

Լիպիդների հիդրոլիզը: Լիպիդները ճեղքվում են լիպազների ազդեցությամբ: Լիպազների ակտիվ արտադրիչներ են շաքարասնկերը, միցելիումային սնկերը և *Clostridium* ցեղի բակտերիաները: Լիպազային ակտիվության հայտնաբերման համար հետազոտվող մանրէները ցանում են համապատասխան լիպիդ պարունակող սննդամիջավայրում: Այսպիսի փորձերում բարդությունը ճարպերի ջրում չլուծվելն է: Այդ պատճառով հաճախ ճարպերի փոխարեն օգտագործում են տվիններ՝ սորբիտի և ճարպաթթուների եթերներ: Տվին 40-ը պարունակում է պալմիտինային, տվին 60-ը՝ ստեարինային, իսկ տվին 80-ը՝ օլեինային թթուներ: Տվինները ջրում լավ լուծվում են և ունեն չեզոք ռեակցիա: Սննդամիջավայրն ունի հետևյալ կազմը (գ/լ). տվին 10, պեպտոն 10, NaCl 5, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.1, ագար-ագար 20, pH 7.4:

Նախ պատրաստում են առանց տվինի սննդամիջավայրը և մանրէազերծում ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Համապատասխան կոնցենտրացիայով տվինի ջրային լուծույթը մանրէազերծում են առանձին ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում և մանրէազերծ պայմաններում ավելացնում հիմնական սննդամիջավայրին: Այնուհետև սննդամիջավայրը լցնում են մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ: Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո ագարային շերտի մակերեսին կատարում են գծային ցանք: Թասերն ինկուբացնում են համապատասխան ջերմաստիճանում, մանրէների աճի համար անհրաժեշտ ժամանակահատվածում: Լիպազ սինթեզելու ունակությունը հայտնաբերվում է գաղութի կամ մանրէի ցանքի հետագծով աճած զանգվածի շուրջ տվինի քայքայումից առաջացած ճարպաթթուների կալցիումական աղերի ոչ թափանցիկ գոտիների առաջացմամբ (նկար 66 Գ):

Հակաբիոտիկների առաջացումը

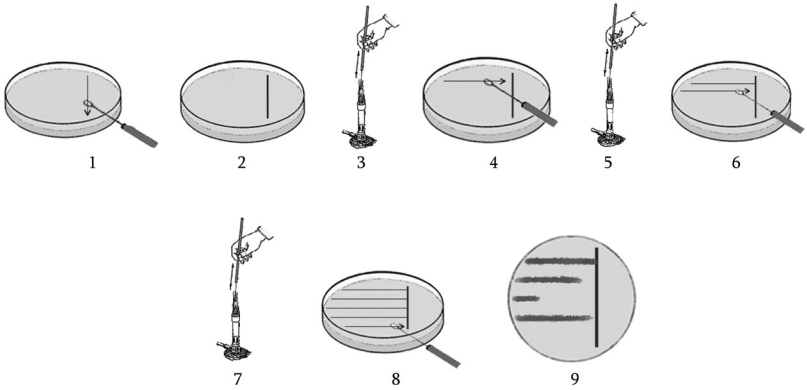
Բազմաթիվ մանրէների կենսագործունեության ընթացքում առաջանում են արգասիքներ, որոնք օժտված են բարձր ֆիզիոլոգիական ակտիվությամբ այլ մանրէների, այդ թվում՝ վիրուսների նկատմամբ: Նյութափոխանակության այդպիսի արգասիքները կոչվում են հակաբիոտիկներ: Ի տարբերություն ընդհանուր կենսաբանական թույների՝ հակաբիոտիկներն իրենց ազդեցությունը դրսևորում են միայն մանրէների որոշակի տեսակների կամ խմբերի նկատմամբ: Որոշ հակաբիոտիկներ, օրինակ՝ պենիցիլինը, ֆումագիլինը, բացիտրացինը, ճնշում են սահմանափակ թվով մանրէների աճը, իսկ տետրացիկլինը, քլորամֆենիկոլը, էրիթրոմիցինը, կարբոմիցինը ունեն ազդեցության լայն տիրույթ և ճնշում են բազմաթիվ գրամդրական և գրամբացասական բակտերիաների, ինչպես նաև որոշ վիրուսների աճը: Որպես կանոն, գրամդրական բակտերիաներն ավելի զգայուն են հակաբիոտիկների ազդեցությանը, քան գրամբացասականները, ինչը պայմանավորված է դրանց բջջապատի կառուցվածքով: Հակաբիոտիկների ակտիվ արտադրիչներ են սպոր առաջացնող բակտերիաները, այդ թվում՝ ակտինոմիցետները և միցելիում առաջացնող սնկերը:

Մանրէների հակաբիոտիկային ակտիվության որոշումը

Գոյություն ունեն մանրէների հակաբիոտիկային հատկությունների հայտնաբերման տարբեր եղանակներ: Դրանց մեծամասնությունը հիմնված է ագարացված սննդամիջավայրերում հակաբիոտիկների դիֆուզվելու և թեստ մանրէների աճի բացակայության գոտիներ առաջացնելու վրա: Աճի բացակայության այդպիսի գոտու մեծությունը ցույց է տալիս տվյալ թեստ մանրէի նկատմամբ հակաբիոտիկի զգայնության աստիճանը: Գոտու մեծությունը կախված է նաև հակաբիոտիկի կոնցենտրացիայից, ինչպես նաև թեստ մանրէի կուլտուրայի խտությունից, ագարացված սննդամիջավայրի կազմից և շերտի հաստությունից, ինկուբացման ջերմաստիճանից, դիֆուզիայի տեղողությունից և այլ գործոններից: Որպես թեստ օրգանիզմ կիրառվում են տարբեր մանրէների կուլտուրաներ, սակայն առավել հաճախ՝ *E. coli* (գրամբացասական բակտերիա), *S. aureus* (գրամդրական բակտերիա), *Bacillus subtilis* կամ *B. cereus* (էնդոս-

պոր առաջացնող բակտերիա), *Candida* կամ *Saccharomyces* ցեղի խմորասնկեր: Անհրաժեշտության դեպքում թեստ օրգանիզմների այս հավաքը լրացնում են այլ մանրէներով: Հակաբիոտիկային ակտիվությունը հայտնաբերում են մանրէային կուլտուրայի փոխուղղահայաց ուղղություններով գծային ցանքով և ագարային գլանակների մեթոդներով:

Փոխուղղահայաց ուղղություններով գծային ցանքի մեթոդ: Պետրիի թասերում լցված ագարացված սննդամիջավայրի վրա գծային ցանքով ցանում են հակաբիոտիկային նյութի ենթադրվող արտադրիչ մանրէի կուլտուրան: Գծային ցանքը կատարում են Պետրիի թասի տրամագծով: Հակաբիոտիկ արտադրիչ մանրէի ինկուբացման ընթացքը կախված է իր աճի արագությունից: Հակաբիոտիկ արտադրիչ մանրէի աճից և ագարային սննդամիջավայրում դիֆուզվող հակաբիոտիկային նյութի առաջացումից հետո կատարում են թեստ օրգանիզմների գծային ցանք՝ թասի եզրից կենտրոնաձիգ և աճած մանրէային զանգվածին ուղղահայաց ուղղությամբ (նկար 68): Ցանքի համար օգտագործում են թեստ օրգանիզմների նախապես մանրէազերծված ծորակային ջրում պատրաստված



Նկար 68. Հակաբիոտիկային նյութի հայտնաբերումը փոխուղղահայաց գծային ցանքի մեթոդով:

1. Հակամանրէային նյութ արտադրող մանրէի ցանք, 2. Մանրէի աճ, 3. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 4. 1-ին թեստ օրգանիզմի ցանք փոխուղղահայաց արտադրիչ մանրէին, 5. Մանրէաբանական օղակի մանրէազրծում, 6. 2-րդ թեստ օրգանիզմի ցանք փոխուղահայաց արտադրիչ մանրէին, 7. Մանրէաբանական օղակի մանրէազերծում, 8. 5-րդ թեստ օրգանիզմի ցանքը փոխուղղահայաց արտադրիչ մանրէին, 9. Մանրէների աճը ինկուբացումից հետո (հակամանրէային նյութի առկայության մասին վկայում են արտադրիչ մանրէի և թեստ օրգանիզմի միջև առաջացած աճի բացակայության գոտիները):

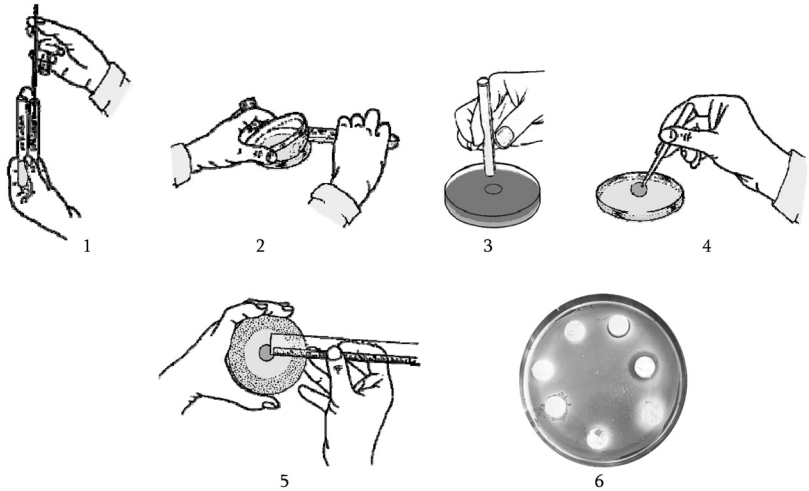
խիտ կախույթները: Ցանքից հետո թասերը ինկուբացնում են ջերմապահարանում 28-30^{0}C-ում 2-8 օր՝ կախված թեստ օրգանիզմների աճի արագությունից: Հակաբիոտիկային նյութի նկատմամբ ոչ զգայուն թեստ օրգանիզմներն աճում են արտադրիչ մանրէի աճած զանգվածին մոտ, իսկ զգայուն թեստ օրգանիզմները՝ արտադրիչ մանրէի աճած զանգվածից հեռու: Ընդ որում, որքան մեծ է աճած հակաբիոտիկ արտադրող մանրէի և զգայուն թեստ օրգանիզմների միջև հեռավորությունը, այնքան թեստ օրգանիզմն ավելի զգայուն է հակաբիոտիկային նյութի նկատմամբ:

Այս մեթոդը, սակայն, ունի էական թերություն: Հակաբիոտիկային նյութի արտադրիչը և թեստ օրգանիզմն աճեցնում են միևնույն սննդամիջավայրի վրա և միևնույն պայմաններում, թեև հայտնի է, որ ոչ միշտ է միևնույն սննդամիջավայրը համանման ձևով բարենպաստ հակաբիոտիկ արտադրող մանրէի և թեստ օրգանիզմների աճի համար:

Ագարային գլանակների մեթոդ: Այս մեթոդը ենթադրում է տարբեր սննդամիջավայրերի օգտագործումը հակաբիոտիկ արտադրիչ մանրէի և թեստ օրգանիզմների աճեցման համար: Ակտինոմիցետների հակաբիոտիկային հատկությունների հայտնաբերման համար ենթադրվող արտադրիչն աճեցվում է հետևյալ բաղադրությամբ սնընդամիջավայրի վրա (գ/լ). գլյուկոզ 30, KNO_3 5.5, $MgSO_4$ 0.5, NaCl 1, K_2HPO_4 0.4, $ZnSO_4$ 0.002, $FeSO_4$ 0.002, ագար-ագար 25, թորած ջուր, pH 7.1-7.2: Սննդամիջավայրը մանրէազերծում են ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում և լցնում մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ:

Սննդամիջավայրի պնդանալուց հետո հակաբիոտիկային նյութի արտադրիչը ցանում են այնպես, որպեսզի ստացվի համատարած աճ՝ գազոն: Դրա համար ակտինոմիցետի սպորները մանրէաբանական ասեղով տեղափոխում են սննդամիջավայրի վրա և մածկաթիակի օգնությամբ տարածում դրա ամբողջ մակերեսով, ապա ինկուբացնում 28-30°C ջերմաստիճաններում 8-10 օրվա ընթացքում: Այնուհետև մանրէազերծված հատուկ դակիչով (տրամագիծը 6-8 մմ) ակտինոմիցետի գազոնից կտրում են ագարային գլանակ և տեղափոխում նախապես թեստ օրգանիզմով աճեցված ագարացված սննդամիջավայրի, օրինակ՝ ՄՊԱ-ի մակերեսին (նկար 69): Ագարային գլանակները աճած զանգվածով դեպի վեր տեղադրում են միմյանցից հավասար և թասի եզրերից 1.5-2 սմ հեռավորության վրա և ամուր սեղմում են ագարացված սննդամիջավայրին: Թեստ

օրգանիզմով ցանված սննդամիջավայրի հաստության մեջ հակաբիոտիկային նյութերի առավել լավ դիֆուզման համար գլանակները կարելի է տեղադրել նույն դակիչով նախապես պատրաստված փոսիկների մեջ: Միևնույն Պետրիի թասում կարելի է տեղադրել 4-5 հակաբիոտիկների տարբեր արտադրիչներով ագարային գլանակներ (նկար 69.6):



Նկար 69. Հակաբիոտիկական նյութի հայտնաբերումն ագարային գլանակների մեթոդով:

1. Թեստ օրգանիզմի ցանք ագարային հալեցված սննդամիջավայրում, 2. Թեստ օրգանիզմ պարունակող սննդամիջավայրի ավելացում թասերում, 3. Մանրէների կուլտուրայով պինդ սննդամիջավայրից դակիչով գլանակի դակում, 4. Գլանակի տեղադրում թեստ օրգանիզմով պինդ ագարային սննդամիջավայրի մակերեսին, 5. Մանրէի աճից հետո առաջացած աճի բացակայության գոտու մեծության (մմ Ø) գրանցում, 6. Տարբեր մանրէների ագարային գլանակների ազդեցությամբ առաջացած աճի բացակայության գոտիներ:

Սննդամիջավայրում հակաբիոտիկային նյութերի դիֆուզիայի համար թասերը պահում են 1 ժամ սենյակային ջերմաստիճանում, այնուհետև տեղադրում ջերմապահարան՝ թեստ օրգանիզմի զարգացման համար բարենպաստ ջերմաստիճանում և ինկուբացնում՝ կախված դրա աճի արագությունից: Եթե թեստ օրգանիզմը զգայուն է արտադրիչի հակաբիոտիկային նյութի նկատմամբ, ապա ինկուբացումից հետո ագարային գլանակների կամ փոսիկների շուրջ առաջանում են դրա աճի բացակայության գոտիներ: Որքան շատ է

արտադրվում հակաբիոտիկը և որքան այն ակտիվ է, այնքան ավելի մեծ կլինի թեստ օրգանիզմի աճի բացակայության գոտու տրամագիծը: Թեստ օրգանիզմը, որը զգայուն չէ տվյալ արտադրիչի հակաբիոտիկային նյութի նկատմամբ, աճում է սննդամիջավայրի ամբողջ մակերեսով:

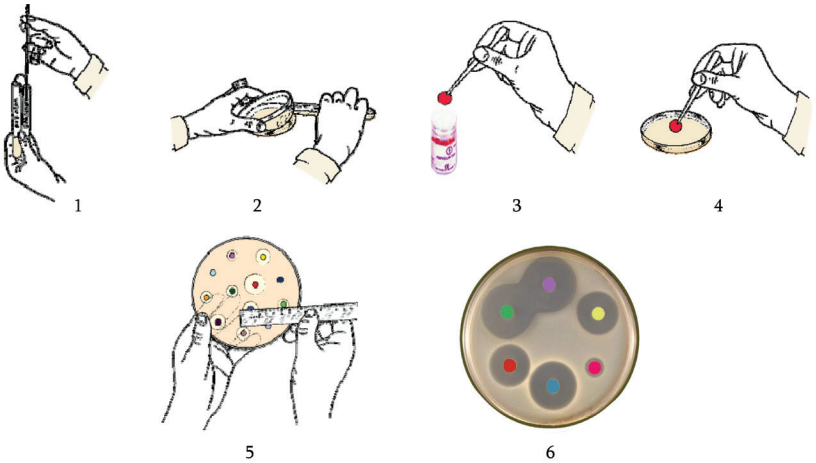
Հակաբիոտիկային նյութերի նկատմամբ մանրէների զգայունության որոշումը

Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների զգայունությունը հարմար է որոշել որոշակի հակաբիոտիկներով ներծծված պատրաստի թղթե սկավառակների օգնությամբ: Սովորաբար այդպիսի սկավառակներում հակաբիոտիկների կոնցենտրացիան ընտրվում է այն հաշվարկով, որպեսզի թեստ օրգանիզմների աճի ճնշման գոտիների տրամագիծը լինեն 28-32 մմ:

Հետազոտվող մանրէներն աճեցնում են համապատասխան ագարացված սննդամիջավայրերի վրա: Մանրէազերծված ծորակի ջրում պատրաստում են բջիջների համասեռ կախույթ. 1 մլ կախույթում պետք է պարունակվեն շուրջ 2 մլրդ բջիջներ (որոշում են պղտորության աստիճանով): Կախույթից 1 մլ ավելացնում են 20 մլ մանրէազերծված և մինչև 50°C պաղեցված ագարացված սննդամիջավայրին, օրինակ՝ սրվակի մեջ լցված ՄՊԱ-ին: Սրվակի պարունակությունը լավ խառնում են և անմիջապես լցնում մանրէազերծված Պետրիի թասի մեջ: Երբ սննդամիջավայրը պնդանում է, դրա մակերեսին տեղադրում են հակաբիոտիկներով ներծծված պատրաստի թղթե սկավառակները միմյանցից հավասար և թասի եզրերից 1.5-2 սմ հեռավորությամբ: Թասը պահում են 2 ժամ սենյակային ջերմաստիճանում հակաբիոտիկների առավել լավ դիֆուզիայի համար, ապա ինկուբացնում 24 ժ 28-30°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Եթե հետազոտվող մանրէները զգայուն են տվյալ հակաբիոտիկների նկատմամբ, ապա սկավառակների շուրջ նկատվում են այդ մանրէների աճի բացակայության գոտիներ: Գոտու տրամագիծը չափում են միլիմետրերով: Ավելի քան 30 մմ տրամագծով գոտին վկայում է հակաբիոտիկի նկատմամբ մանրէների բարձր զգայունության, իսկ 12 մմ-ից փոքր տրամագծով գոտին՝ թույլ զգայունության մասին (նկար 70):

Հակաբիոտիկային նյութերի լուծույթների կամ հակաբիոտիկներ

արտադրող մանրէային կախույթների առկայության դեպքում կիրառվում է ագարային փոսիկների մեթոդը: Այդ դեպքում փորձարկվող մանրէներով աճեցված ագարացված սննդամիջավայրում մանրէազերծված դակիչով (տրամագիծը 6-8 մմ) թասի եզրերից 1.5-2 սմ հեռավորության վրա դակում են փոսիկներ: Յուրաքանչյուր փոսիկի մեջ լցնում են հակաբիոտիկների լուծույթներ կամ մանրէային կախույթ: Այս մեթոդը թույլ է տալիս նաև հայտնաբերել հեղուկ սնընդամիջավայրում աճեցված մանրէների հակաբիոտիկային նյութեր առաջացնելու ունակությունը:



Նկար 70. Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների զգայունության որոշումը տարբեր հակաբիոտիկներով ներծծված թղթե սկավառակների օգնությամբ:
1. Թեստ օրգանիզմի ցանք ագարային հալեցված սննդամիջավայրում, 2. Թեստ օրգանիզմ պարունակող սննդամիջավայրի լցնում թասերում, 3. Մանրէազերծված ունելիով հակաբիոտիկով ներծծված թղթե սկավառակի տեղափոխում անոթից, 4. Հակաբիոտիկային սկավառակի տեղադրում թեստ օրգանիզմով ինոկուլացված սննդամիջավայրի մակերեսին, 5. Մանրէի աճից հետո առաջացած աճի բացակայության գոտիների մեծության (մմ Ø) գրանցում, 6. Տարբեր հակաբիոտիկային սկավառակների ազդեցությամբ առաջացած աճի բացակայության ճնշման գոտիները (տարբեր հակաբիոտիկային սկավառակներ ունեն տարբեր գունավորում):

ԳԼՈՒԽ 8 ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ

Մանրէների հետ արդյունավետ աշխատանքի անհրաժեշտ պայման է դրանց ճիշտ պահպանումը: Տարբեր կարգաբանական խմբերի պատկանող մանրէներ, և նույնիսկ մեկ տեսակի տարբեր շտամներ և տարբերակներ (վարեր) տարբերվում են պահպանման եղանակի նկատմամբ իրենց զգայունությամբ: Այդ պատճառով, համընդհանուր մեթոդ, որը հնարավոր է կիրառել մանրէների բազմաքանակ և տարաբնույթ խմբերի պահպանման համար, դեռևս գոյություն չունի: Խոշոր հավաքածուներում մանրէների տարբեր խմբերը պահպանվում են տարբեր մեթոդներով: Բացի այդ, մանրէների հնարավոր կորուստը բացառելու համար յուրաքանչյուր շտամ պահպանվում է ոչ թե մեկ, այլ մի քանի մեթոդներով:

Պահպանման ընթացքում մանրէների պոպուլյացիայի հետերոգենությամբ պայմանավորված փոփոխականության արդյունքում փոփոխվում են դրանց ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական առանձնահատկությունները: Պահպանման գործընթացում, ինչպես մանրէների կուլտիվացման ընթացքում, կարող է տեղի ունենալ դիսոցում, այսինքն՝ բակտերիաների միատարր պոպուլյացիայի ճեղքավորում միմյանցից գենետիկական, ֆիզիոլոգիական, կենսաքիմիական և ձևաբանական հատկություններով տարբերվող տարբերկաների: Այդ պատճառով որոշ դեպքերում նպատակահարմար է ընտրել տվյալ տարբերակի պահպանման համար օպտիմալ պայմաններ, օրինակ՝ այն տարբերակի համար, որն օժտված է առավելագույն կենսասինթետիկ ակտիվությամբ:

Մանրէների պահպանման առավել տարածված մեթոդների թվին են պատկանում պարբերական փոխացանքերը թարմ սննդամիջավայրերում, կուլտուրայի պահպանումը սննդամիջավայրում վազելինային յուղի շերտի տակ, բջիջների պահպանումը լիոֆիլացված վիճակում: Մանրէները կարելի է պահպանել ցածր կամ գերցածր ջերմաստիճաններում, թորած ջրում կամ նատրիումի քլորիդի 1% լուծույթում, ինչպես նաև՝ մակակլանիչների վրա՝ չորացված վիճակում: Պահպանման մեթոդի ընտրությունը կախված է այն նպատակից, որի համար կիրառվում են մանրէները, ինչպես նաև՝ առկա տեխնիկական հնարավորություններից:

Մանրէների պահպանումը սննդամիջավայրում պարբերական փոխացանքերով

Այս մեթոդը լաբորատոր պայմաններում մանրէների երկարատև պահպանման սկզբնական մեթոդներից մեկն է և մինչ այժմ լայնորեն կիրառվում է մանրէաբանական աշխատանքներում: Աերոբ մանրէների փոխացանքը առավել հաճախ կատարվում է շեղակի մակերեսին, միկրոաերոֆիլ մանրէների փոխացանքը՝ 0.2-0.3% ագար-ագար պարունակող կիսահեղուկ սննդամիջավայրերում, անաերոբ մանրէների փոխացանքը՝ պինդ սննդամիջավայրերում խորքային ցանքով կամ հեղուկ սննդամիջավայրերում՝ հետևելով Ռ. Հանգեյթի տեխնիկայի սկզբունքներին: Կուլտուրաների փոխացանքը կատարում են թարմ սննդամիջավայրում 2 կրկնօրինակով: Հետագայում դրանցից մեկը օգտագործում են աշխատանքի համար, իսկ երկրորդը՝ պահպանում:

Թարմ սննդամիջավայրերում տարբեր մանրէների փոխացանքի հաճախականությունը տարբեր է և հիմնականում որոշվում է դրանց հատկություններով: Բազմաթիվ մանրէների փոխացանքը կարելի է կատարել 1-2 ամիս պարբերությամբ, չնայած այլ մանրէներ, օրինակ՝ կաթնաթթվային բակտերիաները, ավելի հաճախակի փոխացանքերի կարիք ունեն: Որոշ մանրէների փոխացանքի թույլատրելի ժամկետները ներկայացված են աղյուսակ 9-ում: Կուլտուրաների պահպանումը սառնարանում 4-6°C ջերմաստիճանային պայմաններում թույլ է տալիս երկարաձգել փոխացանքերի միջև ժամանակահատվածը:

Աղյուսակ 9.

Որոշ հետերոտրոֆ մանրէների պահպանման պայմանները և դրանց պարբերական փոխացանքերի թույլատրելի ժամկետները

Մանրէ	Սննդամիջավայր	Պահպանման ջերմաստիճանը, °C	Փոխացանքերի թիվը տարվա ընթացքում
Acetobacter aceti *A. xylinum*	6°Բ քաղցու+6% էթանոլ	18-20	12
Azotobacter chroococcum *A. vinelandii*	Էշբիի ագարային սննդամիջավայր	18-20	6
B. cereus *B. polymyxa* *B. subtilis*	Կարտոֆիլային	18-20	4

Մանրէ	**Սննդամիջավայր**	**Պահպանման ջերմաստիճանը, °C**	**Փոխանցումների թիվը տարվա ընթացքում**
Caulobacter sp.	ՄՊԱ շաքարասնկային լուծամզվածքով	4-6	2-3
Citrobacter freundii *E. coli*	ՄՊԱ ՄՊԱ Մսապեպտոնային արգանակ + 0.2% ագար-ագար	18-20 18-20 18-20	6 12 6-8
Lactobacillus casei	Յուղազրկված կաթ	18-20	18-20
L. delbrueckii *Leuconostoc mesenteroides*	8-10°Բ քաղցու+կավիճ	18-20	18-20
Micrococcus luteus *M. varians*	ՄՊԱ	18-20	6
Mycobacterium flavescens *M. fortuitum* *M. phlei* *M. smegmatis* *Nocardia* sp.	ՄՊԱ + 3°Բ քաղցու (1:1)	18-20 4-6 18-20	3-4 2-3 3-4
Pseudomonas aeruginosa *P. fluorescens*	ՄՊԱ	18-20	6-8
Propionibacterium freudenreichii	Եգիպտացորենի լուծամզվածքով կամ լակտատով սննդամիջավայրեր	4-6	4-5
Proteus vulgaris *P. mirabilis*	ՄՊԱ	18-20	9
S. aureus	ՄՊԱ	18-20	6
Streptomyces anulatus var. *griseus* *S. lavendulae*	Չապեկի ագարային սննդամիջավայր Վարսակային ագար	18-20	4
Saccharomyces cerevisiae *Candida guilliermondii* *Rhodotorula glutinis* *Schizosaccharomyces pombe* *Saccharomycodes ludwigii*	4-5°Բ ածիկային քաղցու ագար	18-20	4-5 6 6 6 4-5

Մանրէների կուլտուրաների պահպանումը մշտական փոխացանքերով ունի մի շարք էական թերություններ: Դրանցից հիմնականը որոշ ձևաբանական և ֆիզիոլոգիական հատկանիշների հնարավոր կորուստն է: Բացի այդ, հաճախակի փոխացանքերն ազդում են կուլտուրաների կենսաքիմիական ակտիվության վրա, մեծացնում կոնտամինացման վտանգը: Հեղուկ սննդամիջավայրերում հաճախակի փոխացանքերի դեպքում մեծ է ինքնաբուխ (սպոնտան) մուտանտների առաջացման և դրանց սելեկցիայի հավանականությունը:

Մանրէների պահպանումը հանքային յուղում

Հանքային յուղի տակ պահպանման եղանակը լայնորեն կիրառվում է բակտերիաների և մանրադիտակային սնկերի պահպանման համար: Այս մեթոդն ապահովում է կենսունակության և տարբեր կարգաբանական խմբերի մանրէների տաքսոնոմիական ու այլ հատկանիշների կայունության բավական երկարատև պահպանում: Յուղը կանխում է սննդամիջավայրի չորացումը, դանդաղեցնում նյութափոխանակության գործընթացները և թույլ է տալիս երկարաձգել փոխացանքերի միջև ժամանակահատվածը:

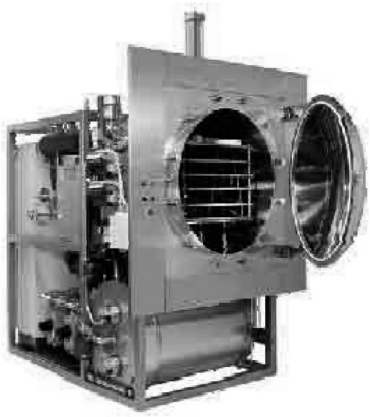
Մանրէներն աճեցնում են համապատասխան ագարային սնընդամիջավայրերի վրա. աերոբ մանրէները՝ շեղակների (45° անկյան տակ) մակերեսին, միկրոաերոֆիլ և ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէները՝ կիսահեղուկ սննդամիջավայրերում, անաերոբ մանրէները՝ սննդամիջավայրի խորքում: Լավ աճ դրսևորած կուլտուրաները ծածկում են յուղով: Որպես կանոն, սպոր չառաջացնող բակտերիաների կուլտուրաները ծածկում են ցանքից 2-7 օր հետո՝ կախված մանրէի աճի առանձնահատկություններից, իսկ սպոր առաջացնող մանրէների, օրինակ՝ բացիլների ու ակտինոմիցետների կուլտուրաները՝ սպորառաջացման փուլում: Շաքարասնկերին խորհուրդ է տրվում յուղով ծածկել 4-10, միցելիում առաջացնող սնկերին՝ 7-12 օր հետո: Մանրէների կուլտուրաների պահպանման համար հաճախ կիրառվում է մաքրության բարձր աստիճանով 0.8-0.9 խտությամբ վազելինային յուղը: Կուլտուրաները ծածկում են նախապես մանրէազերծված յուղով այնպես, որ յուղի շերտը սննդամիջավայրի մակերեսից (շեղակի դեպքում վերին ծայրը) չգերազանցի 1 սմ-ը, և պահպանում են սենյակային ջերմաստիճանում կամ սառնարանում՝ 4-6°C ջերմաստիճանային պայմաններում:

Ցանքի համար բջիջները վերցնում են մանրէաբանական օղակով, ապա յուղի ավելցուկը հեռացնելու համար այն զգուշությամբ հպում են սրվակի պատերին և փոխադրում թարմ սննդամիջավայր: Խորհուրդ է տրվում օգտագործել նույն կազմով սննդամիջավայր, որում պահպանվել է կուլտուրան: Շատ մանրէներ յուղի տակ պահելուց հետո առաջին փոխացանքում դանդաղ են աճում, սակայն հաջորդող փոխացանքերի դեպքում դրանց աճի արագությունը վերականգնվում է:

Վազելինային յուղի տակ մանրէների պահպանման մեթոդը պարզ է, հարմար, կարող է օգտագործվել ցանկացած լաբորատորիայում: Այս մեթոդի թերություններից է կոնտամինացման վտանգը, ինչպես նաև օգտագործվող ամանեղենը յուղից հատուկ միջոցներով մաքրելու անհրաժեշտությունը:

Մանրէների պահպանումը լիոֆիլացմամբ

Լիոֆիլացված բջիջների պահպանումը մանրէների երկարատև պահպանման լայն տարածված մեթոդ է: Լիոֆիլացում են անվանում սառեցված բջիջների վակուումում չորացման գործընթացը վակուումում: Լիոֆիլացված բջիջները պահպանում են սրվակներում, որոնք զոդված են վակուումում, կամ մանրէազերծված գազի (առավել հաճախ ազոտի) շիթում: Այս մեթոդի կիրառումը թույլ է տալիս 10-20 և



Նկար 71. Արտադրական (աջից) և լաբորատոր (ձախից) լիոֆիլատորներ:

ավելի տարիներ առանց նկատելի փոփոխությունների պահպանել բջիջների կենսունակությունը, ձևաբանական, կուլտուրային, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունները: Լիոֆիլացումն իրականացնում են հատուկ սարքավորումներում՝ լիոֆիլատորներում (նկար 71):

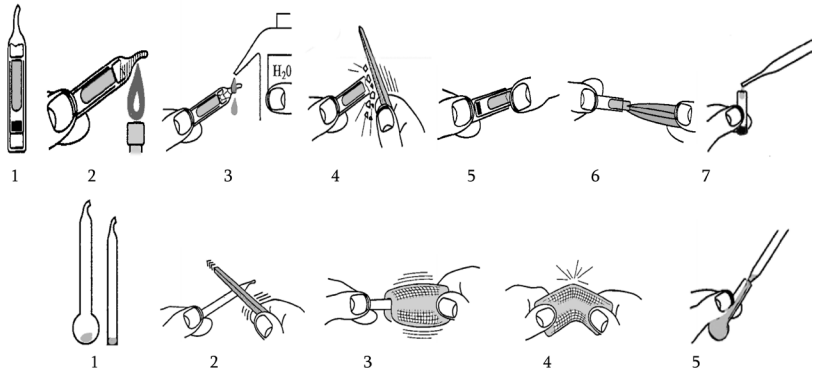
Լիոֆիլացվող մանրէները նախապես աճեցնում են օպտիմալ պայմաններում մինչև աճի ստացիոնար փուլի սկսվելը կամ հանգըստացող ձևերի ձևավորման ավարտը: Այնուհետև հատուկ հեղուկներում, որոնք կոչվում են պաշտպանիչ սննդամիջավայրեր, ստանում են այդ բջիջների կամ հանգստացող ձևերի կախույթը: Պաշտպանիչ սննդամիջավայրերի կազմի մեջ մտնում են տարբեր նյութեր, որոնք պաշտպանում են բջիջները վնասումներից սառեցման և չորացման ընթացքում:

Ստորև ներկայացված են որոշ պաշտպանիչ սննդամիջավայրերի բաղադրատոմսերը, որոնք օգտագործվում են տարբեր մանրէների բջիջների լիոֆիլացման ընթացքում.

- ժելատին 1 գ, սախարոզ 10 գ, թորած ջուր 100 մլ,
- յուղազրկված կաթ 100 մլ, գլյուկոզ 7 գ,
- յուղազրկված կաթ 100 մլ, NH_4Cl 0.5 գ, ասկորբինաթթու 0.5 գ, թիոմիզանյութ 0.5 գ,
- ձիու շիճուկ 75 մլ, մսային արգանակ 25 մլ, գլյուկոզ 7.5 գ:

Արդյունավետ լիոֆիլացման համար մանրէների կոնցենտրացիան պաշտպանիչ սննդամիջավայրում պետք է լինի որքան հնարավոր է բարձր՝ 10^9-10^{10} բջիջ 1 մլ-ում: Ստացված կախույթը լցնում են չեզոք ապակուց պատրաստված սրվակների մեջ՝ 0.5-1-ական մլ, սառեցնում են -20-ից մինչև -70°C ջերմաստիճանում, այնուհետև չորացնում են և զոդում վակուումում: Լիոֆիլացված բջիջների մնացորդային խոնավությունը տատանվում է 1-ից մինչև 6% և որոշվում է պաշտպանիչ սննդամիջավայրի կազմով և չորացման պայմաններով: Տարբեր լաբորատորիաներում սառեցման և չորացման պայմանները նկատելիորեն տատանվում են և կախված են առկա սարքավորումներից: Լիոֆիլացված բջիջներով սրվակները խորհուրդ է տրվում պահպանել մթության մեջ 4-6°C ջերմաստիճանում: Ավելի բարձր, հատկապես՝ 25-30°C-ից բարձր ջերմաստիճաններում, պահպանումը զգալիորեն իջեցնում է բջիջների կենսունակությունը:

Վերաակտիվացման համար լիոֆիլացված բջիջներին կաթիլ առ կաթիլ ավելացնում են (0.5-1 մլ) մանրէազերծված թորած կամ ծորակային ջուր (նկար 72), ապա ռեհիդրատացումից հետո (10 րոպեից



Նկար 72. Լիոֆիլացված բջիջներով երկխցիկանի (1-6) և միախցիկանի (1-4) սրվակների բացման հաջորդականությունը և սրվակում սննդամիջավայրի ավելացումը (7 և 5 համապատասխանաբար):

մինչև 2 ժամ) բջիջները ցանում են հարուստ սննդամիջավայրերում:

Լիոֆիլացումը լայնորեն կիրառում են տարբեր մանրէների երկարատև պահպանման համար: Այնուամենայնիվ, այս մեթոդը չի կարելի համընդհանուր համարել: Հարկ է նշել, որ լիոֆիլացմանն ավելի կայուն են գրամդրական, քան գրամբացասական բակտերիաները: Լիոֆիլացմամբ վատ են պահպանվում ֆոտոտրոֆ և քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաները, միկոպլազմները, բազմաթիվ օրլիգատ անաերոբ մանրէները: Սպորների կենսունակությունը լիոֆիլացումից հետո զգալիորեն բարձր է, քան վեգետատիվ բջիջներինը: *Pichia* և *Lipomyces* ցեղերի շաքարասնկերի փոքր բջիջները և ասկոսպորները լիոֆիլացմանն ավելի լավ են դիմանում, քան *Saccharomyces, Kluyveromyces, Rhodotorula* ցեղերի շաքարասնկերի խոշոր բջիջները և ասկոսպորները:

Մանրէների պահպանումը ցածր և գերցածր ջերմաստիճաններում

Մանրէների պահպանումը սառեցված վիճակում ցածր և գերցածր ջերմաստիճաններում այլ մեթոդների համեմատ բնորոշվում է առավել համընդհանրությամբ: Սակայն այս մեթոդը պահանջում է հատուկ սարքավորումներ և մեծ զգուշություն հեղուկ ազոտի հետ աշխատանքի ընթացքում, այդ իսկ պատճառով, կիրառվում է միայն

այն մանրէների պահպանման համար, որոնք չեն դիմանում լիոֆիլացմանը:

Բջիջները սառեցնում են ջերմաստիճանի լայն տիրույթում (-10-ից մինչև -196°C) և սառեցման տարբեր արագություններով: Ցածր ջերմաստիճանի վնասակար ազդեցությունից պաշտպանելու նպատակով նախապես բջիջներին ավելացնում են սառցապաշտպանիչ (կրիոպրոտեկտոր) լուծույթներ: Առավել հաճախ կիրառվող սառցապաշտպանիչներ են 10-20% գլիցերինի լուծույթը, 7-10% դիմեթիլսուլֆօքսիդի լուծույթը կամ 20% սախարոզի լուծույթը: Բարձր կոնցենտրացիայով (10^9-10^{10} բջիջ 1 մլ-ում) բջջային կախույթը լցնում են սրվակների մեջ, դրանք զոդում և տեղադրում են -70°C ջերմաստիճանով սառնարան (սառեցման արագությունը՝ 1°C/վ), այնուհետև տեղափոխում են հեղուկ ազոտի մեջ, որում և պահպանում են -196°C-ում: Սառեցված բջիջների հալեցումը պետք է իրականացնել որքան հնարավոր է արագ: Դրա համար սրվակները ընկղմում են 35-45°C ջերմաստիճանով ջրային բաղնիք և ինկուբացնում 2 րոպե, որից հետո ցանում են հարուստ սննդամիջավայրերում:

-20-ից մինչև -40°C ջերմաստիճանային պայմաններում պահպանելիս կենսունակ են մնում քիչ թվով մանրէներ: Առավել արդյունավետ է պահպանումը պինդ ածխաթթվում (-70°C) և հատկապես գերցածր ջերմաստիճանային պայմաններում, օրինակ՝ հեղուկ ազոտում (-196°C-ում), կամ հեղուկ ազոտի գազային փուլում (-210°C):

Մանրէների պահպանումը գլիցերոլում

Մանրէների պահպանման ամենահարմար մեթոդներից մեկը դրանց պահպանումն է ցածր ջերմաստիճաններում (-20°C) գլիցերոլի լուծույթում, որը ծառայում է որպես սառցապաշտպանիչ: Այս մեթոդը լայն տարածված է, սակայն ոչ բոլոր մանրէներն են դիմանում այդպիսի մշակմանը: Մանրէների պահպանման այս մեթոդն առավել լայն կիրառվում է սպորների կախույթների պահպանման համար:

Մանրէների պահպանումը թորած ջրում կամ նատրիումի քլորիդի 1% լուծույթում

Այս մեթոդը չի պահանջում հատուկ սարքավորումներ և հասանելի է ցանկացած փորձարարին:

Մանրէները նախապես աճեցնում են համապատասխան սնըդամիջավայրերում օպտիմալ պայմաններում, անհրաժեշտության դեպքում կենտրոնախուսում են, որից հետո ստանում են թորած ջրում կամ 1% NaCl-ի լուծույթում այդ բջիջների կախույթը: Բջիջների արդյունավետ պահպանմանը նպաստում է կախույթում բջիջների բարձր կոնցենտրացիան: Այն չպետք է 10^8-10^9 բջիջ/մլ քիչ լինի:

Կախույթը լցնում են մանրէազերծված անոթների կամ սրվակների մեջ և պահպանում են սառնարանում կամ սենյակային ջերմաստիճանում: Խորհուրդ է տրվում պահպանման համար վերցնել աճի վաղ ստացիոնար փուլի բջիջներ կամ արդեն ձևավորված հանգըստացող ձևեր՝ սպորներ կամ ցիստեր:

Այս մեթոդով որոշ մանրէների պահպանման թույլատրելի ժամկետները սառնարանում 4-6°C-ի պայմաններում ներկայացված են աղյուսակ 10-ում:

Աղյուսակ 10.

Մանրէների պահպանման թույլատրելի ժամկետները (ամիս) սառնարանային պայմաններում (4-6°C) թորած ջրում և 1% NaCl-ի լուծույթում

Մանրէ	Թորած ջուր	1% NaCl-ի լուծույթ
Arthrobacter globiformis	6	6
E. coli	12	12
Gluconobacter oxydans	12	6
B. subtilis	12	12
M. varians	12	12
P. aeruginosa	6	6
M. luteus	6	6
S. marcescens	12	12

Մանրէների պահպանումը մակակլանիչների վրա

Այս մեթոդը կիրառում են հիմնականում ակտինոմիցետների, մանրադիտակային սնկերի և սպոր առաջացնող անաերոբ բակտերիաների պահպանման համար: Որպես մակակլանիչ օգտագործում են հողը, կվարցի ավազը, սիլիկահողը, բամբակը, ֆիլտրի թուղթը:

Այս եղանակը չունի մշակված տեխնիկա: Ըստ այդ մեթոդի մանրէազերծված մակակլանիչը խառնում են բջիջների խիտ կախույթի հետ և չորացնում վակուումում կամ սենյակային ջերմաստիճանում: Ըստ որոշ տվյալների ակտինոմիցետները հողում կամ կվարցի ավազում պահպանելիս վերականգնում են որոշ կարգաբանական հատկանիշներ (օդային և սուբստրատային միցելիումի գունավորումը), որոնք անհետացել էին լաբորատորիայում երկարատև աճեցման գործընթացում:

Մանրէների կենսունակության գնահատումը երկարատև պահպանումից հետո

Պահպանման տարբեր ժամկետներից հետո մանրէների կենսունակությունը որոշում են հարուստ սննդամիջավայրերում դրանց ցանքով: Եթե ցանքը կատարվում է ագարացված սննդամիջավայրի վրա, ապա հաշվարկում են առաջացած գաղութները: Մանրէների դիմացկունության տոկոսը գտնում են կենսունակ բջիջների սկզբնական թվին (մինչև պահպանման սկիզբը) պահպանված բջիջների թվի հարաբերությամբ, որն ընդունվում է 100%:

ՄԱՍ ԵՐԿՐՈՐԴ
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

Թեմա 1
Մանրէների ուսումնասիրության մանրադիտակային մեթոդներ

Աշխատանք 1
Մանրադիտակներ, լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը: Մանրէների կենդանի պատրաստուկներ

Բովանդակություն: Մանրէաբանական լաբորատորիայում աշխատելու կանոնները, լաբորատոր սարքավորումների և աշխատատեղի նախապատրաստումը: Մանրէային կուլտուրաների հետ աշխատելու կանոնները (տե՛ս գլուխ 2): Լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը, աշխատանքի սկզբունքը և խնամքը: Մանրադիտակում փուլացայտերանգային հարմարանքի կիրառմամբ: Մանրէների կենդանի պատրաստուկների պատրաստումը և մանրադիտակումը (տե՛ս գլուխ 5):

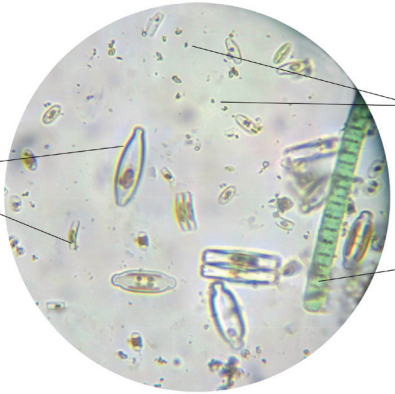
Առաջադրանք 1

Ծանոթացում լուսային մանրադիտակի կառուցվածքին: Տիղմի կենդանի պատրաստուկի պատրաստում ճզմված կաթիլի մեթոդով:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: Լուսային մանրադիտակ, մանրէաբանական օղակ, սպիրտայրոց, առարկայական ապակիներ, ծածկապակիներ, ունելի, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի մեկ կաթիլ, ապա, կաթիլին տիղմի մի փոքր զանգված ավելացնելով՝ ստանալ կախույթ, ծածկել ծածկապակիով ինչպես ցույց է տրված նկար 31-ում (տե՛ս գլուխ 5): Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը լուսային մանրադիտակով չոր համակարգի 40 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվով: Համեմատել պատրաստուկում տարբեր էուկարիոտային և պրոկարիոտային մանրէների ձևերը և չափսերը (նկար 73), նկարել գրանցամատյանում, աշխա-

տանքն ավարտելուց հետո մանրադիտակը ծածկել պոլիեթիլենային պարկով և մաքրել աշխատանքային տարածքը, լվանալ առարկայական ապակիները:



Նկար 73. Տիղմի մանրադիտակային պատկերը (400×):

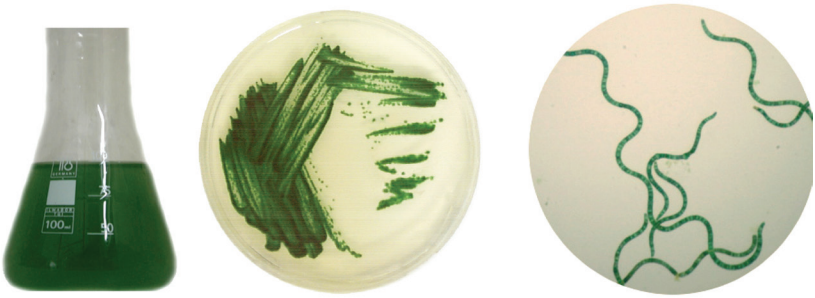
Առաջադրանք 2

Spirulina platensis մանրէի կենդանի պատրաստուկի պատրաստում ճզմված կաթիլի մեթոդով:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Cyanobacteria
Դաս Chroobacteria
Կարգ Oscillatoriales
Ընտանիք Phormidiaceae
Ցեղ *Spirulina*
Տեսակ *S. platensis*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են կլոր, հարթ եզրերով և մակերեսով գաղութներ (նկար 74 Բ): Թելանման օրգանիզմներ են, բաժանվում են միայն մեկ հարթությունում երկակի կիսմամբ: Թելիկի լայնությունը տատանվում է 1-5 մկմ սահմաններում, երկարությունը 12 մկմ է (նկար 74 Գ): Ֆոտոլիթոավտոտրոֆ են: Շնորհիվ նիտրոգենազ ֆերմենտի անաերոբ պայմաններում ունակ են դիազոտրոֆ սննդառության:



Ա Բ Գ

Նկար 74. *S. platensis*-ի կուտակիչ կուլտուրան հեղուկ սննդամիջավայրում (Ա), գաղութների պատկերը ագարացված հանքային սննդամիջավայրի մակերեսին (Բ), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (400×) (Գ):

Հանդիպում են քաղցրահամ, ծովային և աղի ջրերում, որոշ տեսակներ հանդիպում են աղի լճերում և որոշ տաք աղբյուրներում, որոնց ջերմաստիճանը 50°C է: Կայուն են սուլֆիդի նկատմամբ:

Որոշ տեսակներ ունեն սննդային նշանակություն (օգտագործվում են որպես սպիտակուցի աղբյուր):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. platensis* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ և ծածկապակիներ, մանրէազերծված պիպետներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, ծածկել ծածկապակիով ինչպես ցույց է տրված նկար 31-ում (տե՛ս գլուխ 5): Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը լուսային մանրադիտակմամբ չոր համակարգի 40 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվով: Նկարել գրանցամատյանում, առարկայական ապակիները և ծածկապակիները լվանալ:

Առաջադրանք 3

Azotobacter chroococcum մանրէի ճզմված կաթիլի մեթոդով պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը լուսային մանրադիտակով փուլացայտերանգային հարմարանքի օգնությամբ:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

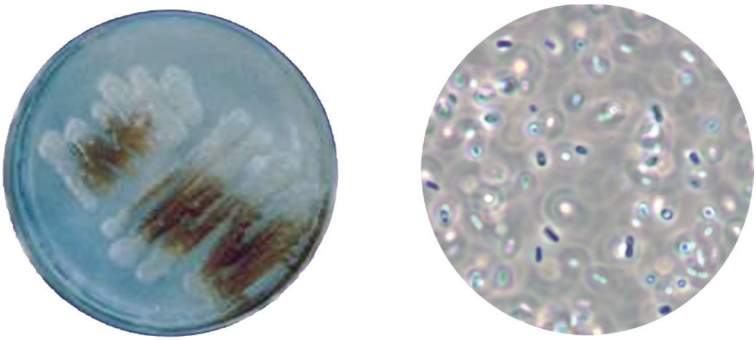
Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Gammaproteobacteria
Կարգ Pseudomonadales
Ընտանիք Azotobacteraceae
Ցեղ *Azotobacter*
Տեսակ *A. chroococcum*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են խոշոր լորձային, երբեմն՝ կնճռոտված գաղութներ: Ծերանալիս գաղութները դառնում են նախ վարդագույն, ապա դարչնականաչավուն կամ գորշ գույնի: Գաղութի գունավորումը ունի կարգաբանական նշանակություն (նկար 74 Ա):

Գրամբացասական, խոշոր՝ 1.5-2 մկմ տրամագծով, պլեոմորֆ բջիջներ են (նկար 75 Բ): Պատրաստուկում դասավորվում են մեկական, զույգերով, շղթաներով կամ անկանոն կույտերով: Էնդոսպոր չեն առաջացնում, սակայն անբարենպաստ պայմաններում կարող են առաջացնել ցիստեր: Ծերանալիս շրջապատվում են հաստ լորձային պատիճով: Բջիջները կամ անշարժ են, կամ շարժուն շնորհիվ պերիտրիխ դասավորված մտրակների:

Աերոբ կամ միկրոաերոֆիլ (աճում են թթվածնի ցածր պարցիալ ճնշման պայմաններում) են, սինթեզում են կատալազ: Սինթեզում են ջրալույծ կամ ջրում չլուծվող գունանյութեր: Քեմոօրգանահետերոտրոֆ են, յուրացնում են շաքարներ, սպիրտներ և օրգանական թթուներ: Սպիտակուցները չեն հիդրոլիզում: Որպես ազոտի աղբյուր օգտագործում են ազոտի ինչպես անօրգանական, այնպես էլ օրգանական միացությունները: Ազոտի աղբյուրների բացակայության պայմաններում ունակ են յուրացնելու մթնոլորտային ազոտը: Այս մանրէներն ազատ ապրող դիազոտրոֆներ են, այսինքն՝ իրականացնում են մթնոլորտային ազոտի ֆիքսում: Ազոտի ֆիքսումը կատալիզվում է նիտրոգենազ ֆերմենտով, որը պարունակում է մոլիբդեն և վանադիում: Աճում են 4.8-8.5 pH-ի տիրույթում: Մթնոլորտային ազոտի ֆիքսման և աճի օպտիմալ pH-ը 7-7.5 է: Մեկուսացվում են հողերից և ջրամաբարային ջրից:

Կուլտուրայի մեկուսացման և պահպանման նպատակով կիրառվում է Էշբիի էլեկտիվ սննդամիջավայրը (տե՛ս հավելված 1):



Ա Բ

Նկար 75. *A. chroococcum*-ի գաղութների պատկերը Էշբիի սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (400×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *A. chroococcum* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, փուլացայտերանգային հարմարանք, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ և ծածկապակիներ, մանրէազերծված պիպետներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Նախապատրաստել լուսային մանրադիտակը փուլացայտերանգային մանրադիտակման՝ կցելով մանրադիտակին փուլացայտերանգային հարմարանքը և փոխելով օբյեկտիվները (տե՛ս գլուխ 5):

Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, ծածկել ծածկապակիով ինչպես ցույց է տրված նկար 31-ում (տե՛ս գլուխ 5): Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել փուլացայտերանգային հարմարանքով լուսային մանրադիտակով՝ կիրառելով 40 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվը: Նկարել գրանցամատյանում, առարկայական ապակիները և ծածկապակիները լվանալ:

Առաջադրանք 4

Rhodospirillum rubrum մանրէի ճզմված կաթիլի մեթոդով պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը լուսային մանրադիտակով փուլացայտերանգային հարմարանքի օգնությամբ:

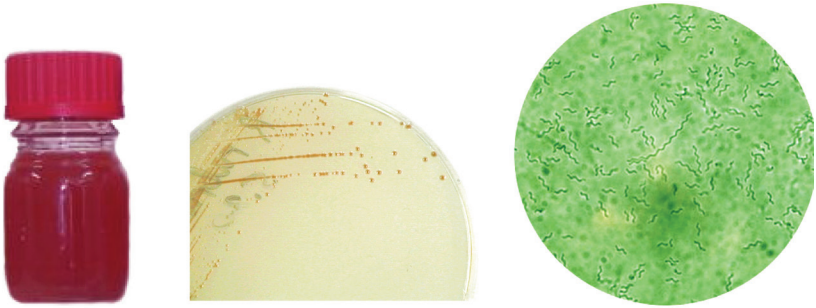
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Alphaproteobacteria
Կարգ Rhodospirillales
Ընտանիք Rhodospirillaceae
Ցեղ *Rhodospirillum*
Տեսակ *R. rubrum*

R. rubrum-ի կուտակիչ կուլտուրան Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում ունի վառ կարմիր կամ վարդագույն գունավորում (նկար 76 Ա): Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են ուռուցիկ, կլոր, հարթ եզրերով, կետային գաղութներ: Մթում գաղութները չեն գունավորվում, իսկ լույսի պայմաններում առաջացնում են մուգ վարդագույն բլթակավոր գաղութներ (նկար 76 Բ):

Գրամբացասական, պարուրաձև, 0.7-1.5 մկմ երկարությամբ, շնորհիվ բևեռային դասավորված մտրակների շարժուն բակտերիաներ են (նկար 76): Պատկանում են ծիրանագույն ոչ ծծմբային ոչ թթվածնածին (անօքսիգեն) ֆոտոտրոֆ բակտերիաներին: Հիմնականում ֆոտոավտոտրոֆ են, բայց կարող են գոյատևել որպես ֆոտոհետերոտրոֆներ, այսինքն՝ աճում են լույսի առկայությամբ անաերոբ պայմաններում պարզ օրգանական նյութերի ֆոտոասիմիլյացիայի հաշվին: Ունակ են ֆոտոտրոֆ սննդառության միայն անաերոբ պայմաններում: Մթության մեջ և աերոբ պայմաններում աճում են որպես քեմոօրգանահետերոտրոֆներ: Այս մանրէներում հայտնաբերվել են բակտերիաքլորոֆիլ «a» և կարոտինոիդներ: Դրանց ֆոտոսինթեզող համակարգերը տեղակայված են բջջի պլազմային թաղանթում կամ դրա ներփքումներում: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 25-35°C է, pH-ը՝ 6.8-7.2:

Հանդիպում են ջրամբարների անաերոբ շերտերում, դանդաղ հոսող ջրերում, լճերում և ծովերում: Հայտնի են *R. rubrum*-ի արգինազ ֆերմենտի շտամ-արտադրիչներ:



Ա Բ Գ

Նկար 76. *R. rubrum*-ի կուտակիչ կուլտուրան Օրմերոդի հեղուկ սննդամիջավայրում (Ա), գաղութների պատկերը Օրմերոդի պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին (Բ), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (400×) (Գ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *R. rubrum*-ի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, փուլացայտերանգային հարմարանք և օբյեկտիվ, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ծածկապակիներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Նախապատրաստել լուսային մանրադիտակը փուլացայտերանգային մանրադիտակման՝ կցելով մանրադիտակին փուլացայտերանգային հարմարանքը և փոխելով օբյետիվները (տե՛ս գլուխ 5): Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, ծածկել ծածկապակիով՝ ինչպես ցույց է տրված նկար 31-ում և մանրադիտակել փուլացայտերանգային հարմարանքով լուսային մանրադիտակմամբ՝ կիրառելով 40 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվը: Նկարել գրանցամատյանում, առարկայական ապակիները և ծածկապակիները լվանալ:

Աշխատանք 2
Մանրէների կենդանի պատրաստուկների պատրաստում մատնահետքերի մեթոդով և պատրաստուկների մանրադիտակում

Առաջադրանք 1

Streptomyces roseosporus մանրէի մատնահետքերի մեթոդով պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը լուսային մանրադիտակով:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Actinobacteria
Դաս Actinobacteria
Կարգ Actinomycetales
Ընտանիք Streptomycetaceae
Ցեղ *Streptomyces*
Տեսակ *S. roseosporus*

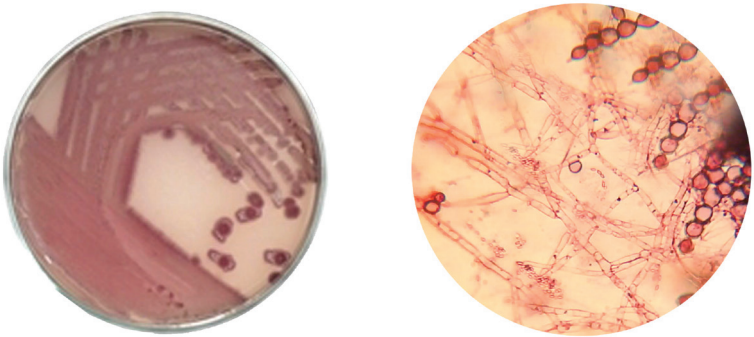
Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են կլոր, կնճռոտ, ուռուցիկ պրոֆիլով, անթափանց գաղութներ: Ստրեպտոմիցետների տարբեր տեսակների գաղութներն ունեն տարբեր գունավորում (սպիտակ, վարդագույն, դարչնագույն, սև և այլն), որն ունի կարգաբանական նշանակություն: Գրամդրական բակտերիաներ են, առաջացնում են ճյուղավորված թելեր կամ հիֆեր, որոնք բաժանվում են առանձին հատվածների (նկար 77 Ա): Վեգետատիվ հիֆերի յուրաքանչյուր ճյուղի մեծությունը տատանվում է 0.5-2 մկմ-ի սահմաններում: Պինդ սննդամիջավայրի վրա առաջացնում են առաջնային (սուբստրատային) և երկրորդային (օդային) «միցելիումներ»: Բազմաթիվ ձևերի վեգետատիվ բջիջները բաժանվում են միջնապատերով: Ճյուղավորումը կատարվում է բողբոջման եղանակով: Որոշ տեսակներ կարող են առաջացնել սպորներ (նկար 77 Բ): Ըստ սպորի առաջացման ձևի տարբերում են մոնո-, օլիգո- և պոլիսպորային ակտինոմիցետներ: Սպորառաջացումը հիմնականում էկզոգենային, հազվադեպ պսևդոէնդոգենային է:

Ակտինոմիցետներն աերոբ կամ ֆակուլտատիվ անաերոբ օրգանիզմներ են: Հիմնականում նեյտրոֆիլներ են, սակայն մեկուսացվել են նաև ացիդոֆիլ և ալկալիֆիլ ձևեր: Ակտինոմիցետները պահանջկոտ չեն սննդամիջավայրում ածխածնի աղբյուրների նկատմամբ, որոշները նույնիսկ օլիգոտրոֆ են:

Ստրեպտոմիցետների կարևոր առանձնահատկություններից

է գունանյութերի, ցնդող նյութերի (գեոսմին, արգոսմին, մուցիդոն, 2-մեթիլ-իզոբորնեոլ) սինթեզը: Դրանցով էլ ձևավորվում է հողի և ակտինոմիցետներով հարուստ ջրի յուրահատուկ հոտը: Ստրեպտոմիցետներն առաջացնում են նաև մի շարք հակաբիոտիկներ (ստրեպտոմիցին, նեոմիցին, քլորամֆենիկոլ):

Հիմնականում տարածված են հողում և ակտիվորեն մասնակցում են հումուսային նյութերի սինթեզին և քայքայմանը: Հայտնաբերվում են նաև ջրամբարներում և դրանց նստվածքներում, մի շարք անողնաշարավորների (անձրևորդի, տերմիտների) մարսողական համակարգում:



Ա Բ

Նկար 77. *S. roseosporus-ի գաղութների պատկերը Գաուզեի սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), միցելների և սպորների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):*

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: Ագարային սննդամիջավայրի մակերեսին նախապես աճեցված *S. roseosporus* մանրէի հոծ շերտով կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ծածկապակի, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծիչ լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէների հոծ շերտով աճեցված ագարային սննդամիջավայրից նշտարով կտրել ոչ մեծ խորանարդիկ և այն տեղադրել առարկայական ապակու վրա այնպես, որպեսզի մանրէներով մակերեսը ուղղված լինի դեպի վեր: Այնուհետև գազոնին հպել մաքուր ծածկապակի, թեթև սեղմել մանրէաբանական օղակով կամ ունելիով ինչպես ցույց է տրված նկար 33-ում և

անմիջապես հեռացնել: Մատնահետքով ծածկապակին տեղադրել ֆուքսինով կաթիլ պարունակող առարկայական ապակու վրա: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես ծածկապակու վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում, առարկայական ապակիները և ծածկապակիները լվանալ:

Աշխատանք 3
Մանրէների ֆիքսված (կամ մշտական) պատրաստուկներ: Մանրէների ձևաբանության ուսումնասիրությունը

Բովանդակություն: Մանրէների ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստման ընթացակարգը և մանրադիտակում իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ (տե՛ս գլուխ 5): Քսուքի պատրաստումը, չորացումը, ֆիքսումը և ներկումը (նկար 35):

Տարբեր ձևաբանություն ունեցող մանրէների մշտական պատարաստուկների պատրաստումը և մանրադիտակումը լուսային մանրադիտակով:

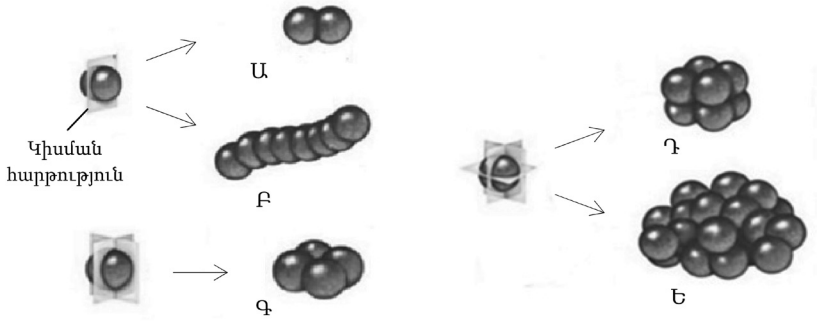
Մանրէների ձևաբանության համառոտ բնութագիրը

Տարբերում են պրոկարիոտների երեք հիմնական ձևեր՝ գնդաձև (կոկեր), ձողաձև (ցուպիկներ) և ոլորուն կամ պարուրաձև (սպիրիլներ): Որոշ պրոկարիոտների չափսն ու ձևը կենսացիկլի տարբեր փուլերում կարող է փոփոխվել կախված աճի պայմաններից: Այդպիսի պրոկարիոտներին անվանում են տարաձև կամ պլեոմորֆ:

Տարբերում են գնդաձև մանրէների մի քանի տարատեսակներ (մոնոկոկային, դիպլոկոկային, ստրեպտոկոկային, տետրակոկային, սարցինաձև, ստաֆիլակոկային)՝ կախված, թե ինչ հարթությամբ են կիսվում բջիջները և կիսվելուց հետո ինչպես են դասավորվում տարածության մեջ (նկար 78):

Ձողաձև մանրէները կիսվելուց հետո միմյանց նկատմամբ դասավորությունից կախված ևս լինում են տարատեսակ՝ մոնոբացիլային, դիպլոբացիլային և ստրեպտոբացիլային (նկար 79 Ա-Գ): Գնդաձև և ձողաձև մանրէների միջև միջանկյալ տեղ են զբաղեցնում կոկաբացիլները (նկար 79 Դ):

Պարուրաձև մանրէները բաժանվում են վիբրիոնային, զսպանակաձև և սպիրոխետային տարատեսակների (նկար 80):

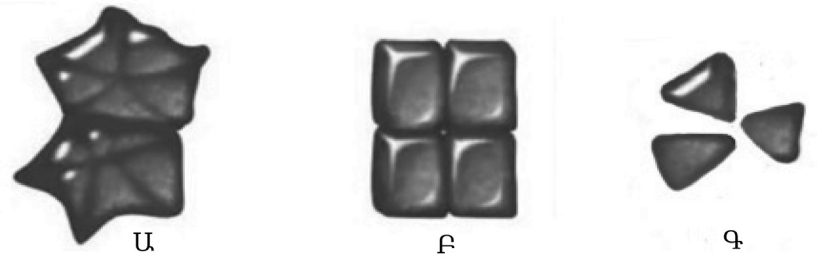


Նկար 78. Գնդաձև բակտերիաների տարատեսակները:
Ա) Դիպլոկոկային, Բ) Ստրեպտոկոկային, Գ) Տետրակոկային, Դ) Սարցինաձև, Ե) Ստաֆիլակոկային

Նկար 79. Ձողաձև բակտերիաների տարատեսակները:
Ա) Մոնոբացիլային, Բ) Դիպլոբացիլային, Գ) Ստրեպտոբացիլային, Դ) Կոկաբացիլային:

Նկար 80. Պարուրաձև մանրէներ:
Ա) Վիբրիոնային, Բ) Զապանակաձև, Գ) Սպիրոխետային:

Հանդիպում են նաև ելունդավոր, խորանարդաձև, աստղաձև, եռանկյան կամ ուղղանկյան տեսք ունեցող և նույնիսկ տձև պրոկարիոտային բջիջներ (նկար 81): Այդպիսի ձևաբանություն ունեն հատկապես արքեաները: Որոշ պրոկարիոտներ, որոնք ընդհանրապես զուրկ են բջջապատից, ունեն բջջի անկանոն ձև:



Նկար 81. Արքեաներին բնորոշ բջջի ձևերը:
Ա) Ասրդաշև, Բ) Խորանարդաշև, Գ) Եռանկյունաշև:

Առաջադրանք 1

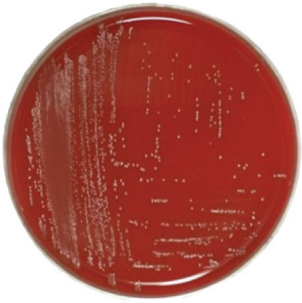
Enterococcus faecium մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

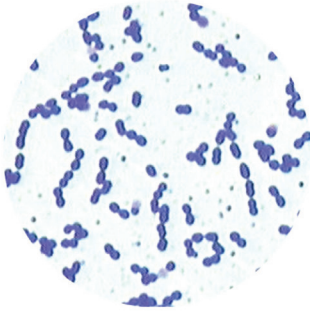
Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Bacilli
Կարգ Lactobacillales
Ընտանիք Enterococcaceae
Ցեղ *Enterococcus*
Տեսակ *E. faecium*

Արյուն պարունակող սննդամիջավայրերի մակերեսին առաջացնում են կլոր, սպիտակ կամ կաթնագույն, հարթ եզրերով և մակերեսով, մինչև 1 մմ տրամագծով գաղութներ (նկար 82 Ա): *E. faecium*-ը ձվաձև կամ գնդաձև 0.6-2.5 մկմ տրամագծով, էնդոսպոր չառաջացնող գրամդրական բակտերիաներ են (նկար 82 Բ): Երբեմն միավորվում են կարճ շղթաներում: Բջիջները ունակ են շարժման փոքրաթիվ մտրակներով: Պատիճ չեն առաջացնում: Աերոտոլերանտ անաերոբ են, քեմոօրգանահետերոտրոֆ, կաթնաթթվային խմորում հարուցող մանրէներ են: Խմորում են տարբեր ածխաջրեր՝ առաջացնելով հիմնականում L-կաթնաթթու և թթվեցնելով սննդամիջավայրը ընդհուպ pH-ի 4.2-4.6 արժեքները: Խմորումը չի ուղեկցվում գազառաջացմամբ: Կատալազ չեն սինթեզում: Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը 10-45°C է, իսկ օպտիմումը՝ 37°C: Լավ աճում են սննդամիջավայրերում, որոնցում NaCl-ի պարունակությունը կազմում է 6.5%, լեղաթթվային աղեր՝ 40%, pH-ը՝ 9.6: Ունակ են վերականգնելու նիտրատը: Լայն տարածված են շրջակա միջավայրում: *E. faecium* աղեստա-

մոքսային ուղու մշտական ներկայացուցիչ է: Որոշ էնտերոկոկեր պայմանական ախտածին մանրէներ են:



Ա



Բ

Նկար 82. *E. faecium*-ի գաղութների պատկերը արյունային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *E. faecium* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակմամբ իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 2

Neisseria gonorrhoeae մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Beta Proteobacteria
Կարգ Neisseriales
Ընտանիք Neisseriaceae
Ցեղ *Neisseria*
Տեսակ *N. gonorrhoeae*

Այս մանրէներն առաջին անգամ նկարագրել է Ա. Նեյսերը 1879 թ.-ին:

N. gonorrhoeae առաջացնում է ցողի տեսք ունեցող, թափանցիկ, փայլուն, հարթ մակերեսով, 1-2 մմ տրամագծով գաղութներ (նկար 83 Ա): Գրամբացասական, անշարժ, էնդոսպորներ չառաջացնող դիպլոկոկային ձև ունեցող մանրէներ են, հաճախ կոչվում են գոնոկոկեր (նկար 83 Բ): Բջիջները ունեն 0.6-1 մկմ տրամագիծ, երիկամաձև են՝ դասավորված գոգավոր կողմով միմյանց հանդիպակաց: Առաջացնում են պատիճ, որն օժտված է իմունագեն հատկություններով: Գոնոկոկերը ունեն ֆիմբրիաներ: Լավ են ներկվում անիլինային ներկերով: Գոնոկոկերի ցիտոպլազմում պարունակվում են նաև օսմեռֆիլ ներառուկներ: Այս մանրէներն աերոբ կամ ֆակուլտատիվ անաերոբ են, ունեն կատալազ, ցիտոքրոմօքսիդազ և օքսիդազ: Լավ են աճում 35-ից 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում, pH 6-8 տիրույթում, արյան շիճուկ և ասցիտային հեղուկ պարունակող սննդամիջավայրում:

Գոնոկոկերը հարուցում են գոնորեա (սուսանակ) սեռավարակը: Դրանք մարդու բացարձակ մակաբույծներ են, գոնոկոկերը բնական կամ փորձնական պայմաններում կենդանիներում ախտածնություն չեն առաջացնում:

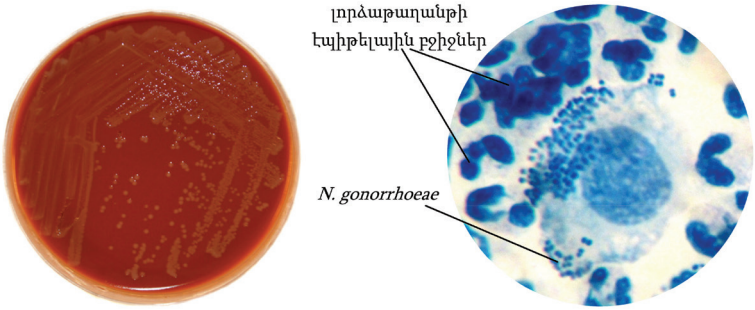
Գոնորեան փոխանցվում է սովորաբար սեռական ճանապարհով: Գոնոկոկերը ներթափանցում են օրգանիզմ լորձաթաղանթով, որում և կատարվում է դրանց բազմացումը:

Տղամարդկանց գոնորեան ընթանում է միզուկի կամ դրա առաջնային հատվածի լորձաթաղանթի սուր թարախային բորբոքմամբ: Այն կարող է բարդանալ՝ առաջացնելով պրոստատիտ, էպիդիդիմիտ կամ վերածվել քրոնիկական ձևի: Կանանց այդ հիվանդությու-

նը հենց սկզբից ընդունում է քրոնիկական, առանց ախտանշանների ընթացք՝ ախտահարելով միզուկը, հեշտոցը և արգանդի վզիկը:

Գոնոկոկերը հաճախ կարող են անցնել արյան մեջ և տարածվել օրգանիզմում՝ հարուցելով մենինգիտ, արթրիտ, էնդոկարդիտ: Գոնոկոկերը զգայուն են լույսի, ցածր և բարձր ջերմաստիճանի, չորացման և որոշ հակաբիոտիկների (պենիցիլինի, տետրացիկլինի և այլնի) նկատմամբ:

Գոնոկոկերը հարուցում են նորածին երեխաների աչքի շաղկապենու բորբոքում՝ բլենորեա: Նորածին երեխան գոնոկոկերով վարակվում է ծննդաբերության ընթացքում վարակակիր մոր սեռական օրգանների լորձաթաղանթների հետ շփման հետևանքով: Բլենորեայի կանխարգելման նպատակով նորածինների աչքերը մշակում են $AgNO_3$-ի 1-2% լուծույթով (Լյապիսի լուծույթով):



Ա Բ

Նկար 83. *N. gonorrhoeae* -ի գաղութների պատկերը շոկոլադային-արյունային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *N. gonorrhoeae*-ի ֆիքսված պատրաստուկներ, լուսային մանրադիտակ, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը:

Առաջադրանք 3

Streptococcus thermophilus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

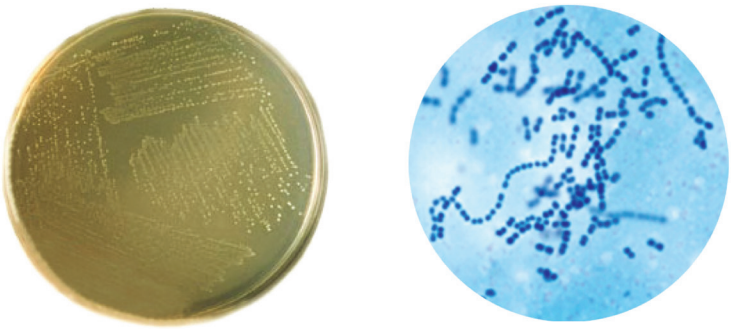
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Bacilli
Կարգ Lactobacillales
Ընտանիք Streptococcaceae
Ցեղ *Streptococcus*
Տեսակ. *S. thermophilus*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են մանր, կլոր (սննդամիջավայրի խորքում կարող են առաջացնել նաև ոսպաձև), տափակ պրոֆիլով, սպիտակ, հարթ եզրերով և մակերեսով գաղութներ (նկար 84 Ա):

Streptococcus ցեղի ներկայացուցիչները գրամդրական, անշարժ, սպոր չառաջացնող, շղթայաձև դասավորված ձվաձև կամ գնդաձև, 0.5-2 մկմ տրամագիծ ունեցող բակտերիաներ են (նկար 84 Բ): Որոշ տեսակների բջիջները շրջապատված են բազմաշաքարային պատիճով: Աերոտոլերանտ անաերոբներ են, կատալազ չեն սինթեզում, երբեմն աճի համար պահանջում են 5% ածխաթթու գազ: Քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են, աճում են բարդ սննդամիջավայրերում՝ հարուցելով կաթնաթթվային խմորում, որի հետևանքով սննդամիջավայր են արտազատում հիմնականում կաթնաթթու: Խմորումը չի ուղեկցվում գազառաջացմամբ: Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը 25-55°C է, իսկ օպտիմումը՝ 37°C: Ախտածին տեսակներն առաջացնում են արյունալուծում (հեմոլիզ): Մակաբույծ տեսակները սովորաբար հայտնաբերվում են ողնաշարավոր կենդանիների բերանային խոռոչում և վերին շնչառական ուղիներում:

S. thermophilus-ը մտնում է կաթնամթերքների մերանների կազմի մեջ: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմում 45°C է: *S. thermophilus*-ի որոշ շտամներ ունակ են սինթեզելու հակաբակտերիական ակտիվությամբ օժտված բակտերիացիններ:



Ա Բ

Նկար 84. *S. thermophilus*-ի գաղութների պատկերը հիդրոլիզացված կաթնային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. thermophilus* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

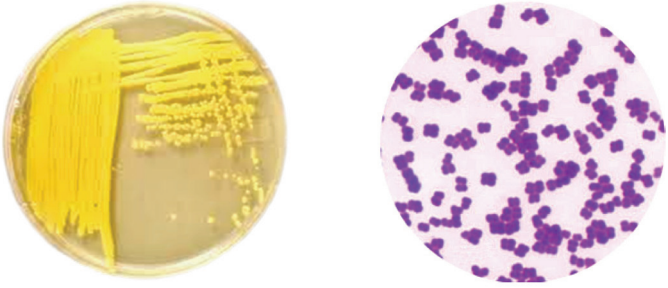
Առաջադրանք 4

Micrococcus luteus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Actinobacteria
Դաս Actinobacteria
Կարգ Micrococcales
Ընտանիք Micrococcaceae
Ցեղ *Micrococcus*
Տեսակ *M. luteus*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են կլոր, ուռուցիկ պրոֆիլով, հարթ մակերեսով և եզրերով գաղութներ (նկար 85 Ա): Կարոտինոիդային գունանյութերի շնորհիվ դրանց գաղութները դեղին (*M. luteus*) կամ կարմիր են (*M. roseus*): Միկրոկոկերի բջիջները գնդաձև են, 0.5 - 2 մկմ տրամագծով, դասավորվում են մեկական, զույգերով, տետրաղների կամ 8, 16, 32 և ավելի բջիջներ պարունակող խորանարդաձև փաթեթների ձևով (նկար 85 Բ): Հիմնականում անշարժ են, սպոր չեն առաջացնում: Քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են, օբլիգատ աերոբ, սինթեզում են կատալազ, պարունակում են ցիտոքրոմներ, ինդոլ չեն առաջացնում: Ածխաջրերի յուրացումը ուղեկցվում է թթվառաջացմամբ: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 25-ից մինչև 37°C է: Որպես կանոն աղաղիմացկուն են (հալոտոլերանտ), կարող են աճել սննդամիջավայրում մինչև 20% NaCl-ի առկայությամբ: Հանդիպում են հողերում և քաղցրահամ ջրերում, հաճախ մարդկանց և կաթնասունների մաշկի վրա, սակայն հիմնականում մեկուսացվում են օդից և սննդամթերքներից:



Ա Բ

Նկար 85. *M.luteus*-ի գաղութների պատկերը սննդային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *M. luteus* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի կամ ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 5

Staphylococcus aureus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

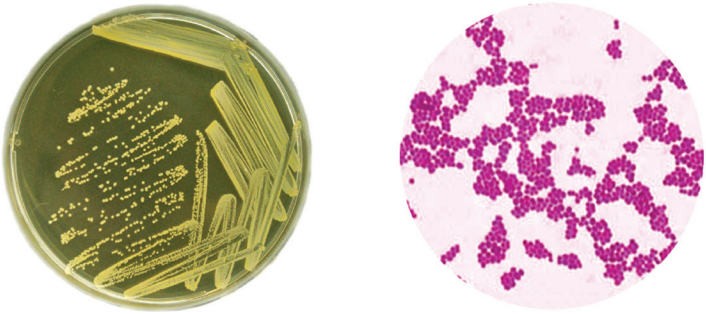
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Bacilli
Կարգ Bacillales
Ընտանիք Staphylococcaceae
Ցեղ *Staphylococcus*
Տեսակ *S. aureus*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են կլոր, հարթ եզրերով և մակերեսով, պղտոր գաղութներ (նկար 86 Ա): Ստաֆիլակոկերի տարբեր տեսակների գաղութներն ունեն տարբեր գունավորում: Օրինակ՝ *S. albus*-ը ունի սպիտակ, *S. aureus*-ը՝ ոսկեգույն, *S. citreus*-ը՝ կիտրոնագույն գունավորում: Հեղուկ սննդամիջավայրերում առաջացնում են հավասարաչափ բաշխված պղտորություն կամ փխրուն նստվածք:

Ստաֆիլակոկերը գրամդրական, անշարժ, 0.5-1.5 մկմ տրամագծով բջիջներ են, սպոր և պատիճ չեն առաջացնում (նկար 86 Բ): Ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէներ են, սինթեզում են կատալազ և օքսիդազ ֆերմենտներ: Քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են: Լիզիսի են ենթարկվում լիզոստաֆինի ազդեցությամբ, իսկ լիզոցիմի նկատմամբ կայուն են: Շնորհիվ β-լակտամազային ակտիվության ունակ են ճեղքելու լակտամային շարքի հակաբիոտիկներ, որի շնորհիվ կայուն են որոշ հակաբիոտիկների նկատմամբ: Սովորաբար աճում են 10% NaCl-ի առկայությամբ: Ստաֆիլակոկերի աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 30-37°C է:

Ստաֆիլակոկերը հանդիպում են փոշում, օդում, ջրում, տարբեր սննդամթերքներում, մարդու և կենդանիների լորձաթաղանթների, մաշկի, վերքերի վրա: Որոշ տեսակներ հարուցում են հարմարվողական (օպորտունիստական) վարակներ: Ախտածին ստաֆիլակոկերն առաջացնում են էնտերոտոքսիններ, որոնք հարուցում են սննդային թունավորումներ:



Ա Բ

Նկար 86. *S. aureus*-ի գաղութների պատկերը ՄՊԱ-ի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. aureus* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 6

Escherichia coli մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

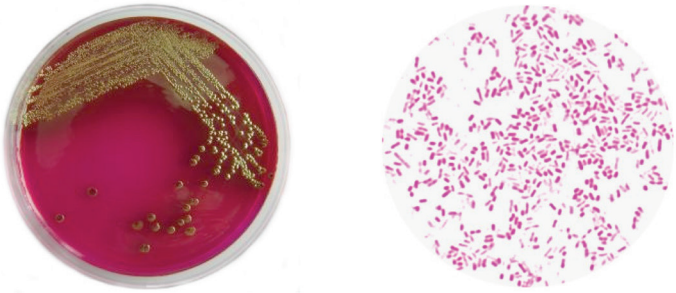
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Gammaproteobacteria
Կարգ Enterobacteriales
Ընտանիք Enterobacteriaceae
Ցեղ *Escherichia*
Տեսակ *E. coli*

Էնդոյի սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են միջին չափսի կլոր, հարթ եզրերով և մակերեսով, ուռուցիկ պրոֆիլով, կարմիր, մետաղական փայլով գաղութներ (նկար 87 Բ):

Գրամբացասական, 1.1-1.5 լայնությամբ և 2-6 մկմ երկարությամբ ձողաձև բակտերիաներ են, որոնք դասավորվում են մեկական կամ զույգերով (նկար 87 Բ): Շտամների մեծամասնության համար բնորոշ է պատիճների կամ միկրոպատիճների առկայությունը: Շարժունակ են պերիտրիխ դասավորված մտրակների շնորհիվ, հանդիպում են նաև անշարժ ձևեր: Ֆակուլտատիվ անաերոբ մանրէներ են, սինթեզում են կատալազ, բայց ոչ օքսիդազ: Անաերոբ պայմաններում խմորում են շաքարներ՝ առաջացնելով թթուներ և գազ: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 37°C է:

Հանդիպում են սառնարյուն և տաքարյուն կենդանիների, ինչպես նաև մարդկանց աղիների միկրոբիոտայում: *E. coli*-ը պայմանական ախտածին է, արտադրում է էնտերոտոքսիններ, որոնք կարող են հարուցել աղիքային հիվանդություններ:



Ա Բ

Նկար 87. *E. coli*-ի գաղութների պատկերը Էնդոյի ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *E. coli* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկն ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 7

Salmonella typhimurium մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

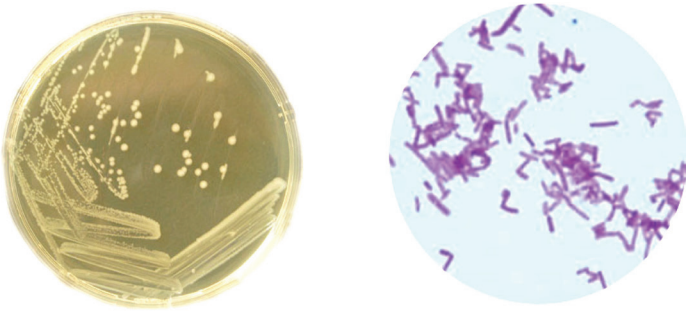
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Gammaproteobacteria
Կարգ Enterobacteriales
Ընտանիք Enterobacteriaceae
Ցեղ *Salmonella*
Տեսակ *S. typhimurium*

ՄՊԱ-ի մակերեսին առաջացնում են կլոր, ուռուցիկ կամ խառնարանային պրոֆիլով, հարթ եզրերով և մակերեսով, կիսաթափանցիկ սպիտակ մետաղական փայլով գաղութներ (նկար 88 Ա):

Գրամբացասական, 0.7-1.5 լայնությամբ և 2-5 մկմ երկարությամբ ձողաձև մանրէներ են (նկար 88 Բ): Սովորաբար շարժուն են պերիտրիխ դասավորված մտրակների շնորհիվ: Ֆակուլտատիվ անաերոբ են, սինթեզում են կատալազ ֆերմենտը, բայց չեն սինթեզում օքսիդազ ֆերմենտը: Քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են, անթթվածին պայմաններում խմորում են շաքարներ՝ առաջացնելով թթուներ և գազ: Աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը 37°C է: Հանդիպում են մարդկանց, ինչպես նաև տաքարյուն և սառնարյուն կենդանիների աղիներում, ինչպես նաև սննդամթերքներում:

S. typhimurium-ը հարուցում է որովայնային տիֆ աղիքային հիվանդությունը: Այս մանրէի լիպոպոլիսախարիդային պատիճի կազմում գտնվող O-հակածնի ացետիլացման հետևանքով փոխվում է վերջինիս կոնֆորմացիան, ինչը դժվարացնում է մանրէի ճանաչումը հակամարմիններով:



Նկար 88. *S. typhimurium*-ի գաղութների պատկերը ՄՊԱ-ի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. typhimurium* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 8

Pseudomonas aeruginosa մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Proteobacteria
Դաս Gammaproteobacteria
Կարգ Pseudomonadales
Ընտանիք Pseudomonadaceae
Ցեղ *Pseudomonas*
Տեսակ *P. aeruginosa*

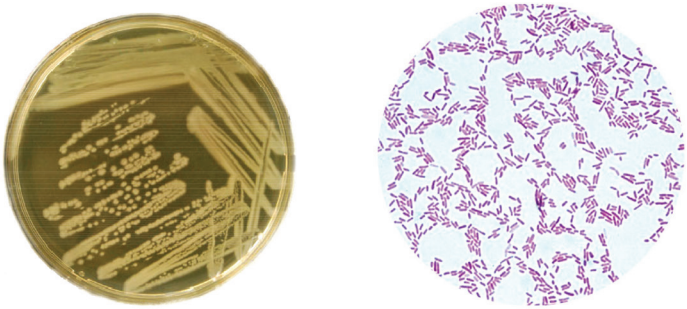
Pseudomonas ցեղի տեսակները առաջացնում են կլոր, հարթ եզրերով և մակերեսով, ուռուցիկ կամ տափակ պրոֆիլով, լորձային և մածուցիկ կազմությամբ, հատիկավոր կամ միասեռ կառուցվածքով գաղութներ (նկար 89 Ա):

Գրամբացասական ուղիղ կամ թույլ կորացած ձողաձև 0.5-1 լայնությամբ և 1.5-5 մկմ երկարությամբ բակտերիաներ են (նկար 89 Բ): Շարժուն են մեկ կամ մի քանի բևեռային դասավորված մտրակների շնորհիվ: Աերոբ կամ ֆակուլտատիվ անաերոբներ են, էներգափոխանակությունը շնչառական տիպի է: Աերոբ պայմաններում որպես էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտոր օգտագործում են թթվածինը, իսկ անաերոբ պայմաններում՝ նիտրատները (իրականացնում են դենիտրիֆիկացում): Որոշ տեսակներ անաերոբ պայմաններում խմորում են արգինինը: Սինթեզում են կատալազ ֆերմենտը, իսկ որոշ տեսակներ՝ նաև օքսիդազ ֆերմենտը: Քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են, որոշ տեսակներ ունակ են որպես էներգիայի աղբյուր օգտագործել H_2 և CO:

P. aeruginosa մանրէները հանդիպում են օդում, ծովային և քաղցրահամ ջրերում, հողում, տիղմում, հոսքային ջրերում և կարևոր դեր ունեն օրգանական նյութերի հանքայնացման գործընթացներում: Առաջացնում են մի շարք գունանյութեր՝ պիկոցիանին (կապտականաչ), պիովերդին (դեղնականաչ և լուսածորող) և պիոռուբին (կարմրադարչնագույն):

Որոշ տեսակներ առաջացնում են հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված նյութեր, իսկ որոշ տեսակներ էլ օգտագործվում են մանրէաբանական արտադրություններում մի շարք օրգանական թթուների (պիրոխաղողաթթվի, գլյուկոնաթթվի, α-կետոգլյուտարաթթվի), ամինաթթուների (ասպարգինաթթվի, գլյուտամինաթթվի,

վալինի), ֆերմենտների (ասպարգինազի և պերօքսիդազի) ստացման համար: Որոշ տեսակներ հարուցում են մարդկանց, կենդանիների և բույսերի հիվանդություններ:



Ա Բ

Նկար 89. *P. aeruginosa*-ի գաղութների պատկերը ցենտրիմիդային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *P. aeruginosa* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 9

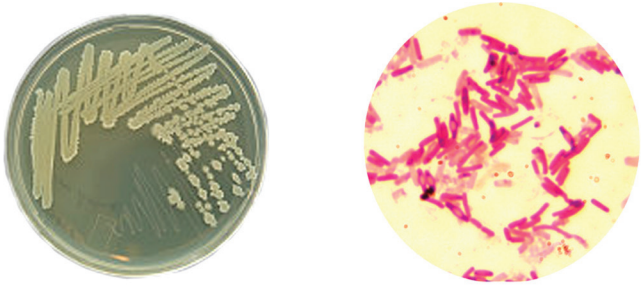
Bacillus subtilis մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Bacilli
Կարգ Bacillales
Ընտանիք Bacillaceae
Ցեղ *Bacillus*
Տեսակ *B. subtilis*

Պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են տարբեր ձևերի, անկանոն կամ ալիքաձև եզրերով, թավշային, անգույն կամ գունավորված գաղութներ (նկար 90 Ա):

Գրամդրական, 1-1.5 մկմ լայնությամբ և 2-6 մկմ երկարությամբ, էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաներ են (նկար 90 Բ): Սպորները ձվաձև են, կենտրոնական դասավորվածությամբ, վեգետատիվ բջջի ուռչեցում չեն առաջացնում: Շարժուն են պերիտրիխային դասավորված մտրակների շնորհիվ: Աերոբ կամ ֆակուլտատիվ անաերոբներ են, որոշ տեսակները անաերոբ պայմաններում կարող են իրականացնել շաքարների խմորում: Սինթեզում են կատալազ ֆերմենտը: Էներգափոխանակությունը շնչառական տիպի է: Անաերոբ պայմաններում որպես էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտոր կարող են օգտագործել նիտրիտներն և նիտրատները: Արտադրական նշանակության կարևոր ֆերմենտների՝ ամիլազների, պրոտեազների, ինչպես նաև պոլիպեպտիդային հակաբիոտիկների, ամինաթթուների և որոշ բազմաշաքարների ակտիվ արտադրիչներ են:



Ա Բ

Նկար 90. *B. subtilis*-ի գաղութների պատկերը ՄՊԱ-ի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. subtilis* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 10

Clostridium botulinum մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

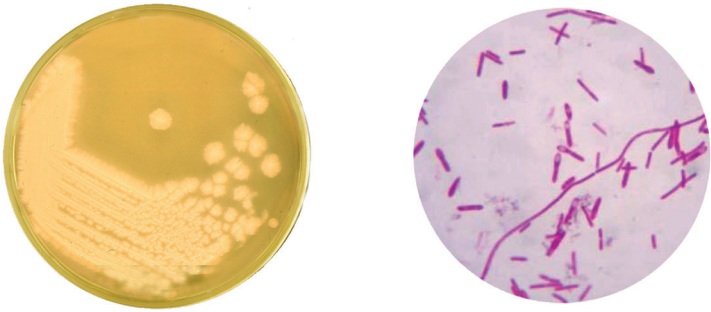
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Clostridia
Կարգ Clostridiales
Ընտանիք Clostridiaceae
Ցեղ *Clostridium*
Տեսակ *C. botulinum*

Չվի դեղնուց պարունակող ՄՊԱ-ի մակերեսին անաերոբ պայմաններում առաջացնում են անկանոն եզրերով, կաթնագույն խոշոր գաղութներ (նկար 91 Ա):

Գրամդրական, 0.3-2 մկմ լայնությամբ և 5-20 մկմ երկարությամբ, էնդոսպոր առաջացնող ձողաձև բակտերիաներ են (նկար 91 Բ): Հաճախ բջիջները դասավորվում են զույգերով կամ կարճ շղթաներով: Էնդոսպորները ձվաձև կամ գնդաձև են, ծայրային դասավորվածությամբ, առաջացնում են վեգետատիվ բջջի ուռչեցում: Շարժուն են պերիտրիխային դասավորված մտրակների շնորհիվ: Օբլիգատ անաերոբներ են, սակայն կարող են դիմանալ թթվածնի կարճատև ազդեցությանը շնորհիվ սուպերօքսիդդիսմուտազ ֆերմենտի: Կատալազ չեն առաջացնում: Մեծամասամբ քեմոօրգանահետերոտրոֆներ են, որոշ տեսակներ կարող են աճել քեմոավտոտրոֆ կամ քեմոլիթոտրոֆ եղանակով: Խմորում են շաքարները և ամինաթթուները՝ առաջացնելով թթուներ և սպիրտներ: Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը լայն է՝ 10-65°C, pH-ինը՝ 4.8-7: Հիդրոլիտիկ ֆերմենտների, մասնավորապես լիպազների ակտիվ արտադրիչներ են: Լայն տարածված են շրջակա միջավայրում: Շատ տեսակներ մարդու և կենդանիների ախտածիններ են:

C. botulinum-ը առաջացնում է բոտուլին նյարդատոքսինը և հարուցում բոտուլիզմ հիվանդությունը: *C. botulinum*-ն առաջին անգամ մեկուսացրել է Էմիլ վան Էրմենգեմը խոզապուխտից: Բոտուլիզմը անվանվել է նաև «երշիկային թունավորում» (լատ. botulus - երշիկ), քանի որ 18-ից 19-րդ դարերում վարակի հիմնական պատճառը եղել է երշիկը:



Ա Բ

Նկար 91. *C. botulinum*-ի գաղութների պատկերը անաերոբ պայմաններում ձվի դեղնուցային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *C. botulinum*-ի ֆիքսված պատրաստուկներ, լուսային մանրադիտակ, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը:

Առաջադրանք 11

Mycobacterium tuberculosis մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Actinobacteria
Դաս Actinobacteria
Կարգ Actinomycetales
Ընտանիք Corynebacterineae
Ցեղ *Mycobacterium*
Տեսակ *M. tuberculosis*

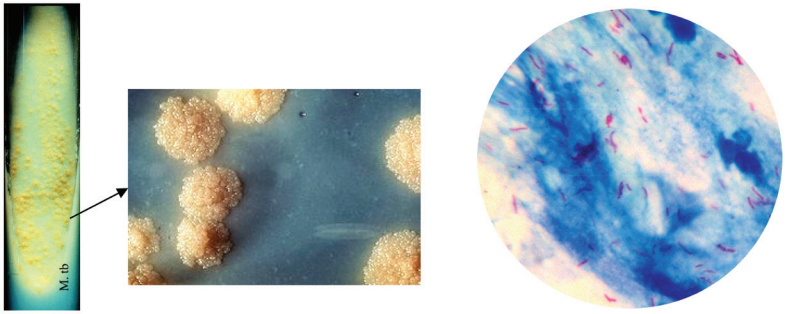
Լովենստեին-Ջենսենի պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են բարդ, բլրածածկ, կնճռոտ և լորձային, փղոսկրի գույնի գաղութներ (նկար 92 Ա):

Դրանց զգալի մասը լավ աճում է պարաֆինային սննդամիջավայրում: Հողում ապրող սապրոֆիտ միկոբակտերիաներն ավելի արագ են աճում պարզ սննդամիջավայրերում, իսկ ախտածին ձևերը աճում են ավելի բարդ կազմ ունեցող սննդամիջավայրերում և ավելի դանդաղ: Միկոբակտերիաները աերոբ, անշարժ, գրամդրական, ուղիղ կամ կորացած ձողաձև բակտերիաներ են (նկար 92 Բ): Երբեմն առաջացնում են թելանման կամ սնկամարմնի նման կառուցվածքներ, որոնք հատվածավորվում են՝ առաջացնելով ձողեր կամ գնդաձև բջիջներ: Որոշ տեսակներ պարունակում են կարոտինոիդային գունանյութեր: Սինթեզում են կատալազ և արիլսուլֆատազ ֆերմենտները: Թթվա- և սպիրտադիմացկուն են: Թթուների, ինչպես նաև դեղորայքի, նկատմամբ ունեցած դիմացկունությունը պայմանավորված է բջջապատում լիպիդների և մոմերի (մինչև 60%), այդ թվում՝ միկոլաթթուների առկայությամբ: Լիզոցիմի նկատմամբ բավականին կայուն են: Միկոբակտերիաները լայնորեն տարածված են շրջակա միջավայրում՝ ջրում, հողում, բուսական և կենդանական օրգանիզմներում: Ներկայումս հայտնի են մոտավորապես 200 ախտածին և սապրոֆիտ ձևեր: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 37-38°C է, pH-ը՝ 7-7.2:

Պալարախտի հարուցիչը՝ *Mycobacterium tuberculosis*-ը, հայտնաբերել է Ռ. Կոխը 1882 թ, այդ պատճառով էլ կոչվում է նաև Կոխի ցուպիկ: *M. tuberculosis*-ը առաջացնում է պալարախտ՝ խրոնիկ վարակիչ հիվանդություն, որը բնորոշվում է շնչառական օրգանների (թոքախտ), ոսկրերի (ոսկրախտ), հոդերի, մաշկի, միզասեռական և

մի քանի այլ օրգանների ախտահարմամբ: Մարդկանց պալարախտ հարուցում են միկոբակտերիաների ևս 2 այլ տեսակներ՝ *M. bovis* և *M. avium*:

M. tuberculosis-ը բարակ, նուրբ 0.2-0.7 մկմ լայնությամբ և 1-10 մկմ երկարությամբ պոլիմորֆ ցուպիկներ են: Կոխի ցուպիկները դիմացկուն են տարբեր ազդեցությունների նկատմամբ՝ կաթի մեջ ոչնչանում են 15-20 րոպե ընթացքում 60°C ջերմաստիճանային պայմաններում, խորխի մեջ պահպանվում են 1 ժ: Եռացնելիս այդ մանրէները ոչնչանում են 5 րոպե հետո: Ուղիղ արևի ճառագայթները ոչնչացնում են այս մանրէներին 45-55 րոպեում, իսկ ցրված լույսը՝ 8-10 օրվա ընթացքում: 5% ֆենոլը ոչնչացնում է մանրէներին 5-6 ժ ընթացքում:



Ա Բ

Նկար 92. *M. tuberculosis*-ի գաղութների պատկերը Լովենստեին-Ջենսենի սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *M. tuberculosis*-ի ֆիքսված պատրաստուկներ, լուսային մանրադիտակ, բենզին, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը:

Առաջադրանք 12

Thermus scotoductus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Deinococcus-Thermus
Դաս Deinococci
Կարգ Thermales
Ընտանիք Thermaceae
Ցեղ *Thermus*
Տեսակ *T. scotoductus*

Առաջացնում են համակենտրոն, հարթ մակերեսով, տափակ պրոֆիլով, ալիքաձև եզրերով, դեղնանարնջագույն գաղութներ (նկար 93 Ա): Գրամբացասական 0.5-0.8 մկմ լայնությամբ և 5-10 մկմ երկարությամբ ձողաձև մանրէներ են (նկար 93 Բ): Աճեցման որոշ պայմաններում կարող են առաջացնել 2-20 մկմ և նույնիսկ ավելի երկար թելանման բջիջներ: Գրեթե բոլոր տեսակների առանձին բջիջների միաձուլման հետևանքով առաջացնում են 10-20 մկմ տրամագծով գնդաձև մարմնիկներ: Այդ մարմնիկները հիմնականում առկա են մանրէի ծերացող կուլտուրայում: Բջիջները անշարժ են, մտրակներ չունեն, էնդոսպոր չեն առաջացնում: Կարոտինոիդային գունանյութերի շնորհիվ պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին ձևավորում են կարմիր, դեղին կամ նարնջագույն գաղութներ:

Աերոբներ են, սինթեզում են օքսիդազ և կատալազ ֆերմենտները: Թերմոֆիլներ են, աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 70-75°C-ն է, իսկ pH օպտիմումը՝ թույլ հիմնայինից չեզոք:

Հիմնականում տարածված են տաք և ջերմային աղբյուրներում, հանդիպում են նաև ջրատաքացման համակարգերում:

Ա Բ

Նկար 93. *T. scotoductus*-ի գաղութների պատկերը սննդային ագարի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *T. scotoductus* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսինի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, քսիլոլի կամ էթանոլի լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 13

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

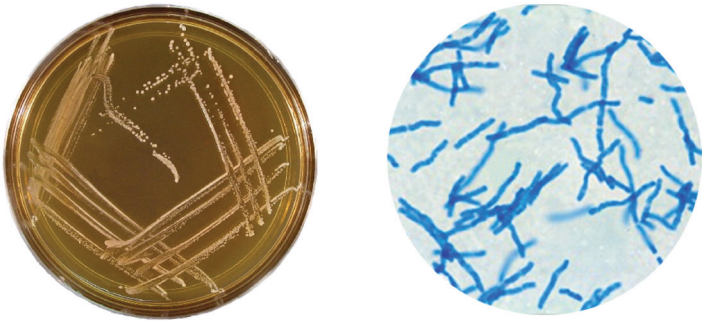
Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Firmicutes
Դաս Bacilli
Կարգ Lactobacillales
Ընտանիք Lactobacillaceae
Ցեղ *Lactobacillus*
Տեսակ *L. delbrueckii*
Ենթատեսակ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Գաղութները միջին մեծության են, կլոր, հարթ մակերեսով և եզրերով, կաթիլային պրոֆիլով և սպիտակ գունավորմամբ (նկար 94 Ա): Ման-Ռագոզա-Շառպի (ՄՌՇ) սննդամիջավայրի խորքում առաջացնում են 2-5 մմ տրամագիծ ունեցող անգույն, ուռուցիկ գաղութներ բրգաձև կամ հնդկացորենի ձևի գաղութներ: Լավ են աճում նաև կաթնային շիճուկ պարունակող ագարի վրա (40^{0}C-ում)՝ առաջացնելով խճճված բամբակի թելիկներ կամ ձյան փաթիլներ հիշեցնող գաղութներ:

Գրամդրական 0.5-1.2 մկմ լայնությամբ և 1-10 մկմ երկարությամբ բարակ, երկար, երբեմն թելանման անշարժ ցուպիկներ են (նկար 94 Բ): Որոշ տեսակներ շարժուն են, ունեն մտրակների պերիտրիխ դասավորություն: Դրանց բնորոշ է պլեոմորֆիզմը: Այս մանրէները համարվում են տիպիկ հոմոֆերմենտային կաթնաթթվային խմորման հարուցիչներ, որոնք սննդամիջավայրում կուտակում են հիմնականում կաթնաթթու: Լակտոբացիլները աերոտոլերանտ անաերոբներ են, չեն սինթեզում կատալազ, չեն պարունակում ցիտոքրոմներ:

Այս ցեղի ներկայացուցիչները՝ *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*-ն ունեն կարևոր արդյունաբերական նշանակություն: Դրանք հայտնաբերվում են կենդանական և բուսական ծագմամբ սննդամթերքներում՝ սիլոսում, խմորվող գարեջրում, պահածոյացվող պտուղներում, բանջարեղենում և հյութերում, կաթնամթերքներում:

Այս մանրէները կազմում են կաթնասունների և թռչունների մարսողական համակարգի միկրոբիոտայի բաղադրիչ մասը:



Ա Բ

Նկար 94. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*-ի գաղութների պատկերը ՄՌԾ-ի սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում, կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 14

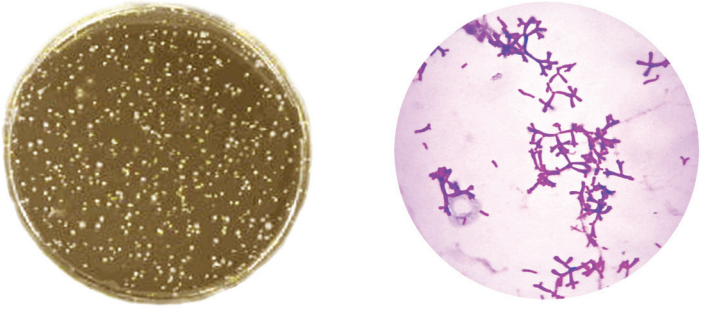
Bifidobacterium bifidum մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Actinobacteria
Դաս Actinobacteria
Կարգ Bifidobacteriales
Ընտանիք Bifidobacteriaceae
Ցեղ *Bifidobacterium*
Տեսակ *B. bifidum*

Առաջին անգամ մեկուսացրել է ֆրանսիացի մանկաբույժ Հենրի Թիսերը նորածին երեխայի կղանքից: Անաերոբ պայմաններում ՄՌԾ սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են կլոր, մանր, հարթ մակերեսով և եզրերով, տափակ պրոֆիլով, սպիտակ գաղութներ (նկար 95 Ա): Գրամդրական, անշարժ, կեռացած կամ հաճախ ճյուղավորվող (*bifidum* լատիներեն նշանակում է երկճեղքված, կիսված երկու կեսի) անաերոբ սպոր չառաջացնող ցուպիկներ են: Բջիջների դասավորվածությունը մեկական է, զույգերով, երբեմն շղթաներով կամ վարդակներով (նկար 95 Բ):

Աճի համար սննդամիջավայրում պահանջվում է պարաամինաբենզոյաթթու և պանտոտենաթթու: Չեն դիմանում թթվային պայմաններին, չեն աճում pH<4.5 պայմաններում: Ակտիվորեն սինթեզում են պերօքսիդներ: Սինթեզում են նաև B խմբի (B1, B2 և այլն) և K վիտամիններ: Ակտիվ խմորում են ածխաջրերը՝ առաջացնելով քացախաթթու և կաթնաթթու: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 37-41°C: Կիրառվում են պրոբիոտիկների ստացման համար:



Ա Բ

Նկար 95. *B. bifidum*-ի գաղութների պատկերը անաերոբ պայմաններում ՄՌԾ-ի ագարացված սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. bifidum* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 15

Leptospirillum sp. մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

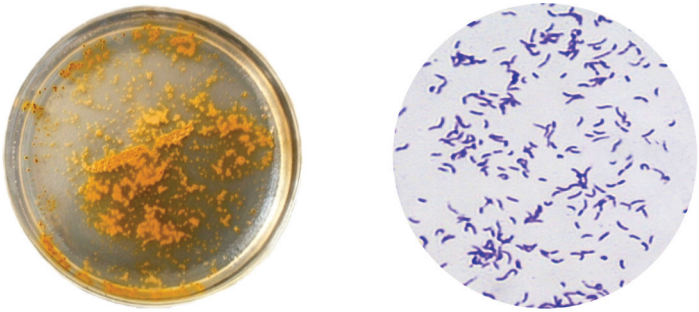
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Bacteria
Ֆիլում Nitrospirae
Դաս Nitrospira
Կարգ Nitrospirales
Ընտանիք Nitrospiraceae
Ցեղ *Leptospirillum*
Տեսակ *Leptospirillum* sp.

Մաննինգի և Ջոնսոնի սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են մանր լորձային դեղնանարնջագույն գաղութներ (նկար 96 Ա):

Գրամբացասական, 0.2-0.4 մկմ լայնությամբ և 0.9-1.1 մկմ երկարությամբ վիբրիոիդ կամ պարուրաձև մանրէներ են (նկար 96 Բ): Շարժուն են բևեռային մտրակի շնորհիվ: Աերոբ, օբլիգատ քեմոլիթոտրոֆներ են, էներգիա ստանում են Fe^{2+} օքսիդացմամբ: Թիոբացիլների հետ սինտրոֆ աճի պայմաններում կարող են յուրացնել սուլֆիդները: Ացիդոֆիլներ են, ունակ են աճելու pH-ի 1.5-4 տիրույթում, pH օպտիմումը՝ 2.5-3: Որոշ շտամներ չափավոր թերմոֆիլներ են:

Լայն տարածված են սուլֆիդային հանքավայրերում և մետաղական հանքապարներում: Կարևոր դեր են կատարում մետաղների կենսատարրալվացման գործընթացներում և օգտագործվում են արտադրական նպատակներով հանքաքարերից և հանքաթափոններից արժեքավոր մետաղների կորզման համար:



Ա Բ

Նկար 96. *Leptospirillum sp.*-ի գաղութների պատկերը Մաննինգի և Ջոնսոնի սնընդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *Leptospirillum sp.* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, մանրէազերծիչ լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված ծորակային ջրի կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը ինչպես ցույց է տրված նկար 35-ում: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 16

Methanospirillum hungatei մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Archaea
Ֆիլում Euryarchaeota
Դաս Methanomicrobia
Կարգ Methanomicrobiales
Ընտանիք Methanospirillaceae
Ցեղ *Methanospirillum*
Տեսակ *M. hungatei*

Անաերոբ պայմաններում սննդամիջավայրի մակերեսին առաջացնում են վառ կաթնագույնից մինչև վառ դեղին, կլոր, ուռուցիկ, թիակավոր եզրերով գաղութներ (նկար 97 Ա): Պարուրաձև, 0.4-0.5 մկմ լայնությամբ և 7-10 մկմ երկարությամբ մեկական կամ շղթաներով դասավորված մանրէներ են (նկար 97 Բ): Շղթաների երկարությունը կարող է հասնել մի քանի հարյուր միկրոմետրի: Բջիջները ծածկված են պատյանով: Էնդոսպորներ չեն առաջացնում: Ըստ Գրամի ներկվում են բացասական: Շարժուն են շնորհիվ բևեռային մտրակների: Խիստ անաերոբ են, մեթանածին: Քեմոլիթոավտոտրոֆ են: Որոշ շտամներ աճի համար պահանջում են սննդամիջավայրում ցիստեինի և ացետատի առկայություն: Էներգիան ստանում են անաերոբ շնչառական գործընթացում, որն ուղեկցվում է մեթանի առաջացմամբ: Աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 35-45°C, pH-ը՝ 7-7.5: Ներառում են նաև թերմոֆիլ ձևեր:

Ազոտային ավտոտրոֆներ են, այսինքն՝ որպես ազոտի աղբյուր յուրացնում են ազոտի անօրգանական միացությունները, հիմնականում դիազոտրոֆ են: Հանդիպում են խոշոր եղջերավոր կենդանիների գանձակում, մետանտենկերում, երկրաջերմային աղբյուրներում և ոռոգման ջրերի տիղմում:

Նկար 97. *M. hungatei*-ի գաղութների պատկերը անաերոբ պայմաններում աճեցված ագարային սննդամիջավայրի մակերեսին (Ա), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *M. hungatei*-ի ֆիքսված պատրաստուկներ, լուսային մանրադիտակ, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը:

Առաջադրանք 17

Haloarcula japonica մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում:

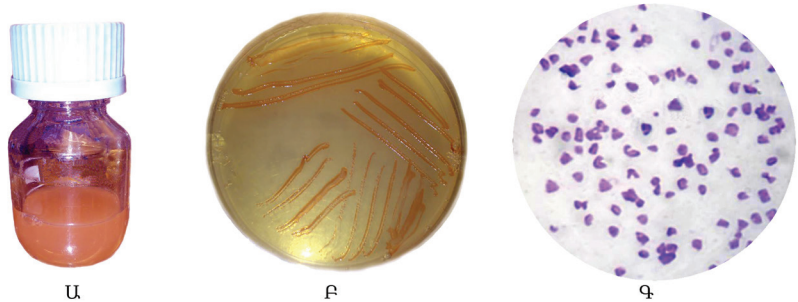
Դիտարկվող օբյեկտի համառոտ բնութագիրը

Դոմեն Archaea
Ֆիլում Euryarchaeota
Դաս Halobacteria
Կարգ Halobacteriales
Ընտանիք Halobacteriaceae
Ցեղ *Haloarcula*
Տեսակ *H. japonica*

Կազամինաթթվային ագարացված պինդ սննդամիջավայրերի մակերեսին առաջացնում են կլոր, 0.2-3 մմ տրամագիծ ունեցող, հարթ եզրերով և մակերեսով, ուռուցիկ պրոֆիլով, լորձային գաղութներ, որոնց գույնը կախված սննդամիջավայրի կազմից և աճեցման պայմաններից կարող է փոխվել վարդագույնից նարնջագույնի (նկար 98 Ա):

Եռանկյունաձև, մեկական դասավորված մանրէներ են (նկար 98 Բ): Էքստրեմալ հալոֆիլներ են: Բնորոշվում են եռգլիցերիդ-2 բևեռային լիպիդների պարունակությամբ: Տարածված են աղի լճերում, աղի ծովերում, աղուտ-ալկալի հողերում և աղի հանքերի քարաղում: Աճի համար պահանջում են սննդամիջավայրում նվազագույնը 1.5 Մ NaCl-ի պարունակություն, իսկ աճի օպտիմում են դրսևորում 2-4.5 Մ աղի պայմաններում: Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը 25-45°C:

Ֆակուլտատիվ անաերոբ են, էներգափոխանակությունը շնչառական տիպի է: Պլազմային թաղանթում պարունակում են կարոտինոիդների կովալենտ կապված բակտերիառոդոպսին (արքեառոդոպսին) սպիտակուցը, որը լույսի պայմաններում ծառայում է որպես պրոտոնային պոմպ և, դրանով իսկ, մասնակցում ԱԵՖ-ի սինթեզին: Իրականացնում են միայն իրենց մենահատուկ բակտերիոռոդոպսին կախյալ ֆոտոտրոֆ գործընթաց: Անաերոբ պայմաններում մթության մեջ էներգիայի կուտակման եղանակն անաերոբ շնչառությունն է (էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտորն է NO_3^-): Անաերոբ պայմաններում կարող են իրականացնել նաև արգինինի և ցիտրուլինի խմորում:



Նկար 98. *H. japonica*-ի կուտակիչ կուլտուրան կազամինաթթվային հեղուկ սննդամիջավայրում (Ա), գաղութների պատկերը կազամինաթթվային ագարացված սննդամիջավայրի մակերեսին (Բ), բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Գ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *H. japonica* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մանրէազերծված պիպետներ, մանրէազերծված 20% NaCl-ի լուծույթ, 2%-ոց քացախաթթու, բյուրեղային վիոլետի լուծույթ, մայրիի յուղ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին կաթեցնել մանրէազերծված 20% NaCl-ի լուծույթի մեկ կաթիլ, ապա կաթիլում կախույթ ստանալու նպատակով տեղադրել հետազոտվող մանրէային բջիջների ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և մշակել 2 % քացախաթթվի լուծույթով 5 րոպե, ապա ներկել բյուրեղային վիոլետով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Աշխատանք 4
Մանրէների համակեցությունների կազմի ուսումնասիրությունը մանրադիտակային մեթոդներով

Բովանդակություն: Բնական համակեցություններ: Մածնի և բերանի խոռոչի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը: Մածնի ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստումը, մանրադիտակումը իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ:

Ատամների փառի և քիմքի լորձաթաղանթի ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստումը և մանրադիտակումը իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ:

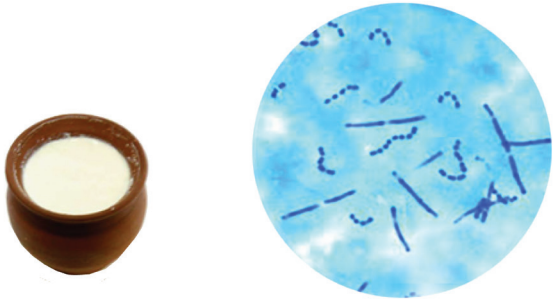
Առաջադրանք 1
Մածնի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը:

Մածնի միկրոբիոտա

Մածունը (գրաբար մածանել, մածնել - թանձրանալ, մակարդվել բառից) հայկական ավանդական կաթնամթերքն է, որն օժտված է բարձր կենսաքիմիական ակտիվությամբ և պարունակում է կենդանի կաթնաթթվային մանրէներ: Հարուստ է վիտամիններով և օրգանիզմի համար օգտակար բազմաթիվ տարրերով:

Մածունը որոշակի կաթնաթթվային մանրէների բնականորեն ձևավորված համակեցություն է, որի կազմում հայտնաբերվում են կաթնաթթվային մանրէներից *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ցեղերի տեսակներ և տարբեր շաքարասնկեր (նկար 99):

Մածնում կաթնաթթվային բակտերիաները հարուցում են հետերոֆերմենտային խմորում, որի հետևանքով սննդամիջավայրում կուտակվում է կաթնաթթու, քացախաթթու և էթանոլ: Մածունն օժտված է սպիտակուցները ճեղքելու ունակությամբ, հակաբակտերիական և լիպազային ակտիվությամբ: Մածնի բաղադրության մեջ մտնող կաթնաթթվային բակտերիաները ունակ են սինթեզելու սպիտակուցային բնույթ ունեցող հակաբիոտիկներ՝ բակտերիացիններ:



Ա Բ

Նկար 99. Մածնից (Ա) պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակային պատկերը (1000×) (Բ):

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: Մածուն, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, մեթիլեն կապույտի լուծույթ, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու մակերեսին մանրէազերծված մանրէաբանական օղակով տեղադրել հետազոտվող մածնի ոչ մեծ քանակություն, տարածել քսուքի ստացման համար, չորացնել, ֆիքսել և ներկել մեթիլեն կապույտի լուծույթով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Համեմատել պատրաստուկում տարբեր մանրէների ձևերը և չափերը, նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

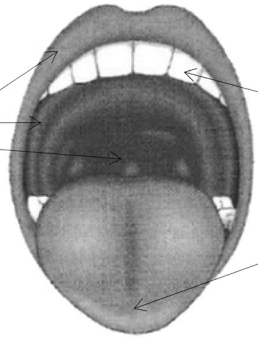
Առաջադրանք 2
Բերանի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը:

Բերանի խոռոչի միկրոբիոտան

Բերանի խոռոչի միկրոբիոտան չափազանց հարուստ է: Թքի կայուն ջերմաստիճանը, խոնավությունը, դրա թույլ հիմնային ռեակցիան, սննդի մնացորդները նպաստավոր պայմաններ են ստեղծում տարբեր մանրէների աճի և բազմացման համար: Մեկ միլիլիտր թուքը պարունակում է տասնյակ միլիոնավոր աերոբ և անաերոբ մանրէներ, որոնց մի մասը բերանի խոռոչի մշտական բնակիչներն են (աուտոխտոն միկրոբիոտա), իսկ մյուս մասը՝ պատահական մանրէներ (ալոխտոն միկրոբիոտա): Մանրէներով հատկապես հարուստ են լնդերը և ատամների միջև եղած տարածությունները (նկար 100):

Մարդու բերանի միկրոբիոտայի մշտական ներկայացուցիչներից են ստրեպտոկոկերը՝ ներկայացված ֆակուլտատիվ անաերոբ (*Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, և կարիեսի հարուցիչը՝ *S. mutans*) և օբլիգատ անաերոբ (*Peptostreptococcus*) ձևերով, ինչպես նաև գրամդրական թելանման մանրէներով (*Actinomyces viscosus*): Բերանի խոռոչի միկրոբիոտայում հայտնաբերվում են նաև լակտոբացիլներ, *Neisseria* և *Veillonella* ցեղերին պատկանող գնդաձև գրամբացասական մանրէներ, ինչպես նաև օբլիգատ անաերոբ գրամբացասական ցուպիկներ, որոնք պատկանում են *Bacteroidaceae* ընտանիքին (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*): Բերանի խոռոչի մշտական միկրոբիոտայի կազմում ընդգրկված են նաև սպիրոխետների տարբեր տեսակներ՝ *Treponema denticola*, *T. orale*, *T. macrodenticum*, *Borrelia buccalis*, լեպտոսպիրաներ, միկոպլազմներ, նոկարդիաներ և զանազան նախակենդանիներ՝ *Entamoeba buccalis*, *E. dentalis*, *Trichomonas buccalis*: Բերանի խոռոչի պատահական միկրոբիոտային են պատկանում մաշկի և այլ լորձաթաղանթների վրա բնակվող կոմենսալները, արտաքին միջավայրից ներթափանցող բազմաթիվ սապրոֆիտներ և հիվանդ կամ վարակակիր մարդկանցից օդակաթիլային կամ սննդային ճանապարհով ներթափանցող այլ ախտածին մանրէներ: Բերանի խոռոչում բնակվելու բարձր հարմարվողական ունակությամբ օժտված են ստաֆիլակոկերը, ստրեպտոկոկերը, կորինեբակտերիաները, *Candida* ցեղի խմորասնկերը, հերպեսային վիրուսները, էպիդեմիկ պարոտիտի հարուցիչները և այլն:

Բերանի խոռոչի առաջնային միկրոբիոտան ձևավորվում է ծնընդաբերական ուղիներով պտղի անցման ընթացքում և ներկայացված է լակտոբացիլներով, էնտերոբակտերիաներով, կորինեբակտերիաներով, ստաֆիլակոկերով և միկրոկոկերով:



Նկար 100. Բերանի խոռոչի տարբեր հատվածներում մանրէների տեղաբաշխվածությունը:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: Ատամնափառի կամ քիմքի լորձաթաղանթ, լուսային մանրադիտակ, քսուքի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէազերծված ատամի փայտիկներ կամ բամբակյա խծուծ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ֆուքսին, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէազերծված ատամի փայտիկով վերցնել ատամնափառի (կամ բամբակյա խծուծով քիմքի լորձաթաղանթի) ոչ մեծ քանակություն և տեղադրել նախապես առարկայական ապակու վրա կաթեցված ջրի կաթիլում և տարածել այն համասեռ կախույթ ստանալու համար: Ստացված քսուքը չորացնել, ֆիքսել և ներկել ֆուքսինի լուծույթով: Այնուհետև լվանալ ծորակային ջրի բարակ շիթով, ֆիլտրի թղթով զգուշությամբ չորացնել պատրաստուկը: Մանրադիտակը նախապատրաստել աշխատանքի և մանրադիտակել պատրաստուկը (նախապես պատրաստուկի վրա ավելացնելով 1 կաթիլ մայրիի յուղ) լուսային մանրադիտակով իմերսիոն համակարգի 100 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվի կիրառմամբ: Համեմատել պատրաստուկում տարբեր մանրէների ձևերը և չափսերը, նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Աշխատանք 5
Տարբերակիչ ներկմամբ ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստման մեթոդներ

Բովանդակություն: Բակտերիաների բջջապատի կառուցվածքը: Գրամդրական և գրամբացասական մանրէները: Բջջապատի ներկումը տարբերակիչ ներկմամբ:

Էնդոսպորներ, էնդոսպոր առաջացնող մանրէներ: Սպորների ներկումը ըստ Պեշկովի տարբերակիչ ներկմամբ:

Պատիճ, դրա հայտնաբերումը ըստ Հինսի: Մտրակներ, տեղաբաշխվածությունը և հայտնաբերումը ըստ Պեշկովի մշակմամբ Լյոֆլերի մեթոդի: Պատրաստուկների մանրադիտակում իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ:

Առաջադրանք 1
Բակտերիաների ներկումն ըստ Գրամի:

Բակտերիաների բջջապատի կառուցվածքի առանձնահատկությունները

Բջջապատի մոլեկուլային կառուցվածքի և քիմիական բաղադրության հետ է կապված բակտերիաների ունակությունը ներկվելու ըստ Գրամի: Այդ ներկումը, որն առաջարկել է դեռևս 1884 թ. դանիացի գիտնական Քրիստիան Գրամը, կարևոր տարբերակիչ հատկանիշ է, որը կապվում է բակտերիաների բազմաթիվ այլ հատկանիշների հետ: Ըստ Գրամի առաջարկած մեթոդի բակտերիաները բաժանվում են 2 խմբի՝ գրամդրական, որոնք ըստ այդ մեթոդի ներկելիս ներկվում են, և գրամբացասական՝ որոնք չեն ներկվում:

Ըստ Գրամի բակտերիաները ներկելիս կիրառում են անիլինային խմբի ներկերից մեթիլ վիոլետը (գենցիանային մանուշակագույն կամ բյուրեղային վիոլետ), որը յոդի հետ առաջացնում է ջրում չլուծվող, բայց սպիրտում լուծվող կոմպլեքսային միացություն: Գրամդրական բակտերիաների բջիջներում յոդի և մեթիլ վիոլետի կոմպլեքսն ամուր կապվում է բջջապատի և պլազմային թաղանթի հետ և բջիջները սպիրտով մշակելիս չի լուծվում, ուստի այդ բակտերիաները ներկվում են մանուշակագույն: Գրամբացասական բակտերիաների բջիջներում յոդի և մեթիլ վիոլետի կոմպլեքսը սպիրտով մշակելիս լուծվում է, և, հետևաբար, բջիջները գունազրկվում են:

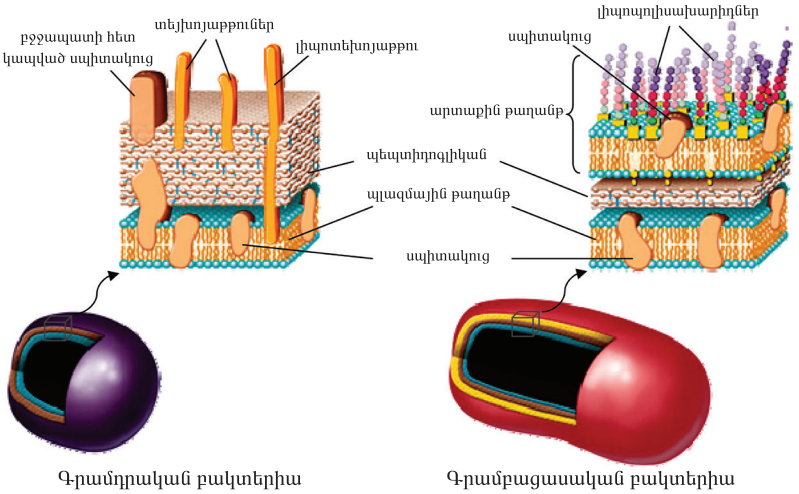
Գունազրկված բջիջները լրացուցիչ ֆուքսինով կամ սաֆրանինով ներկելիս ձեռք են բերում վարդագույն գունավորում:

Որպես կանոն ըստ Գրամի ներկում են միայն երիտասարդ բջիջները, քանի որ յոդի և մեթիլ վիոլետի կոմպլեքսը պահելու ունակությունը կախված է բակտերիաների ֆիզիոլոգիական վիճակից:

Գրամդրական բակտերիաներից են *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus, Micrococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Mycobacterium, Streptomyces, Bifidobacterium* և այլ ցեղերի ներկայացուցիչները:

Գրամբացասական մանրէներից են *Escherichia, Salmonella, Azotobacter, Pseudomonas, Neisseria, Rhodospirillum, Thermus* և այլ ցեղերի ներկայացուցիչները:

Գրամդրական և գրամբացասական բակտերիաների բջջապատի կառուցվածքային առանձնահատկությունները բերված են նկար 101-ում:

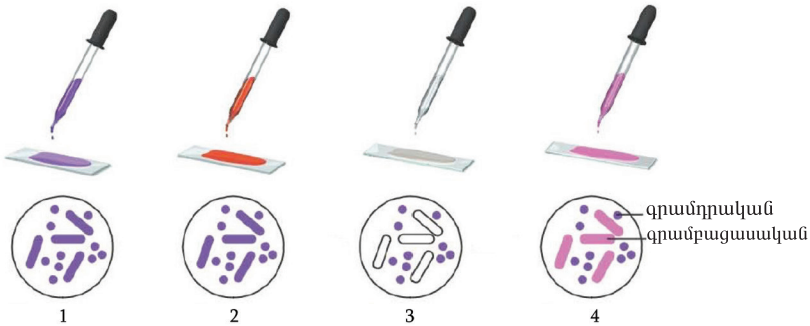


Նկար 101. Բակտերիական բջջապատի կառուցվածքը:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. aureus*-ի, *E. coli*–ի մաքուր կուլտուրաներ, հետազոտվող որևէ մանրէի կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, սպիրտայրոց կամ գազայրոց, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետ-

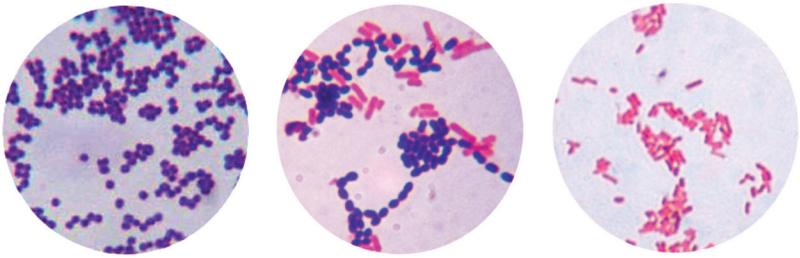
ներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, մեթիլ վիոլետի 1% ջրային լուծույթ, Լյուգոլի լուծույթ, սաֆրանինի 1-2% ջրային լուծույթ, 96% էթանոլ, ապակյա բաժակ, մայրիի յուղ, բենզին, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու վրա միաժամանակ պատրաստել 3 տարբեր բակտերիական կուլտուրաների քսուքներ՝ գրամդրական (*S. aureus*), գրամբացասական (*E. coli*) և դրանց միջև հետազոտվող կուլտուրա: Քսուքները չորացնել, ֆիքսել և պատրաստուկին ավելացնել մեթիլ վիոլետի 1% ջրային լուծույթ՝ թողնելով 2 րոպե (նկար 102), որից հետո ներկանյութը թափել և առանց լվանալու պատրաստուկին ավելացնել Լյուգոլի լուծույթ ($KI+I_2$) և թողնել 2 րոպե: Այնուհետև թափել Լյուգոլի լուծույթը, պատրաստուկը 15-20 վայրկյան ընկղմել 96% էթանոլի մեջ և անմիջապես լվանալ ջրի բարակ շիթով: Ապա պատրաստուկի վրա ավելացնել սաֆրանին և թողնել 2 րոպե, որից հետո լվանալ ջրի բարակ շիթով, չորացնել և մանրադիտակել՝ կիրառելով իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվները:



Նկար 102. Ներկման հաջորդականությունը ըստ Գրամի:
1. Ներկումը մեթիլ վիոլետով, 2. Ներկումը Լյուգոլի լուծույթով, 3. Գունազրկումը 96% սպիրտով, 4. Կրկնակի ներկումը սաֆրանինով:

Գրամդրական բակտերիաները ներկվում են մանուշակագույն, իսկ գրամբացասականները՝ վարդագույն կամ կարմիր (նկար 103):



Ա Բ Գ

Նկար 103. Մանրէների ներկումը ըստ Գրամի:
Ա) Գրամդրական մանրէ (S. aureus) (1000×), Բ) Հեղուկացնող քսուք (1000×), Գ) Գրամբացասական մանրէ (E. coli) (1000×):

Պարզել հետազոտվող քսուքում մանրէների բջջապատի կառուցվածքը և նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Առաջադրանք 2

B. subtilis-ի էնդոսպորների ներկումը Պեշկովի մեթոդով:

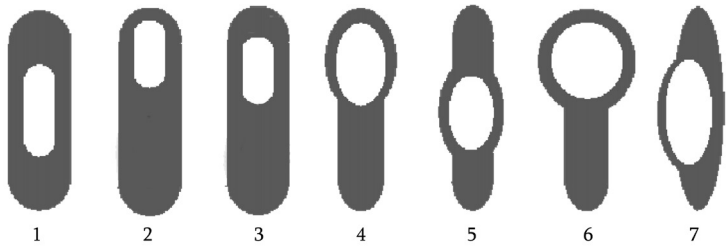
Էնդոսպորներ

Որոշ բակտերիաներ սննդանյութերի պակասին, նյութափոխանակության արգասիքների կուտակմանը, միջավայրի pH-ի և ջերմության փոփոխությանը և այլ գործոնների ազդեցությանը դիմակայելու համար առաջացնում են էնդոսպորներ: Յուրաքանչյուր վեգետատիվ բջջում առաջանում է մեկ էնդոսպոր: Էնդոսպորների առաջացումը ուղեկցվում է բջջի բարդ ֆիզիոլոգիական փոփոխություններով: Էնդոսպորները բավականին դիմացկուն են բարձր ջերմաստիճանի, չորացման, ճառագայթման և քիմիական նյութերի ազդեցության նկատմամբ: Էնդոսպորների ջերմակայունությունը պայմանավորված է ազատ ջրի քիչ քանակությամբ (մոտավորապես 15%) և միայն դրանցում հայտնաբերվող դիպիկոլինաթթվի (պիրիդին 2,6-երկկարբոնաթթու) կալցիումական աղով, որի սինթեզը բջջում նախորդում է էնդոսպորների առաջացմանը: Հասուն էնդոսպորը պատված է մի քանի շերտից բաղկացած ամուր թաղանթով:

Էնդոսպորների մեծությունը, ձևը (կլորավուն, ձվաձև, ձվածիր) և վեգետատիվ բջջում դրանց տեղադրությունը տարբեր է (նկար 104) և ունի կարգաբանական նշանակություն:

Հասուն էնդոսպորները երկար տարիներ պահպանում են իրենց ծլելու և վեգետատիվ բջիջների վերածվելու ունակությունը: Այսպես, *B. subtilis*-ի և *B. lichenioformis*-ի էնդոսպորները հողում կարող են պահպանել իրենց կենսունակությունը 200-300 տարի, իսկ *B. coagulans*-ի էնդոսպորները՝ 50-100 տարի: Կենսունակ էնդոսպորներ են մեկուսացվել նաև հազարամյակների ընթացքում պահպանված բրածո կենդանիների դիակներից և եգիպտական մումիաներից:

Էնդոսպորներ առաջացնում են գրամդրական բակտերիաներից *Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus, Sporosarcina, Thermoactinomyces, Desulfotomaculum* ցեղերի, իսկ գրամբացասականներից *Heliobacter* ցեղի ներկայացուցիչները:



Նկար 104. Բակտերիաների վեգետատիվ բջջում էնդոսպորների տեղադրությունը և ձևը: *1. Կենտրոնական, առանց ուռչեցման (B. megaterium), 2. Ծայրային կամ բևեռային, առանց ուռչեցման (B. thuringiensis) 3. Ենթածայրային կամ ենթաբևեռային, առանց ուռչեցման (B. subtilis) 4. Ծայրային կամ բևեռային ուռչեցմամբ (B. macerans), 5. Կենտրոնական ուռչեցմամբ՝ կլոստրիդիում (B. polymyxa), 6. Ծայրային կամ բևեռային, ուռչեցմամբ՝ պլեկտրիդիում (B. sphaericus), 7. Կողքային կամ լատերալ ուռչեցմամբ (B. laterosporus):*

Էնդոսպորներին շրջապատող բավականին հաստ թաղանթը գրեթե անթափանցելի է ներկանյութերի համար, ուստի ներկման սովորական մեթոդների դեպքում դրանք չեն ներկվում: Էնդոսպորների հայտնաբերման համար կիրառվում են ներկման հատուկ տարբերակիչ մեթոդներ:

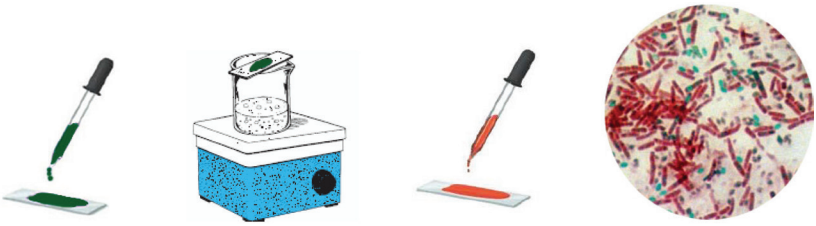
Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. subtilis*-ի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, սպիրտայրոց կամ գազայրոց, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ըստ Լյոֆլերի մեթիլեն կապույտի ջրային լուծույթ, 0.5% չեզոք կարմիրի ջրային լուծույթ, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէի կուլտուրայի ֆիքսված քսուքի վրա ավելացնել ըստ Լյոֆլերի մեթիլեն կապույտ ներկանյութը, տաքացնել սպիրտայրոցի բոցի վրա մինչև եռալը (10-15 վրկ), որից հետո սառեցնել, լվանալ ջրի բարակ շիթով և լրացուցիչ ներկել (30 վրկ) նեյտրալ կարմիրի 0.5% ջրային լուծույթով (նկար 105): Այնուհետև ներկանյութը թափել, պատրաստուկը լվանալ, չորացնել և մանրադիտակել՝ կիրառելով իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվը: Բակտերիաների վեգետատիվ բջիջները ներկվում են կարմիր կամ վարդագույն, էնդոսպորները՝ կապույտ: Նկարել գրանցամատյանում:

Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:

Նկար 105. Էնդոսպորների ներկման փուլերը ըստ Պեշկովի:
1. Ներկում Լյոֆլերի մեթիլեն կապույտով, 2. Ջերմամշակում 10 վայրկյան, 3. Կրկնակի ներկում չեզոք կարմիրով, 4. Էնդոսպորների և վեգետատիվ բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×):

Մեթիլեն կապույտի փոխարեն կարելի է օգտագործել մալաքիտային կանաչ: Այդ դեպքում նախապես ֆիքսված պատրաստուկի վրա պետք է ավելացնել 7.5% մալաքիտային կանաչի լուծույթ, տաքացնել 7-10 րոպե՝ տեղադրելով պատրաստուկը եռացող ջրով անոթի կամ սպիրտայրոցի բոցի վրա (նկար 106): Այնուհետև պատրաստուկը սառեցնել, լվանալ ջրի բարակ շիթով և 1-2 րոպե լրացուցիչ ներկել սաֆրանինի 0.25% ջրային լուծույթով: Դրանից հետո լվանալ պատրաստուկը, չորացնել և մանրադիտակել՝ կիրառելով իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվը: Բակտերիաների վեգետատիվ բջիջները ներկվում են վարդագույն, իսկ էնդոսպորները՝ կանաչ: Նկարել գրանցամատյանում: Պատրաստուկի մակերեսից ֆիլտրի թղթով հեռացնել յուղը և լվանալ առարկայական ապակին:



Նկար 106. Մալաքիտային կանաչով էնդոսպորների ներկման հաջորդականությունը:
1. Ներկում մալաքիտային կանաչով, 2. Ջերմամշակում ջրային բաղնիքի վրա 10 րոպե, 3. Կրկնակի ներկում սաֆրանինի 0.25% ջրային լուծույթով, 4. Էնդոսպորների և վեգետատիվ բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×):

Առաջադրանք 3

A. chroococcum-ի պատիճի ներկումը Հինսի մեթոդով:

Պատիճի հայտնաբերումը

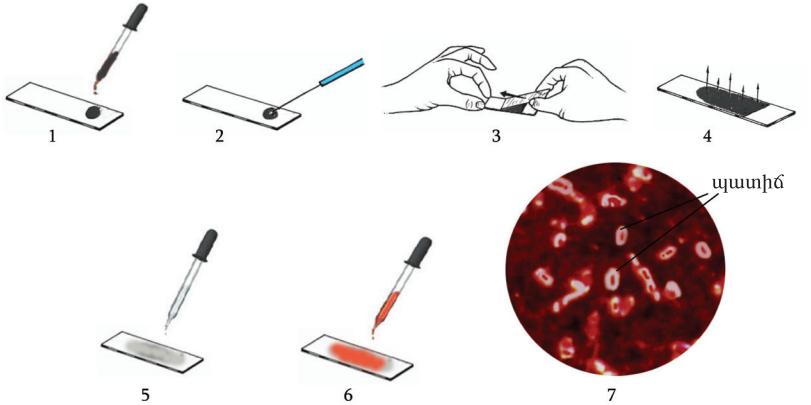
Պատիճը մանրէային բջջի կենսասինթեզի արգասիքն է, որը կուտակվում է բջջի շուրջ, ունի ամորֆ կառուցվածք և պահպանում է կապը բջջապատի հետ: Այն մանրէի համար կենսականորեն կարևոր նշանակություն չունի, բայց օժտում է բջջին որոշակի առանձնահատկություններով: Այսպես, օրինակ՝ պատիճի առկայությունը մի շարք ախտածին բակտերիաներին օժտում է ֆագոցիտոզի նկատմամբ կայունությամբ և դրանով մեծացնում դրանց վիրուլենտությունը: Պատիճի պոլիսախարիդները հանդես են գալիս որպես հակածիններ (K-հակածին): Պատիճը պահպանում է բակտերիաները չորացումից և խոչընդոտում ֆագերի ներթափանցմանը:

Բազմաթիվ մանրէների (օրինակ՝ *S. mutans, S. salivarius, L. mesenteroides*) պատիճը բազմաշաքարային բնույթ ունի: Հաճախ բազմաշաքարային հիմքով պատիճները բացի շաքարներից պարունակում են նաև ամինաթթուներ, 2-կետո-3-դեզօքսիգալակտոնաթթու, ուրոնային թթուներ, պիրոխաղողաթթու, քացախաթթու: *Bacillus* ցեղի որոշ տեսակների պատիճը (օրինակ՝ *B. anthracis, B. subtilis*) ունեն պոլիպեպտիդային (պոլիգլյուտամինաթթվային) բնույթ:

Պատիճը հայտնաբերվում է հատուկ տարբերակիչ ներկման մեթոդներով այնպիսի ներկերի (նիգրոզին, կոնգո-կարմիր կամ չինական տուշ) կիրառմամբ, որոնք չեն ներթափանցում պատիճի մեջ, հետևաբար, պատիճը մուգ ֆոնում երևում է բջիջը շրջապատող բաց գոտու տեսքով:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *A. chroococcum* մանրէի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, սպիրտայրոց կամ գազայրոց, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, սև թանաք, 1:3 նոսրացմամբ Ցիլի կարբոլային ֆուքսին, մայրիի յուղ, բամբակյա անձեռոցիկ, քսիլոլի կամ սպիրտի լուծույթներ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու ծայրին տեղադրել սև թանաքի կաթիլ և մանրէաբանական օղակով այն խառնել *A. chroococcum*-ի երիտասարդ կուլտուրայի հետ: Առարկայական ապակու կամ ծածկապակու օգնությամբ ստացված կախույթը տարածել առարկայական ապակու ամբողջ մակերեսով: Քսուքը չորացնել և ֆիքսել 5-10 րոպե Նիկիֆորովի խառնուրդով կամ 3 րոպե մեթանոլով: Այնուհետև ներկել 1:3 նոսրացմամբ Ցիլի կարբոլային ֆուքսինով 5 րոպե, որից հետո զգուշությամբ լվանալ և չորացնել (նկար 107): Մանրադիտակել և նկարել: Բակտերիաները ներկվում են կարմիր, իսկ չներկված պատիճները ցայտուն երևում են պատրաստուկի մուգ ֆոնում: Նկարել գրանցամատյանում:



Նկար 107. Պատիճի ներկման հաջորդականությունը ըստ Հինսի:

1. Սև թանաքի կաթիլի տեղադրումն առարկայական ապակու ծայրին, 2. Մանրէաբանական օղակով մանրէային կուլտուրայի տեղադրում թանաքում, 3. Կախույթի տարածում, 4. Պատրաստուկի չորացում, 5. Ֆիքսում բացարձակ մեթանոլով, 6. Ներկում 1:3 նոսրացմամբ Ցիլի կարբոլային ֆուքսինով, 7. Պատիճի և վեգետատիվ բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×):

Առաջադրանք 4

B. subtilis-ի մտրակների ներկումը Պեշկովի մշակմամբ Լյոֆլերի մեթոդով:

Մտրակների հայտնաբերումը

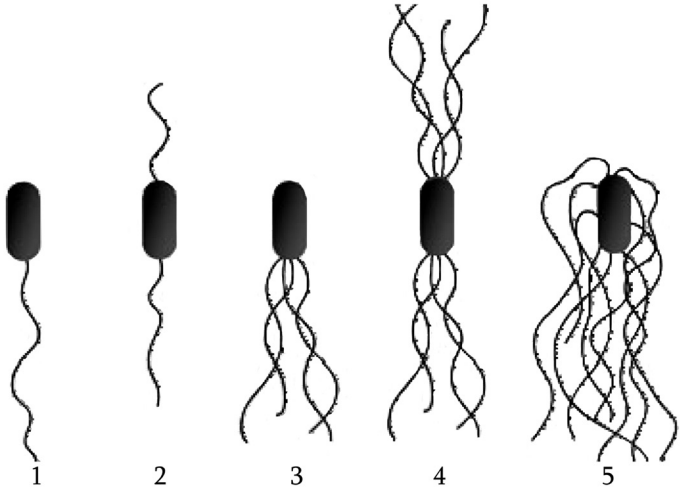
Մանրէների մեծամասնության շարժումը պայմանավորված է մտրակներով: Մտրակների շնորհիվ բակտերիաները զարգացնում են մեծ արագություն, օրինակ՝ *V. cholera*-ն կարող է զարգացնել մինչև 12 մմ/ր արագություն, այսինքն՝ մանրէն 1 րոպեում կարող է անցնել սեփական մարմնի երկարությունը 3000 անգամ գերազանցող տարածություն:

Տարբեր մանրէների մտրակների դասավորությունը բջջի մակերեսին և դրանց քանակությունը տարբեր է և ունի կարգաբանական նշանակություն (նկար 108): Ձողաձև բակտերիաների մտրակները կարող են դասավորվել բևեռային կամ կողքային: Միաբևեռ մտրակավորմամբ որոշ բակտերիաներ (օրինակ՝ *V. cholerae*) ունեն մեկ խոշոր մտրակ (միամտրակ կամ մոնոտրիխային): Միաբևեռ և երկբևեռ մտրակավորմամբ բակտերիաների մտրակային խուրձը կազմված է 2-50 մտրակներից (բազմամտրակ կամ պոլիտրիխային): Մտրակային խրձի միաբևեռ դասավորությունը կոչվում է լոֆոտրիխային (օրինակ՝ *Pseudomonas*), իսկ մտրակների և մտրակային խրձերի երկբևեռ դասավորությունը՝ ամֆիտրիխային (օրինակ՝ *Spirillum*): Որոշ բակտերիաների մտրակային խուրձը դասավորված է կողքային: Եթե մտրակները դասավորված են բակտերիայի ամբողջ մակերեսին (օրինակ՝ *E. coli*, *B. subtilis*), ապա դասավորությունը կոչվում է պերիտրիխային:

Բակտերիական մտրակը կազմված է ֆլագելին սպիտակուցից: Մտրակային սպիտակուցները հանդես են գալիս որպես հակածիններ (H-հակածին): Տարբեր բակտերիաների մտրակի հաստությունը տատանվում է 12-18 նմ սահմաններում, իսկ երկարությունը՝ մինչև 20 մկմ:

Բակտերիական մտրակը չափազանց բարակ է լուսային մանրադիտակով տեսնելու համար: Միայն շատ քիչ մանրէների, ինչպես, օրինակ՝ *Spirillum* ցեղի ներկայացուցիչների մտրակների խրձերը շատ հոծ են և դրանց հնարավոր է մանրադիտակել լուսային դաշտում փուլացայտերանգային համակարգի միջոցով կամ մութ դաշտում: Ուստի մանրէների մտրակները լուսային մանրադիտակով

տեսանելի դարձնելու համար դրանք պետք է ներկել դրա տրամագիծը մեծացնող հատուկ արծնիչ ներկերով: Մտրակների ներկման ընթացքը պահանջում է զգուշություն, քանի որ դրանք հեշտությամբ կոտրվում են, նույնիսկ կախույթի թույլ թափահարման դեպքում:



Նկար 108. Մտրակների դասավորությունը:
1. Մոնոտրիխային, 2 և 4. Ամֆիտրիխային, 3. Լոֆոտրիխային, 5. Պերիտրիխային:

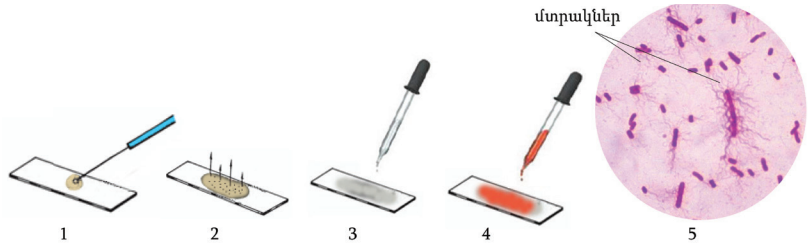
Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. subtilis*-ի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, սպիրտայրոց կամ գազայրոց, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետներ կամ Պաստերյան պիպետ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, արծնիչ նյութ, 1:3 նոսրացմամբ Ցիլի կարբոլային ֆուքսին, մայրիի յուղ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: *B. subtilis*-ի թարմ կուլտուրայի բջիջները մանրէաբանական օղակով զգուշությամբ տեղավորել մանրէազերծ ջրով լցված սրվակի մեջ (ջրի ջերմաստիճանը պետք է համապատասխանի կուլտուրայի աճեցման ջերմաստիճանին): Քսուք պատրաստելուց առաջ հարկավոր է մանրադիտակել կախույթը և համոզվել, որ բջիջները շարժուն են, իսկ կախույթի խտությունը համապատասխանում է տեսադաշտում 5-10 բջիջներին:

Քսուքի պատրաստման ընթացքում բջիջները հեշտությամբ

կորցնում են մտրակները, ուստի անհրաժեշտ է ստուգել առարկայական ապակու մաքրությունը և դրա վրա զգուշությամբ տեղադրել բակտերիական կախույթը:

Քսուքի պատրաստումից անմիջապես առաջ առարկայական ապակին 3-4 անգամ անցկացնել սպիրտայրոցի բոցի վրայով, պաղեցնել և Պաստերյան պիպետի կամ մանրէաբանական օղակի միջոցով ապակու վրա տեղադրել բակտերիական կախույթի 3-4 կաթիլ (նկար 109):



Նկար 109. Մտրակների ըստ Պեշկովի մշակմամբ Լյոֆլերի մեթոդով ներկման հաջորդականությունը:

1. Մանրէաբանական օղակով կենսազանգվածի տեղադրում առարկայական ապակու վրա, 2. Պատրաստուկի չորացում, 3. Արծնիչի ավելացում, 4. Ներկում Ցիլի կարբոլային ֆուքսինով, 5. Մտրակների և վեգետատիվ բջիջների մանրադիտակային պատկերը (1000×):

Կաթիլները պետք է լավ տարածվեն ապակու երկայնքով և արագ չորանան: Չոր քսուքի վրա պետք է ավելացնել արծնիչ նյութ և հետևել որպեսզի այն չչորանա: 15 րոպե հետո պատրաստուկը լվանալ թորած ջրով և ներկել Ցիլի ֆուքսինի նոսրացված լուծույթով՝ ընկղմելով պատրաստուկը ներկանյութի մեջ, և թողնել 5 րոպե: Այնուհետև պատրաստուկը լվանալ ջրով, չորացնել և մանրադիտակել իմերսիոն համակարգով: Ուշադրություն դարձնել մտրակների դասավորությանը, քանակությանը և երկարությանը: Նկարել գրանցամատյանում:

Աշխատանք 6
Բջջային ներառուկների ուսումնասիրության մանրադիտակային մեթոդներ

Բովանդակություն: Մանրէների ցիտոզոլում կուտակվող տարբեր ներառուկներ: Գլիկոգենի, լիպիդների, պոլիֆոսֆատների և հարսպորային մարմնիկների հայտնաբերումը ներկմամբ: Պատրաստուկների մանրադիտակում չոր կամ իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվների կիրառմամբ:

Մանրէային ներառուկներ

Մանրէների ցիտոզոլում հայտնաբերվում են տարբեր ներառուկներ, որոնք կամ օգտագործվում են մանրէի կենսագործունեության ընթացքում, կամ նյութափոխանակության արգասիքներն են: Որոշ ներառուկներ ունեն հարմարողական բնույթ, իսկ մյուսները պաշարանյութեր են, որոնք բջջում կուտակվում են սննդամիջավայրում նյութերի ավելցուկի պայմաններում և օգտագործվում սննդամիջավայրում տվյալ նյութի բացակայության պայմաններում:

Բջջում գործառութային նշանակություն ունեցող ներբջջային ներառուկներից են, օրինակ՝ բակտերիաների քլորոսոմները և ֆիկոբիլիսոմները: Այս կառուցվածքները մեծ դեր ունեն ֆոտոսինթեզի գործընթացում, քանի որ դրանցում կենտրոնացված են բջջային գունանյութերը: Ֆոտոտրոֆ և քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների ցիտոպլազմում պարունակվող կարբոքսիսոմները ևս ունեն գործառութային բնույթ և պարունակում են CO_2-ի ֆիքսումը կատալիզող ռիբուլոզադիֆոսֆատկարբոքսիլազ:

Բջջում հարմարողական դեր ունեցող ներառուկներից են մագնիտասոմները և գազային վակոլները՝ աերոսոմները: Մագնիտասոմները կազմված են մագնետիտից (Fe_3O_4) կամ գրեիգիտից (Fe_3O_4) և պիրիտից (FeS_2), որոնց շնորհիվ բակտերիաները տեղաշարժվում են մագնիսական դաշտի ուղղությամբ: Աերոսոմները անհրաժեշտ են մանրէներին ջրի հատույթում տեղաշարժվելու համար: Մագնիտասոմներ հայտնաբերվել են երկաթով հարուստ և սուլֆիդային միջավայրերում բնակվող մանրէներում, ինչպես, օրինակ՝ *Aquaspirillum magnetotacticum*-ի բջիջներում: Աերոսոմներ հայտնաբերվել են մի շարք ցիանաբակտերիաների, ծիրանագույն և կանաչ ֆոտոտրոֆ բակտերիաների, ինչպես նաև *Halobacterium* և *Thiothrix* ցեղերի ներ-

կայացուցիչների բջիջներում:

Մանրէային պաշարանյութերից են բազմաշաքարները, ճարպերը, պոլիպեպտիդները, պոլիֆոսֆատները, ինչպես նաև ծծմբի կուտակումները թիոնային բակտերիաներում:

Առաջադրանք 1

Գլիկոգենային ներառուկների հայտնաբերումը *S. cerevisiae*-ի բջիջներում:

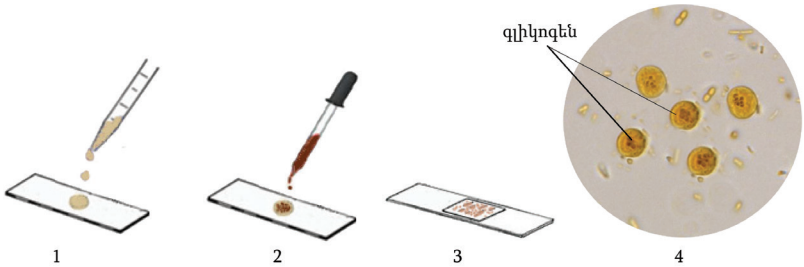
Ածխաջրային բնույթի ներառուկներ

Բազմաշաքարներից մանրէների ցիտոպլազմում հանդիպում են գլիկոգենը, օսլան և օսլայանման միացություն՝ գրանուլոզը: Վերջինիս կուտակումը բնորոշ է անաերոբ մանրէներին, ինչպես, օրինակ՝ *Clostridium* ցեղի ներկայացուցիչներին: Բազմաշաքարների ներառուկները անբարենպաստ պայմաններում ծառայում են որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր:

Բազմաշաքարները հայտնաբերում են հետազոտվող մանրէային կախույթը Լյուգոլի լուծույթով մշակմամբ: Գրանուլոզը և օսլան ներկվում են կապույտ, իսկ գլիկոգենը՝ կարմրադարչնագույն: Գլիկոգենը լավ է հայտնաբերվում թթվային միջավայրում:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *S. cerevisiae*-ի կուլտուրային հեղուկ, լուսային մանրադիտակ, մանրէազերծված պիպետներ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակիներ և ծածկապակիներ, Լյուգոլի լուծույթ, սպիրտայրոց, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Առարկայական ապակու վրա կաթեցնել *S. cerevisiae*-ի բջջային կախույթ, ապա ավելացնել Լյուգոլի լուծույթ, ծածկել ծածկապակիով և մանրադիտակել չոր համակարգի օբյեկտիվով (նկար 110): Գլիկոգենը երևում է դարչնագույն հատիկների տեսքով:



Նկար 110. Գլիկոգենի ներկման հաջորդականությունը:
1. S. cerevisiae-ի բջջային կախույթի տեղադրում առարկայական ապակու վրա, 2. Լյուգոլի լուծույթի ավելացում, 3. Պատրաստի պատրաստուկ, 4. Պատրաստուկի մանրադիտակային պատկերը (400×):

Առաջադրանք 2

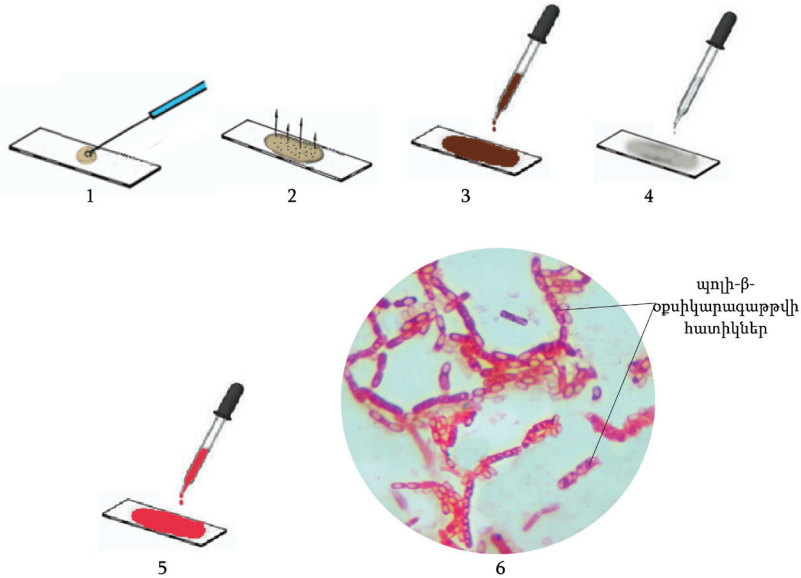
Լիպիդային ներառուկների հայտնաբերումը *B. megaterium*-ի բջիջներում:

Լիպիդային ներառուկներ

Լիպիդները կուտակվում են հատիկների տեսքով և լույսը կտրուկ բեկելու շնորհիվ լավ երևում են լուսային մանրադիտակում: Մանրէների մեծամասնության համար լիպիդային պաշարանյութերն իրենցից ներկայացնում են β-օքսիկարագաթթվի պոլիմեր, որը կարող է կազմել բջջի չոր քաշի 70%-ը: Խմորասնկերի և միցելային սնկերի պաշարային լիպիդները ներկայացված են չեզոք ճարպերով: Լիպիդների կուտակումը բջջում տեղի է ունենում սննդամիջավայրում ածխաջրերի ավելցուկի և ազոտի անբավարարության պայմաններում: Լիպիդային պաշարանյութերն անբարենպաստ պայմաններում օգտագործվում են որպես ածխածնի և էներգիայի աղբյուր: Լիպիդային ներառուկների հայտնաբերման համար բջիջները ներկում են լիպոֆիլ ներկանյութերով՝ սուդան III-ով կամ սուդան սևով:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. megaterium*-ի կուլտուրայի կախույթ, լուսային մանրադիտակ, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակիներ և ծածկապակիներ, մանրէազերծված պիպետներ, սուդան սևի լուծույթ, 0.1% սաֆրանինի ջրային լուծույթ, սպիրտայրոց, ապակյա բաժակ, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, քսիլոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Պատրաստել բջիջների բարակ քսուք, չորացնել և ֆիքսել: Քսուքի մակերեսին լցնել սուդան սևի լուծույթ և թողնել 5-15 րոպե (նկար 111): Ներկանյութի ավելցուկը թափել, պատրաստուկը չորացնել ֆիլտրի թղթով, այնուհետև գունաթափել՝ պատրաստուկը մի քանի անգամ ընկղմելով քսիլոլի մեջ: Գունաթափման տևողությունը չպետք է գերազանցի 1 րոպեն: Այնուհետև բջիջները լրացուցիչ ներկել 0.1% սաֆրանինի ջրային լուծույթով 10 վրկ: Սաֆրանինով ավելի երկարատև մշակումը ցանկալի չէ, քանի որ քողարկվում է հիմնական գունավորումը: Պոլի-β-օքսիկարագաթթվի հատիկները ներկվում են սև, բջջի մնացած մասը՝ վարդագույն:



Նկար 111. Պոլի-β-օքսիկարագաթթվի հատիկների ներկման հաջորդականությունը:
1. B. megaterium-ի քսուքի պատրաստում առարկայական ապակու վրա,
2. Քսուքի չորացում, 3. Քսուքի մշակում սուդան սևով, 4. Քսուքի գունաթափում քսիլոլի լուծույթով, 5. Բջիջների ներկում 0.1% սաֆրանինի ջրային լուծույթով,
6. Վեգետատիվ բջիջներում պոլի-β-օքսիկարագաթթու հատիկների մանրադիտրակային պատկերը (1000×):

Առաջադրանք 3

Պոլիֆոսֆատների հայտնաբերումը *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*-ի բջիջներում:

Պոլիֆոսֆատներ (վոլյուտին և մետաքրոմատին)

Պոլիֆոսֆատային ներառուկները կոչվում են նաև վոլյուտինային կամ մետաքրոմատինային հատիկներ: Վոլյուտինը պրոկարիոտների բջիջներում տեղակայված է ցիտոպլազմում, իսկ էուկարիոտների բջիջներում՝ վակոոլներում: Այն ծառայում է որպես ֆոսֆորի աղբյուր: Պոլիֆոսֆատները պարունակում են մակրոէրգիկ կապեր, որոնց շնորհիվ կարող են էներգիա պահեստավորել: Վոլյուտինային հատիկները որոշ ներկանյութերով (մեթիլենային կապույտ, տոլոիդինային կապույտ) ներկելիս առաջացնում են գույնի փոփոխություն՝ մետաքրոմազիա (այստեղից էլ՝ մետաքրոմատինային հատիկներ անվանումը):

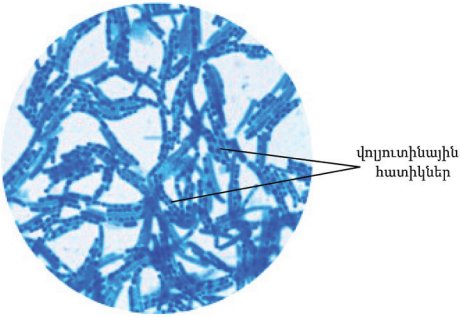
Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, ճարպազրկված առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետներ, Լյոֆլերի մեթիլենային կապույտ, Ցիլի կարբոլային ֆուքսին, 1% ծծմբական թթվի լուծույթ, ապակյա բաժակ, սպիրտայրոց, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի կուլտուրայի ֆիքսված քսուքի վրա կաթեցնել Լյոֆլերի մեթիլենային կապույտ և ներկել 10 րոպե: Ներկանյութը թափել, պատրաստուկը լվանալ, չորացնել և մանրադիտակել իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվ:

Բջիջները ներկվում են կապույտ, իսկ վոլյուտինային հատիկները՝ մանուշակագույն-կարմիր (նկար 112):

Պոլիֆոսֆատները կարելի է հայտնաբերել նաև Օմելյանսկու մեթոդով: Դրա համար *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*-ի կուլտուրայի ֆիքսված քսուքի վրա կաթեցնել Ցիլի կարբոլային ֆուքսին և ներկել 0.5-1 րոպե: Ներկը թափել, պատրաստուկը լվանալ և գունազրկել 1% H_2SO_4-ի լուծույթով 20-30 վրկ: Թթուն թափել, պատրաստուկը լվանալ և լրացուցիչ ներկել մեթիլենային կապույտով (1:40) 20-30 վրկ: Պատրաստուկը լվանալ, չորացնել և մանրադիտակել իմերսիոն հա-

մակարգում: Կապույտ ցիտոպլազմի դաշտում վոլյուտինային հատիկները ներկվում են կարմիր:



Նկար 112. ***L.*** *delbrueckii subsp. bulgaricus*-ի բջիջներում վոլյուտինային հատիկների մանրադիտակային պատկերը (1000×):

Առաջադրանք 4

Հարսպորային ներառուկների հայտնաբերումը *B. thuringiensis*-ի բջիջներում:

Հարսպորային ներառուկներ

B. thuringiensis-ի և ցեղակից մի շարք տեսակների (*B. laterosporus, B. medusa*) էնդոսպորների առաջացումը զուգակցվում է հարսպորային ներառուկների կուտակմամբ: Սովորաբար այդ ներառուկները բաղկացած են մի քանի բազմագործառութային սպիտակուցներից, որոնք ազդում են որոշ անողնաշարավոր կենդանիների վրա՝ քայքայելով դրանց աղիքային էպիթելը: Այդ միջատասպան (էնտոմոախտածին) մանրէների հիմքով ներկայումս ստեղծվել են պատրաստուկներ, որոնք հաջողությամբ կիրառվում են վնասատուների դեմ կենսաբանական պայքարում: Բջջում հարսպորային ներառուկները բրգաձև, շեղանկյունաձև, ռոմբաձև և անկանոն ձևի բյուրեղային կառուցվածքներ են: Դրանց ներկում են սպիտակուցների հետ լավ կապվող ներկանյութերով, օրինակ՝ ամիդաշվարցով կամ բջջի ներկման համար կիրառվող անիլինային սևով:

Հարսպորային ներառուկները կենդանի բջիջները փուլացայտերանգային հարմարանքով լուսային մանրադիտակով մանրադիտակելիս երևում են ուժեղ լուսաբեկող հատիկների տեսքով: Հարսպորային ներառուկները կարելի է տեսանելի դարձնել հատուկ ներկման մեթոդով:

Մանրէային կուլտուրա և փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ պարագաներ: *B. thuringiensis*-ի մաքուր կուլտուրա, լուսային մանրադիտակ, պատրաստուկի չորացման համար նախատեսված սարքավորում, մանրէաբանական օղակ, ունելի, առարկայական ապակի, մանրէազերծված պիպետներ, անիլինային սև, սաֆրանինի լուծույթ կամ Ցիլի ֆուքսին, սպիրտայրոց, ֆիլտրի թուղթ, բենզին, էթանոլ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Պատրաստել *B. thuringiensis*-ի քսուք, չորացնել օդում և ֆիքսել: Հետևելով, որպեսզի ներկանյութը չչորանա՝ ներկել անիլինային սևով և թողնել 1-2 րոպե: Զգուշությամբ լվանալ և ներկել Ցիլի ֆուքսինով կամ սաֆրանինով 15-30 վայրկյան: Պատրաստուկը կրկնակի լվանալ, չորացնել և մանրադիտակել՝ կիրառելով իմերսիոն համակարգի օբյեկտիվը: Հարսպորային ներառուկները ներկվում են սև, իսկ բջիջները՝ վարդագույն:

Թեմա 2
Մանրէների աճեցման և մաքուր կուլտուրայի մեկուսացման մեթոդներ

Աշխատանք 1
Սննդամիջավայրերի պատրաստում և մանրէազերծում

Բովանդակություն: Սննդամիջավայրերի պատրաստում և մանրէազերծում (տե՛ս գլուխ 3): Մանրէազերծման մեթոդները, ավտոկլավացում և չոր մանրէազերծում, ծանոթացում ավտոկլավի և ջեռոցի միջոցով մանրէազերծման աշխատանքի կանոններին և սկզբունքներին (տե՛ս գլուխ 4): Սրվակների և անոթների բամբակյա խցաններ-ի պատրաստում, Պետրրի թասերի, պիպետների, մածկաթիակների մանրէազերծում (տե՛ս գլուխ 4):

Առաջադրանք 1

Սննդամիջավայրերի և անհրաժեշտ պարագաների մանրէազերծում:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Մսապեպտոնային արգանակ կամ ՄՊԱ, թորած ջուր, չափանոթ, չափանշմամբ բաժակներ, սրվակներ (մեծ և փոքր), անոթներ (250 մլ), պիպետներ (1-2 մլ և 10 մլ), մածկաթիակներ, Պետրիի թասեր, խցանների պատրաստման համար բամբակ և թանզիֆ, լաբորատոր կշեռք, սննդամիջավայրի պատրաստման համար նախատեսված մագնիսական խառնիչ, ավտոկլավ, ջեռոց:

Աշխատանքի ընթացքը: Սրվակների և անոթների համար բամբակյա խցանները պատրաստել ինչպես նկարագրված է գլուխ 4-ում (տե՛ս նկար 20): Պետրիի թասերը և մածկաթիակները տեղավորել բյուքսերում և մանրէազերծել ջեռոցում 150°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 3-4 ժամ: Պիպետները խցանել բամբակով, փաթաթել թղթե ժապավեններով (տե՛ս գլուխ 4), խցաններով անոթների և սրվակների հետ միասին մանրէազերծել ավտոկլավացմամբ 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

200 մլ ՄՊԱ-ն պատրատում են հետևյալ եղանակով: Չափանոթի միջոցով համապատասխան քանակությամբ թորած ջուրն ավելացնել ապակյա բաժակի մեջ, տեղավորել մագնիսը և բաժակը տեղադրել մագնիսական խառնիչի վրա (նկար 113):

Ա

Բ

Նկար 113. Մագնիսական խառնիչ (Ա) և լաբորատոր կշեռք (Բ):

Կշռել համապատասխան քանակությամբ սննդամիջավայր և ավելացնել պարբերաբար խառնվող թորած ջրին: Ագար-ագարի լուծման համար միացնել նաև խառնիչի տաքացուցիչը: Ագար-ագարի ամբողջությամբ լուծվելուց հետո սննդամիջավայրից 5-ական մլ ավելացնել 10 սրվակների մեջ (շեղակների ստացման համար), իսկ մնացած 150 մլ-ը լցնել անոթում, կամ 25-ական մլ մեծ սրվակներում: Մսապեպտոնային արգանակը պատրաստել նույնությամբ և 100-ական մլ լցնել անոթների մեջ: 5 սրվակների մեջ 9-ական մլ լցնել ծորակային ջուր և սննդամիջավայրի հետ մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամՃ պայմաններում 20 լոպեի ընթացքում:

Սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը և մանրէազերծման պայմանակարգը գրանցել գրանցամատյանում:

Աշխատանք 2
Էլեկտիվ սննդամիջավայրերի պատրաստում: Մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացում

Բովանդակություն: Սննդամիջավայրերի պատրաստում և մանրէազերծում (շարունակություն): Տարբեր տիպի նյութափոխանակությամբ օժտված մանրէների կուտակիչ կուլտուրաների ստացման էլեկտիվ պայմանները (տե՛ս գլուխ 6): Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող և դիազոտրոֆ մանրէների կուտակիչ կուլտուրաների ստացումը և աճեցման պայմանները:

Առաջադրանք 1
Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացումը:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Հող, մանրէազերծված մսապեպտոնային արգանակ (100 մլ), ծորակային ջուր պարունակող սրվակներ, պիպետներ (1-2 մլ և 10 մլ), ինչպես նաև լաբորատոր կշեռք, ջրային բաղնիք, ջերմաչափ, ջերմապահարան, թափահարիչ:

Աշխատանքի ընթացքը: Լամինար բոքսում, մանրէազերծ պայմաններում կշռել 1 գ հող, լցնել 9 մլ մանրէազերծված ծորակային ջուր պարունակող սրվակի մեջ: Լավ թափահարել և պաստերացնել ջրային բաղնիքում (60-80°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10-15 րոպե): Պաստերացման ընթացքում հողում գտնվող մանրէների վեգետատիվ բջիջները ոչնչանում են, իսկ էնդոսպորները՝ պահպանվում: Այնուհետև 1 մլ պաստերացված հողային կախույթը մանրէազերծված պիպետով ավելացնել 100 մլ մսապեպտոնային արգանակ պարունակող անոթի մեջ և աճեցնել ջերմապահարանում, թափահարիչի վրա, 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1-5 օր:

Սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և կուլտիվացման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:

Առաջադրանք 2

Աերոբ դիազոտորֆ կամ ազոտ ֆիքսող մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացումը:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Մանրէների մեկուսացման համար սուբստրատ (հող), սննդամիջավայրի պատրաստման համար՝ մանիտ, K_2HPO_4, $MgSO_4$, NaCl, K_2SO_4, $CaCO_3$, ագար-ագար, թորած ջուր, չափանոթ, չափանշմամբ բաժակ, անոթ (250 մլ), Պաստերյան պիպետներ, Պետրիի թասեր, լաբորատոր կշեռք, սննդամիջավայրի պատրաստման համար նախատեսված մագնիսական խառնիչ, ավտոկլավ, ջերմապահարան:

Աշխատանքի ընթացքը: Պատրաստել Էշբիի սննդամիջավայրը հետևյալ բաղադրությամբ (գ/լ). մանիտ 20, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4$ 0.2, NaCl 0.2, K_2SO_4 0.1, $CaCO_3$ 5, ագար-ագար 15, թորած ջուր (պատրաստման ընթացքն իրականացնել վերոհիշյալ եղանակով): Սնընդամիջավայրը մանրէազերծել ավտոկլավացմամբ (1 ամճ պայմաններում 20 րոպե): Տաք սննդամիջավայրը լցնել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ և թողնել մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը: Այնուհետև մանրէազերծված ապակյա մազանոթների միջոցով սննդամիջավայրի մակերեսին միմյանցից որոշակի հեռավորությամբ տեղադրել գնդասեղի գլխիկի մեծությամբ 10-15 հողի կնճիկներ: Թասերը փակել և տեղադրել ջերմապահարան (30°C)՝ ինկուբացնելով 3-5 օր:

Սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և կուլտիվացման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:

Աշխատանք 3
Մանրէների մաքուր կուլտուրաների մեկուսացում

Բովանդակություն: Մանրէների մաքուր կուլտուրա, մանրէների կուտակիչ կուլտուրայից մաքուր կուլտուրայի մեկուսացման մեթոդները, միայնակ գաղութների ստացում (տե՛ս գլուխ 6):

Առաջադրանք 1
Աշխատանք 2-ում ստացված կուտակիչ կուլտուրաների մանրադիտակային հետազոտությունը և մաքուր կուլտուրայի ստացումը Ռ. Կոխի և նոսրացող գծերի մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող և դիազոտորֆ մանրէների կուտակիչ կուլտուրաներ, լուսային մանրադիտակ, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ծածկապակիներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծված ՄՊԱ, Էշբիի սննդամիջավայր, պիպետներ (1-2 մլ), մածկաթիակներ, Պետրիի թասեր, ինչպես նաև ջերմապահարան, ապակյա բաժակ, սպիրտ:

Աշխատանքի ընթացքը: Հետազոտել առաջացած մանրէների կուտակիչ կուլտուրաները: Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող մանրէների կուտակիչ կուլտուրայում մանրէների առկայության մասին վկայում է սննդամիջավայրի պղտորությունը, իսկ աերոբ դիազոտրոֆ մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի առաջացման մասին վկայում է սննդամիջավայրի մակերեսին հողային կնճիկների շուրջ առաջացած լորձային, երբեմն մուգ շագանակագույն գունավորում ունեցող գաղութները: Սննդամիջավայրում մանրէների առկայությունը հաստատելու համար կուտակիչ կուլտուրաներից պատրաստել կենդանի պատրաստուկ ճզմված կաթիլի մեթոդով և մանրադիտակել լուսային մանրադիտակի 40 անգամ խոշորացնող օբյեկտիվով: Ստացված արդյունքները աղյուսակ 11-ի ձևով գրանցել գրանցամատյանում:

Աղյուսակ 11.

Կուրակիչ կուլտուրայի ստացման պայմանները և աճի ցուցանիշները

Կուտակիչ կուլտուրա	**Աճեցման պայմանները և սննդամիջավայրը**	**Աճի տեսանելի ցուցանիշները**	**Մանրադիտակում և բջջի ձևաբանական առանձնահատկությունները**
Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող մանրէներ			
Աերոբ, դիազոտրոֆ մանրէներ			

Կուտակիչ կուլտուրաներից մանրէների մեկուսացման համար նախապես մանրէազերծված համապատասխան պինդ սննդամիջավայրերը (ՄՊԱ և Էշբիի սննդամիջավայր) եռացող ջրային բաղնիքում կամ միկրոալիքային վառարանում հալեցնել, պաղեցնել մինչև 50°C, լցնել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ և սննդամիջավայրի վրա կոնդենսացված ջրի կաթիլները չորացնելու նպատակով տեղադրել ջեռոց (50-60°C պայմաններում 10-15 րոպե):

ՄՊԱ-ի մակերեսին պիպետով ավելացնել աերոբ սպորառաջացնող մանրէների կուտակիչ կուլտուրա 1 մլ ծավալով և Դրիգալսկու մանրէազերծ ապակյա մածկաթիակով այն լավ տարածել սննդամիջավայրի ողջ մակերեսով: Այնուհետև այդ նույն մածկաթիակը սահեցնել հաջորդաբար երկրորդ, ապա երրորդ, անհրաժեշտության դեպքում նաև չորրորդ թասում լցված սննդամիջավայրի մակերեսով (տե՛ս նկար 40):

Էշբիի սննդամիջավայրի մակերեսին մանրէաբանական օղակով տարածել աերոբ դիազոտրոֆ մանրէների կուտակիչ կուլտուրայից կենսազանգվածն ինչպես ցույց է տրված նկար 41-ում:

Թասերը տեղավորել ջերմապահարան 30^{0}C ջերմաստիճանային պայմաններում աերոբ սպոր առաջացնող և դիազոտրոֆ մանրէների աճեցման համար: Մանրէներն աճեցնել 1-5 օր: Աճեցման պայմանները և տեսողությունը գրանցել գրանցամատյանում:

Աշխատանք 4
Օդային ավազանի միկրոբիոտայի ուսումնասիրություն

Բաց և փակ տարածքների օդում մանրէների քանակական և որակական կազմը զգալիորեն տարբերվում է: Բնակելի շենքերում օդում մանրէների, այդ թվում՝ ախտածին տեսակների թվաքանակը ավելի մեծ է, քան մթնոլորտային օդում: Օդի մանրէային կազմը ձևավորվում է հողային մանրէներով, որոնք բնորոշվում են արտաքին միջավայրի անբարենպաստ տարբեր գործոնների՝ չորացման, արեգակնային լույսի ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների, ջերմաստիճանային տատանումների նկատմամբ բարձր կայունությամբ: Սովորաբար օդից մեկուսացվում են *Micrococcus* ցեղի ներկայացուցիչները, *B. subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. mesentericus*, *Actinomyces* ցեղի տարբեր տեսակների բակտերիաները, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* և այլ ցեղերի սնկերը:

Փակ տարածքների սանիտարական վիճակը գնահատելիս, կախված հետազոտության նպատակից, որոշում են մանրէների ընդհանուր թիվը, սանիտարացուցանիշային մանրէների՝ ստաֆիլակոկերի, α- և β- արյունալույծ ստրեպտակոկերի առկայությունը, որոնք մարդու քիթըմպանային միկրոբիոտայով աղտոտման ցուցանիշներն են: Բժշկական ստացիոնարների՝վիրահատարանների կամ ծնարանների օդը հետազոտելիս հիմնական ուշադրությունը դարձնում են ներհիվանդանոցային վարակների հարուցիչների՝ ախտածին ստաֆիլակոկերի, կապտաթարախային ցուպիկի և այլ գրամբացասական պայմանական ախտածինների հայտնաբերման վրա:

Օդի միկրոբիոտայի հետազոտման համար կիրառվող մեթոդներից է նստեցումը կամ սեդիմենտացիայի մեթոդը (հայտնի է նաև Կոխի մեթոդ անվամբ): Այն հիմնված է բաց վիճակում Պետրիի թասում լցված սննդամիջավայրի մակերեսին ծանրության ուժի շնորհիվ բակտերիական մասնիկների և կաթիլների նստեցման վրա: Սովորաբար մանրէների թվի հաշվարկը կատարվում է ըստ Օմելյանսկու մեթոդի, համաձայն որի 100 սմ^2 պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին 5 րոպեում նստում են այնքան մանրէներ, որքան մանրէ պարունակվում է 10 լ օդում: Սակայն այս մեթոդը սահմանափակ կիրառություն ունի և ճիշտ է կիրառել միայն փակ տարածքների օդի ուսումնասիրության համար:

Ներկայումս կիրառվում են օդի մանրէաբանական հետազոտությունների մի շարք այլ մեթոդներ, օրինակ՝ ֆիլտրման, օդային հոսքի

կամ գոլորշիով մանրէային աերոզոլների նստեցման մեթոդներ:

Առաջադրանք 1

Փակ տարածքների օդի մանրէաբանական կազմի որոշումը նստեցման (սեդիմենտացիայի) մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Մանրէազերծված Պետրիի թասեր, 40-50 մլ ՄՊԱ, 25 և 37°C ջերմաստիճաններով ջերմապահարաններ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէազերծված Պետրիի թասերում լցնել մանրէազերծված ՄՊԱ, թողնել, որպեսզի սննդամիջավայրը պնդանա, այնուհետև բաց վիճակում տեղավորել հետազոտվող տարածքում 20 րոպե: Եթե անհրաժեշտություն կա որոշելու օդի սանիտարացուցանշային մանրէների կազմը, ապա Պետրիի թասերը տեղավորում են այնպիսի բարձրության վրա, որը համապատասխանում է նստած կամ կանգնած մարդու շնչառության մակարդակին: Այնուհետև Պետրիի թասերը փակել և տեղավորել 25 և 37°C ջերմաստիճաններով ջերմապահարաններում, 1-7 օր: Աճեցումից հետո հաշվել երկու թասերում աճած գաղութների գումարային քանակությունը: Այն դեպքում, երբ գաղութների թիվը պակաս է 250-ից, օդը համարվում է մաքուր, 250-500՝ միջին կարգի աղտոտված, իսկ եթե գաղութների թիվը գերազանցում է 500՝ շատ աղտոտված:

Աշխատանք 5
Ջրային էկոհամակարգերի միկրոբիոտայի ուսումնասիրություն

Ջուրը մանրէների կենսագործունեության համար բնական կենսամիջավայր է: Ջրային էկոհամակարգերում մանրէների քանակական և որակական կազմը կախված է ջրի քիմիական կազմից, ջերմաստիճանից, pH-ից, գազերի քանակությունից, լուսային ճառագայթների ներթափանցումից, սեզոնային փոփոխություններից, ջրային ֆլորայից և ֆաունայից և այլն: Ջրի միկրոբիոտայում տարբերում ենք մանրէների երկու խումբ՝ ավտոխտոն և ալոխտոն: Ավտոխտոն մանրէները ջրի միկրոբիոտայի մշտական բնակիչներն են, իսկ ալոխտոն մանրէները՝ միկրոբիոտայի պատահական կամ ժամանակավոր ներկայացուցիչներն են, որոնք ներթափանցում են, օրինակ՝ հոսքաջրերի հետ: Ալոխտոն մանրէների մեծամասնության զարգացման համար ջուրը նպաստավոր կենսամիջավայր չէ, այդ պատճառով ջուր ներթափանցելուց կարճ ժամանակ հետո դրանք ոչնչանում են:

Քաղցրահամ ջրավազանների՝ գետերի և լճերի միկրոբիոտան հիմնականում ձևավորվում է շրջապատող հողային միկրոբիոտայից, ինչպես հոսքաջրերով ներթափանցող մանրէներով: Ջրի միկրոբիոտան հիմնականում ներկայացնում են *Micrococcus*, *Pseudomonas, Proteus, Spirillum, Azotobacter, Nitrobacter, Bacillus* և այլ ցեղերի ներկայացուցիչները, ինչպես նաև մի շարք ջրիմուռները (դիատոմային և կանաչ) և նախակենդանիները:

Ծովերի և օվկիանոսների միկրոբիոտան համեմատաբար աղքատ է և ներկայացված է հիմնականում հալոֆիլ մանրէներով: Ծովերում և օվկիանոսներում մանրէների տեղաբաշխվածությունը տարբեր խորություններում տարբեր է:

Ուրույն մանրէաբանական կազմ ունեն նաև երկրաջերմային աղբյուրները և ստորերկրյա ջրային ավազանները:

Ջրի մանրէաբանական կազմը ուսումնասիրվում է որոշակի ծավալով ջրի ֆիլտիրմամբ ստացված մանրէային զանգվածի կամ ջրի նմուշի տարբեր սննդամիջավայրերում ցանքի մեթոդով:

Առաջադրանք 1

Գետի ջրի մանրէաբանական կազմի որոշումը Կոխի մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Գետի ջուր, մանրէազերծված 9-ական մլ ծորակային ջուր պարունակող սրվակներ, պիպետներ (1-2 մլ և 10 մլ), Պետրիի թասեր, 40-50 մլ ՄՊԱ, ինչպես նաև լաբորատոր կշեռք, 25 և 37^{0}C ջերմաստիճաններով ջերմապահարաններ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէազերծված ՄՊԱ լցնել Պետրիի թասերի մեջ, թողնել սենյակային ջերմաստիճանում մինչև պնդանալը, այնուհետև չորացնել մակերեսը: Լամինար բոքսում, մանրէազերծ պայմաններում 1 մլ գետի ջուրը նոսրացնել մինչև 10^6 անգամ: Լավ թափահարել և յուրաքանչյուր նոսրացումից ստացված կախույթից 1 մլ մանրէազերծված պիպետի միջոցով ավելացնել Պետրիի թասերում ՄՊԱ-ի մակերեսին, տարածել մածկաթիակով և թասերը կափարիչով դեպի վեր տեղավորել 25 և 37^{0}C ջերմաստիճաններով ջերմապահարաններ 1-5 օր: Նախապես Պետրիի թասերի վրա նշել հետազոտվող նմուշի անվանումը, նոսրացման չափը, աճեցման պայմանները և ամսաթիվը:

Օգտագործված սննդամիջավայրի բաղադրությունը, նոսրացումների հաջորդականությունը, ցանքի եղանակը և կուլտիվացման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում: Աճեցումից հետո հաշվել թասերում աճած գաղութների գումարային քանակությունը:

Աշխատանք 6
Մանրէների կուլտուրային և ձևաբանական հատկանիշների բնութագրում

Բովանդակություն: Բնական աղբյուրներից մեկուսացված մանրէների որոշ կուլտուրային և ձևաբանական հատկանիշների բնութագրումը (տե՛ս գլուխ 7): Մանրէների կարգաբանական խմբի որոշման սկզբունքները:

Առաջադրանք 1
Գաղութների նկարագրություն և մանրադիտակային հետազոտում:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Լուսային մանրադիտակ, մանրէաբանական օղակ, ունելի, սպիրտայրոց, ճարպազերծված առարկայական ապակիներ, ծածկապակիներ, մանրէազերծված ծորակային ջուր, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծված ՄՊԱ-ով շեղակներ, ջերմապահարան:

Աշխատանքի ընթացքը: Սննդամիջավայրի մակերեսին աճած գաղութներից ընտրել 1-2-ը և նկարագրել հաշվի առնելով ձևը (տե՛ս նկար 52), չափսը կամ տրամագիծը, մակերեսը, պրոֆիլը (տե՛ս նկար 53), փայլը և թափանցիկությունը, գույնը, եզրը (տե՛ս նկար 54), կառուցվածքը (տե՛ս նկար 55), կազմությունը կամ կոնսիստենցիան: Գաղութից մանրէաբանական օղակի միջոցով վերցնել կենսազանգված և ցանել ագարացված սննդամիջավայրի մակերեսին այնպես, ինչպես ցույց է տրված նկար 6-ում: Նույն մանրէաբանական օղակի միջոցով պատրաստել կենդանի պատրաստուկ ճզմված կաթիլի մեթոդով և մանրադիտակել լուսային մանրադիտակով: Ուշադրություն դարձնել մանրէների շարժունակությանը, բջիջների ձևին և դասավորվածությանը: Ցանքերը տեղադրել ջերմապահարան 25 և 37°C պայմաններում: Արդյունքները (աղյուսակ 12) գրանցել գրանցամատյանում:

Աղյուսակ 12.

Հետազոտվող բակտերիաների կուլտուրային և չնաբանական առանձնահատկությունները

Կուլտուրա, №	Գաղութներ								Մանրադիտակում
	ձև	չափս	գույն	եզր	փայլ	մակերես	պրոֆիլ	կառուց-վածք	Բջջի շարժունակու-թյուն և ձև
1.									
2.									
3.									

Թեմա 3
Մանրէների քանակական հաշվարկման մեթոդներ

Որոշ հետազոտություններում անհրաժեշտ է որոշել մանրէների թվաքանակը: Մանրէների թվաքանակի արագ որոշման մեթոդներից է պղտորաչափական եղանակը: Սակայն պղտորաչափական եղանակով ստացված տվյալները անհրաժեշտ է նախապես համապատասխանեցնել այլ մեթոդների կիրառմամբ ստացված տվյալների հետ: Դրանցից են Կոխի մեթոդն ու Գորյաևի-Տոմի խցիկում մանրէների թվաքանակի որոշման մեթոդները:

Աշխատանք 1
Մանրէների թվաքանակի որոշում Կոխի մեթոդով

Առաջադրանք 1

S. cerevisiae-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը Կոխի մեթոդով (տե՛ս գլուխ 6):

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *S. cerevisiae*-ի մեկօրյա կուլտուրա, մանրէազերծված 3 Պետրիի թաս, 9-ական մլ մանրէազերծված ծորակային ջուր պարունակող 6 սրվակ, 75 մլ ածիկային քաղցու (տե՛ս հավելված 1), ագար-ագար, ջերմապահարան, 0.1 և 1 մլ պիպետներ, մածկաթիակ, սպիրտայրոց:

Աշխատանքի ընթացքը: Պատրաստել 75 մլ ածիկային քաղցու 1.5% ագար-ագարի պարունակությամբ և մանրէազերծումից հետո լցնել 3 Պետրիի թասերի մեջ: Պնդանալուց հետո սննդամիջավայրի մակերեսը չորացնել ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների տակ 15 րոպե: Նախապես աճեցված մանրէի 1մլ կուլտուրան նոսրացնել 9 մլ մանրէազերծված ֆիզիոլոգիական լուծույթում (կամ ծորակային ջրում): Կատարել հաջորդական նոսրացումներ, ինչպես ցույց է տրված նկար 46-ում, մինչև սկզբնական լուծույթը նոսրանա 10^6 անգամ: Յուրաքանչյուր նոսրացումից հետո սրվակի պարունակությունը լավ խառնել: Յուրաքանչյուր հաջորդ նոսրացումն իրականացնել մանրէազերծված նոր պիպետի օգնությամբ: Վերջին նոսրացումներից 0.1-ական մլ մանրէազերծված պիպետով տեղափոխել Պետրիի թասերում գտնվող սննդամիջավայրի մակերեսին: Տարածել մանրէազերծված մածկաթիակով: Կարելի է օգտագործել մեկ մանրէազերծված մածկաթիակ, եթե տարածումը սկսում են առավել նոս-

ռացված նմուշից: Պետրիի թասերը տեղավորել ջերմապահարանում համապատասխան ջերմաստիճանային պայմանում, 3-5 օր: Պետրիի թասերը անհրաժեշտ է ջերմապահարանում տեղավորել հատակով դեպի վեր խուսափելու համար սննդամիջավայրի մակերեսին կոնդենսատի տարածումից:

Հաջորդ դասին հաշվարկել աճած գաղութ առաջացնող միավորների (ԳԱՄ) թիվը և բանաձևով վերահաշվարկել 1մլ կախույթում եղած կենդանի բջիջների թվաքանակը (տե՛ս գլուխ 6):

Աշխատանք 2
Մանրէների թվաքանակի որոշում պղտորաչափական մեթոդով

Առաջադրանք 1

S. cerevisiae-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը սպեկտրալուսաչափական եղանակով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *S. cerevisiae*-ի մեկօրյա կուլտուրա, 9-ական մլ մանրէազերծված ծորակային ջուր պարունակող 6 սրվակներ, 75 մլ ածիկային քաղցու, ջերմապահարան, 0.1 և 1 մլ պիպետներ, սպիրտայրոց, սպեկտրալուսաչափ, կյուվետներ, բամբակյա անձեռոցիկ, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Նախորդ փորձում պատրաստված նոսրացումներից 0.1-ական մլ ավելացնել սրվակներում գտնվող 5 մլ ածիկային քաղցուին և տեղավորել ջերմապահարանում 30°C ջերմաստիճանային պայմանում 3-5 օր: Յուրաքանչյուր սրվակից 1 մլ կախույթ տեղափոխել 0.5 սմ^3 կյուվետների մեջ և չափել օպտիկական խտությունը (λ=595 նմ):

Ճշգրիտ տվյալների դեպքում օպտիկական խտությունը տատանվում է 0.1-0.6 սահմաններում: Այն դեպքում, երբ մանրէների խտությունը գերազանցում է 0.6-ը, կարող է տեղի ունենալ լույսի կրկնակի ցրում, որը կարող է տվյալների արհեստական նվազեցման պատճառ դառնալ: Այդ պատճառով բարձր խտությունների կախույթները նոսրացնում են մանրէազերծված ջրով 2, 4, 6, 8 կամ 10 անգամ:

Ստացված տվյալները համեմատել Կոխի մեթոդով ստացված տվյալների հետ:

Աշխատանք 3
Մանրէների թվաքանակի որոշում Գոր յանի-Տոմի խցիկի կիրառմամբ

Առաջադրանք 1

S. cerevisia-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը Գոր յանի-Տոմի խցիկի կիրառմամբ:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Աշխատանք 2-ում ստացված *S. cerevisiae*-ի կուլտուրայի նոսրացումներ, 0.1 մլ պիպետներ, Գոր յանի-Տոմի խցիկներ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Աշխատանքում օգտագործել նախորդ փորձում *S. cerevisiae*-ի կախույթից պատրաստված նոսրացումները: Յուրաքանչյուր սրվակից 0.1-ական մլ կախույթ տեղափոխել Գոր յանի-Տոմի խցիկի մեջ և հաշվել բջիջները: Բջիջները հաշվում են ցանցի մեծ վանդակներում՝ օգտագործելով 40× խոշորացնող օբյեկտիվը: 1 մլ համապատասխան կախույթում բջիջների թվաքանակը հաշվարկել բանաձևով (տե՛ս գլուխ 6):

Ստացված տվյալները գրանցել ստորև բերված աղյուսակում: Օգտագործելով աղյուսակ 13-ում բերված տվյալները՝ կառուցել համադրելի կոր: Աբսցիսի վրա նշել բջիջների թվաքանակը, օրդինատի վրա՝ համապատասխան կախույթի օպտիկական խտությունը: Համադրելի կորը կառուցում են բջիջների թվաքանակի արագ որոշման համար՝ հիմնվելով միայն սպեկտրալուսաչափական տվյալների վրա:

Աղյուսակ 13.

Գոր յանի-Տոմի խցիկի, պղտորաչափական և Կոխի եղանակներով որոշված շաքարասնկերի բջիջների թվաքանակը

Ցուցանիշ	Կախույթի համարը							
	1	2	3	4	5	6	7	և այլն
Բջիջների թվաքանակը, մլն/մլ (M)								
Օպտիկական խտությունը								
ԳԱՄ, մլն/մլ								

Թեմա 4
Մանրէների կենսաքիմիական հատկությունների ուսումնասիրության մեթոդներ

Աշխատանք 1
Մանրէների հիդրոլազային ֆերմենտների ուսումնասիրությունը

Բովանդակություն: Մանրէների հիդրոլազային ֆերմենտների ընտրության համար համապատասխան սուբստրատ պարունակող սննդամիջավայրերի պատրաստում: Հետազոտվող մանրէների գծային ցանք սննդամիջավայրի մակերեսին, աճեցում և հիդրոլիտիկ ակտիվության որոշում (տե՛ս գլուխ 7):

Մանրէային ֆերմենտներ

Մանրէային ֆերմենտները ըստ թաղանթային կառույցների հետ կապվածության լինում են արտաբջջային և ներբջջային: Մանրէների ֆերմենտային համակարգի ամբողջական նկարագրման համար ուսումնասիրվում է և՛ կենսազանգվածում, և՛ կուլտուրային հեղուկում ֆերմենտների ակտիվությունը: Սակայն անհրաժեշտ է հաշվի առնել, որ սննդամիջավայրում կարող են պարունակվել ինչպես արտաբջջային, այնպես էլ ներբջջային ֆերմենտներ, որոնք արտազատվում են մահացած բջիջների լիզիսի հետևանքով:

Ֆերմենտների բարձրակտիվ պատրաստուկների ստացման համար անհրաժեշտ է իմանալ մանրէների աճեցման այն պայմանները, որոնք նպաստավոր են տվյալ ֆերմենտի կենսասինթեզի և ակտիվության համար: Եթե ուսումնասիրման օբյեկտի ֆիզիոլոգիան հետազոտված չէ, ցանկալի է կուլտուրայի ֆերմենտային ակտիվությունը ուսումնասիրել աճի էքսպոնենցիալ փուլում:

Մանրէային ծագման հիդրոլազային ֆերմենտները (ամիլազ, լիպազ, պրոտեազ) լայն կիրառություն են գտել արտադրության տարբեր ոլորտներում: Մանրէաբանական հետազոտություններում հաճախ հիդրոլազային ֆերմենտների ակտիվ արտադրիչ մանրէների որոնման և ընտրության խնդիրներ են դրվում:

Առաջադրանք 1

Լիպազային ակտիվության որոշումը:

Մանրէային լիպազներ

Լիպազը դասվում է այն էսթերազների խմբին, որոնք կատալիզում են գլիցերինի բարդ եթերների հիդրոլիզը, որի հետևանքով առաջանում են գլիցերին ու ճարպաթթուներ: Մանրէները սինթեզում են ինչպես ներ-, այդպես էլ արտաբջջային լիպազներ:

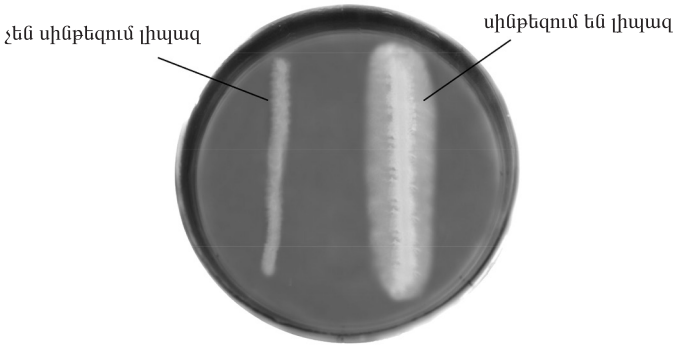
Ճարպեր քայքայելու ունակությամբ օժտված են մի շարք մանրէներ՝ բակտերիաներ, բորբոսասնկեր (*Aspergillus, Rhizopus, Endomyces*) և շաքարասնկեր (*Candida*):

Մանրէների լիպազային ակտիվությունը դիտվում է միջավայրի pH-ի լայն տիրույթում:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Հետազոտվող մանրէային մաքուր կուլտուրա, պեպտոն, NaCl, $CaCl_2 \cdot H_2O$, տվին, ագար-ագար, թորած ջուր, չափանոթ, չափանշմամբ բաժակներ, լաբորատոր կշեռք, մագնիսական խառնիչ, Պետրիի թասեր, մանրէաբանական օղակ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ավտոկլավ, ջերմապահարան, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Լիպոլազային ակտիվության դրսևորման համար պատրաստել համապատասխան սննդամիջավայրը հետևյալ բաղադրությամբ (գ/լ). պեպտոն 10, NaCl 5, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.1, տվին 10, ագար-ագար 20, pH 7.4: Սննդամիջավայրը պատրաստել առանց տվինի և մանրէազերծել ավտոկլավացմամբ (1 ամճ պայմաններում 20 րոպե): Տվինի ջրային լուծույթը համապատասխան խտությամբ մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում, որից հետո մանրէազերծ պայմաններում ավելացնել մանրէազերծված սննդամիջավայրին: Տաք սննդամիջավայրը լցնել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ, թողնել մինչև պնդանալը և չորացնել մակերեսը: Ուսումնասիրվող մանրէային կուլտուրաները բծերով ցանել սննդամիջավայրի մակերեսին: Աճեցնել մանրէների աճի համար օպտիմալ ջերմաստիճանային պայմաններում 1-7 օր: Լիպազային ակտիվության մասին կարելի է դատել գաղութի կամ մանրէի ցանքի հետագծով աճած զանգվածի շուրջը տվինի քայքայումից առաջացած ճարպաթթուների կալցիումական աղերի ոչ թափանցիկ գոտիների մեծությամբ (նկար 114): Քանոնով չափել

յուրաքանչյուր կուլտուրայի շուրջ առաջացած ոչ թափանցիկ գոտու մեծությունը: Ստացված արդյունքները, սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և աճեցման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:



Նկար 114. Մանրէների լիպազային ակտիվության հայտնաբերումը:

Առաջադրանք 2

Ամիլազային ակտիվության որոշումը:

Մանրէային ամիլազներ

Ամիլազները օսլան ու գլիկոգենը ճեղքող ֆերմենտներ են, որոնց կարելի է դասակարգել երկու՝ էնդո- և էկզոամիլազներ խմբի: Էնդոամիլազներից α-ամիլազը (1,4-α-D-գլյուկանգլյուկանահիդրոլազ կամ գլիկոգենազ) ճեղքում է օսլան՝ հիդրոլիզելով ամիլոզում և ամիլոպեկտինում առկա 1,4-α-կապերը: Օսլայի հիդրոլիզը ուղեկցվում է ցածրամոլեկուլային օլիգոշաքարների, α-դեքստրինների, մալտոզի և գլյուկոզի առաջացմամբ: Էկզոամիլազներից β-ամիլազը (1,4-α-D-գլյուկանմալտահիդրոլազ) օսլայի հիդրոլիզն իրականացնում է շղթայի ծայրից՝ ճեղքելով յուրաքանչյուր երկրորդ 1,4-α-կապերը, որի արդյունքում առաջանում են մալտոզ և β-դեքստրիններ:

α-ամիլազը, ի տարբերություն β-ամիլազի, ջերմակայուն ֆերմենտ է և իր ակտիվությունը երկար ժամանակ պահպանում է 70°C ջերմաստիճանում, բայց զգայուն է թթվային pH-ի նկատմամբ և pH 3.3 արժեքում արագ կորցնում է ակտիվությունը:

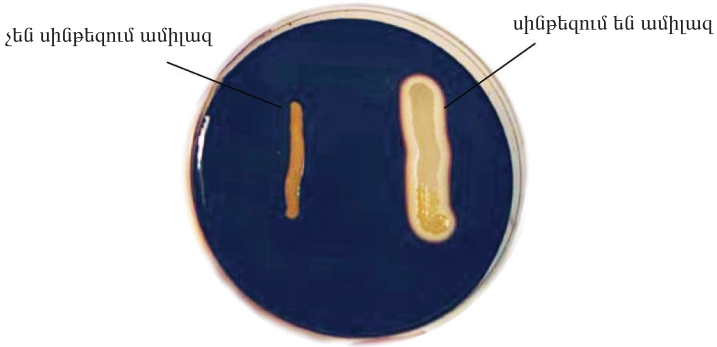
Ամիլազների ակտիվ արտադրիչներ են բորբոսասնկերը (*Aspergillus*) և բակտերիաները (*Bacillus*):

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Հետազոտվող մանրէային մաքուր կուլտուրա, օսլա, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCO_3$, ագար-ագար, թորած ջուր, չափանոթ, չափանշմամբ բաժակներ, լաբորատոր կշեռք, մագնիսական խառնիչ, Պետրիի թասեր, մանրէաբանական օղակ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ավտոկլավ, ջերմապահարան, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Պատրաստել ամիլազային ակտիվության որոշման համար համապատասխան սննդամիջավայր հետևյալ բաղադրությամբ (գ/լ). օսլա 10, $(NH_4)_2SO_4$ 2, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, NaCl 1, $CaCO_3$ 3, ագար-ագար 20, pH 7.4: Սննդամիջավայրը մանրէազերծել ավտոկլավացմամբ (1 ամճ պայմաններում 20 րոպե): Տաք սննդամիջավայրը լցնել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ, թողնել մինչև պնդանալը և չորացնել մակերեսը: Ուսումնասիրվող մանրէային կուլտուրաները բծերով ցանել սննդամիջավայրի մակերեսին: Աճեցնել մանրէների աճի համար օպտիմալ

ջերմաստիճանային պայմաններում 1-7 օր:

Օսլայի հիդրոլիզը հայտնաբերելու համար աճած կուլտուրայով սննդամիջավայրի մակերեսը մշակել 3-5 մլ Լյուգոլի լուծույթով: Ամիլազային ակտիվության մասին վկայում է մանրէի աճի շուրջ թափանցիկ գոտիների առաջացումը, մինչդեռ Պետրիի թասի մակերեսը ամբողջությամբ ներկվում է կապույտ գույնի (նկար 115): Քանոնով չափել յուրաքանչյուր կուլտուրայի շուրջ առաջացած թափանցիկ գոտու մեծությունը: Ստացված արդյունքները, սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և աճեցման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:



Նկար 115. Մանրէների ամիլազային ակտիվության հայտնաբերումը:

Առաջադրանք 3

Կազեինալիտիկ և ժելատինազային ակտիվության որոշումը:

Մանրէային պրոտեազներ

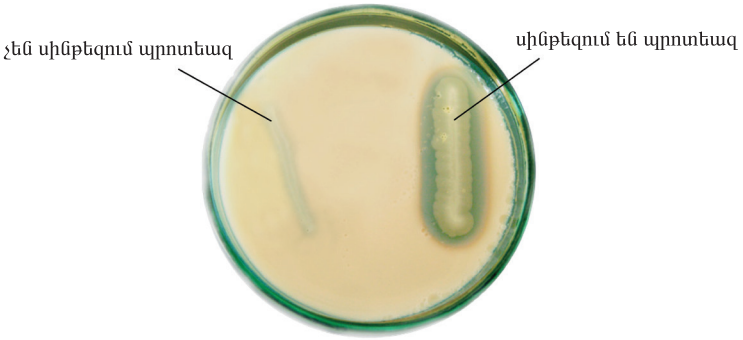
Պրոտեազները, ճեղքելով պեպտիդային կապերը, հիդրոլիզում են սպիտակուցները և պոլիպեպտիդները: Կախված հիդրոլիզվող սուբստրատի կառուցվածքից տարբերում են պրոտեինազներ, պոլիպեպտիդազներ և երկպեպտիդազներ: Պրոտեինազները հիդրոլիզում են չբնափոխված սպիտակուցները՝ առաջացնելով պեպտիդներ: Պոլիպեպտիդազները և երկպեպտիդազները հիդրոլիզում են, համապատասխանաբար, պոլիպեպտիդները և դիպեպտիդները՝ առաջացնելով ամինաթթուներ:

Պրոտեազներ սինթեզում են մի շարք մանրէներ՝ բացիլները, ակտինոմիցետները, միցելային սնկերը և այլն: Պրոտեազների ակտիվության ուսումնասիրման համար որպես սուբստրատ օգտագործում են ժելատինը կամ կազեինը:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Հետազոտվող մանրէային մաքուր կուլտուրա, մսապեպտոնային արգանակ, ժելատին, ճարպազրկված կաթի փոշի, ագար-ագար, թորած ջուր, չափանոթ, չափանշմամբ բաժակներ, լաբորատոր կշեռք, մագնիսական խառնիչ, Պետրիի թասեր, մանրէաբանական օղակ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ավտոկլավ, ջերմապահարան, մանրէազերծող լուծույթ:

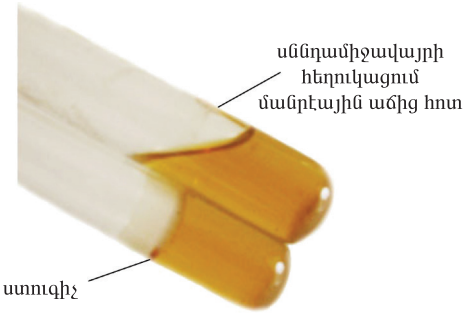
Աշխատանքի ընթացքը: Կազեինալիտիկ ակտիվության դրսևորման համար պատրաստել համապատասխան սննդամիջավայր հետևյալ բաղադրությամբ (գ/լ). ճարպազրկված կաթի փոշի 100, ագար-ագար 20, pH 7.4: Կաթը և ագար-ագարը պատրաստել առանձին և մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Կաթի խտությունը խիտ լուծույթում չպետք է գերազանցի 15%-ը: Մանրէազերծված սննդամիջավայրերը մանրէազերծ պայմաններում խառնել, լցնել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ, թողնել մինչև պնդանալը և չորացնել մակերեսը: Ուսումնասիրվող մանրէային կուլտուրաները գծային ցանքի մեթոդով ցանել սննդամիջավայրի մակերեսին: Աճեցնել մանրէների աճի համար օպտիմալ ջերմաստիճանային պայմաններում 1-7 օր: Կազեինալիտիկ ակտիվության մասին կարելի է դատել մանրէի աճի շուրջ առաջա-

ցած թափանցիկ գոտիներով (նկար 116): Քանոնով չափել յուրաքանչյուր կուլտուրայի շուրջ առաջացած թափանցիկ գոտու մեծությունը: Ստացված արդյունքները, սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և աճեցման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:



Նկար 116. Մանրէների կազեինալիտիկ ակտիվության հայտնաբերումը:

Ժելատինազային ակտիվության դրսևորման համար պատրաստել համապատասխան սննդամիջավայր հետևյալ բաղադրությամբ. մսապեպտոնային արգանակ 100 մլ, ժելատին 10-15 գ, pH 7.4: Սննդամիջավայրը 5 մլ-ական լցնել սրվակների մեջ և մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Ուսումնասիրվող մանրէային կուլտուրաները ցանել մանրէաբանական ասեղով ներարկման մեթոդով: Աճեցնել մանրէների աճի համար օպտիմալ ջերմաստիճանային պայմաններում 1-7 օր: Ժելատինազային ակտիվության մասին վկայում է սննդամիջավայրի հեղուկացումը ստուգիչի համեմատ (նկար 117): Ստացված արդյունքները, սննդամիջավայրի բաղադրությունը, պատրաստման եղանակը, մանրէազերծման պայմանակարգը և աճեցման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:



Նկար 117. Մանրէների ժելատինազային ակտիվության դրսևորումը:

Թեմա 5
Մանրէների փոխհարաբերության ձևերի և հակաբիոտիկների նկատմամբ զգայունության ուսումնասիրության մեթոդներ

Աշխատանք 1
Մանրէների փոխհարաբերության ձևերի ուսումնասիրությունը

Բովանդակություն: Տարբեր մանրէների միջև փոխհարաբերության ուսումնասիրությունը փոխուղղահայաց գծային ցանքի մեթոդով (տե՛ս գլուխ 7):

Մանրէների միջև փոխհարաբերության ձևերը

Բնական համակեցություններում տարբեր մանրէների միջև փոխհարաբերության ձևերը տարբեր են: Համակեցությունում երկու և ավելի մանրէների սերտ և երկարաժամկետ զարգացումը անվանվում է սիմբիոզ: Այն փոխհարաբերության ձևը, երբ սիմբիոզում մանրէներից մեկը ստեղծում է նպաստավոր պայմաններ երկուսի զարգացման համար էլ, անվանվում է մուտուալիզմ: Այն դեպքում, երբ սիմբիոզում մի մանրէն օգտագործում է մյուսին իր զարգացման համար, անվանվում է մակաբուծություն (պարազիտիզմ): Շատ դեպքերում սիմբիոզում մանրէները միմյանց նկատմամբ ոչ մի փոխներգործություն չունեն (նեյտրալիզմ):

Առավել մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում մանրէների հակագոնիստական փոխհարաբերությունները: Հակագոնիզմը մի մանրէի կենսագործունեության ճնշումն է մյուսով, կամ այդ մանրէի ամբողջական ոչնչացումը շրջակա միջավայրում նյութափոխանակության արգասիքների կուտակմամբ: Հակագոնիզմը պայմանավորված է օրգանական թթուների, սպիրտների կամ հակաբիոտիկ ազդեցությամբ օժտված այլ միացությունների արտադրությամբ և արտազատմամբ:

Առաջադրանք 1

Մանրէների միջև հակագոնիզմի ուսումնասիրությունը փոխուղղահայաց գծային ցանքի մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *S. roseus*-ի, *S. aureus*-ի, *B. subtilis*-ի, *M. luteus*-ի, *E. coli*-ի և *S. cerevisiae*-ի մաքուր կուլտուրաներ, մանրէազերծված ՄՊԱ, Պետրիի թասեր, մանրէաբանական օղակ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ջերմապահարան, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Մանրէազերծված Պետրիի թասերում լցնել մանրէազերծված ՄՊԱ, թողնել, որպեսզի սննդամիջավայրը պնդանա: Որպես թեստ օրգանիզմ ընտրել *S. roseus*-ին: Մանրէների ցանքն իրականացնել այնպես, ինչպես ցույց է տրված նկար 68-ում: Աճեցնել ջերմապահարանում 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1-3 օր: Հակագոնիստական հարաբերության մասին վկայում են մանրէների աճի բացակայության գոտիները: Ընդ որում, կարող է բացակայել ինչպես թեստ օրգանիզմի աճը, այնպես էլ ուսումնասիրվող մանրէների աճը: Ստացված արդյունքները, սննդամիջավայրի բաղադրությունը, ցանքի եղանակը և աճեցման պայմանները գրանցել գրանցամատյանում:

Աշխատանք 2
Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների զգայունության որոշումը

Բովանդակություն: Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների զգայունության ուսումնասիրությունը թղթային սկավառակների մեթոդով (տե՛ս գլուխ 7):

Առաջադրանք 1
Մանրէների զգայունության որոշումը տարբեր հակաբիոտիկների նկատմամբ:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *S. aureus*-ի, *B. subtilis*-ի, *E. coli*-ի և *S. cerevisiae*-ի մաքուր կուլտուրաներ, մանրէազերծված 25-ական մլ ՄՊԱ պարունակող սրվակներ, Պետրիի թասեր, պենիցիլին, ամպիցիլին, ստրեպտոմիցին, ռիֆամպիցին և կանամիցին հակաբիոտիկներով ներծծված թղթե սկավառակներ, ունելի, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, մանրէազերծող լուծույթ:

Աշխատանքի ընթացքը: Սրվակներում ՄՊԱ-ն հալեցնել ջրային բաղնիքում կամ միկրոալիքային վառարանում: Մանրէների ցանքը և հակաբիոտիկային սկավառակների տեղադրումը յուրաքանչյուր մանրէ պարունակող սննդամիջավայրի մակերեսին կատարել այնպես, ինչպես ցույց է տրված նկար 70-ում: Աճեցնել ջերմապահարանում 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1 օր: Եթե հետազոտվող մանրէները զգայուն են տվյալ հակաբիոտիկների նկատմամբ, ապա սկավառակների շուրջ առաջանում են այդ մանրէների աճի բացակայության գոտիներ: Գոտու տրամագիծը չափել քանոնով և աղյուսակ 14-ի ձևով գրանցել գրանցամատյանում: Ուշադրություն դարձնել գրամդրական, գրամբացասական և էուկարիոտ մանրէների վրա միևնույն հակաբիոտիկի ազդեցության չափին: Գրանցամատյանում նշել նաև օգտագործված սննդամիջավայրի բաղադրությունը, ցանքի եղանակը և աճեցման պայմանները:

Աղյուսակ 14.

Հակաբիոտիկների ազդեցությունը մանրէների աճի վրա:

Հակաբիոտիկ	**Աճի բացակայության գոտու տրամագիծը (մմ Ø)**				
	S. roseus	***S. aureus***	***B. subtilis***	***E. coli***	***S. cerevisiae***
Պենիցիլին					
Ամպիցիլին					
Ստրեպտոմիցին					
Ռիֆամպիցին					
Կանամիցին					

Թեմա 6
Սանիտարամանրէաբանական հետազոտության մեթոդներ

Աշխատանք 1
Ջրի սանիտարամանրէաբանական հետազոտության մեթոդներ

Ջրի մանրէաբանական աղտոտման հիմնական պատճառ են չմշակված կենցաղային և արտադրական կեղտաջրերը: Կոյուղաջրերը պարունակում են մարդու և կենդանիների աղիների միկրոբիոտայի մանրէներ, այդ թվում՝ ախտածին կամ պայմանական ախտածին տեսակներ: Ախտածին մանրէները վատ են զարգանում ջրում, քանի որ դրանց վրա բացասական ազդեցություն են թողնում արևի ճառագայթները և այլ գործոնները, այդ թվում՝ ջրի միկրոբիոտայի այլ ներկայացուցիչները: Այնուամենայնիվ դրանցից շատերը կարող են որոշ ժամանակ մնալ կենսունակ:

Ջրի սանիտարամանրէաբանական հետազոտությունում առաջին հերթին որոշվում է 1 մլ ջրում մանրէների ընդհանուր թվաքանակը: Խմելու ջուրը համարվում է մաքուր, եթե 1 մլ ջրում մանրէների ընդհանուր թվաքանակը չի գերազանցում 100-ը, կասկածելի՝ 100-150 և աղտոտված՝ 500 և ավելի:

Ջրի սանիտարամանրէաբանական հետազոտումը ներառում է նաև ախտածին մանրէների՝ սալմոնելների, խոլերայի վիբրիոնների, լեպտասպիրիլների, շիգելների և էնտերովիրուսների հայտնաբերումը: Քանի որ շրջակա միջավայրից ախտածին մանրէների մեկուսացումը պահանջում է հատուկ հետազոտություններ, մշակվել են անուղղակի մեթոդներ, որոնք թույլ են տալիս գնահատել ջրի կղանքային աղտոտումը *E. coli*-ի և աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիաների (ԱՑԽԲ), էնտերոկոկերի և ստաֆիլակոկերի հայտնաբերմամբ: Հատկապես կարևոր է սանիտարամանրէաբանական ցուցանիշների՝ կոլի տիտրի և կոլի ինդեքսի որոշումը: Կոլի տիտրը դա հետազոտվող ջրի ամենափոքր ծավալն է (մլ), որում հայտնաբերվում է աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիա: Կոլի ինդեքսը դա աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիաների թվաքանակն է, որը հայտնաբերվում է ջրի միավոր (1 լ) ծավալում: Այս ցուցանիշները որոշում են երկփուլ խմորման (ավանդական) եղանակով կամ թաղանթային ֆիլտրերի մեթոդով: Խմորման մեթոդի էությունը հետազոտվող ջրի որոշակի ծավալների ցանքի արդյունքում աճած բակտերիաների

կրկնակի աճեցումն է Էնդոյի սննդամիջավայրում: Թաղանթային ֆիլտրերի մեթոդի էությունը որոշակի ծավալով հետազոտվող ջրի բակտերիաների խտացումն է թաղանթային ֆիլտրերի մակերեսին, այնուհետև դրանց աճեցումն Էնդոյի սննդամիջավայրում: Երկու մեթոդների դեպքում էլ առաջացած գաղութները տարբերակվում են, և որոշվում է 1 լ ջրում աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիաների թվաքանակը՝ կոլի ինդեքսը, և դրա հիման վրա նաև՝ կոլի տիտրը:

Առաջադրանք 1

Ջրում մանրէների ընդհանուր թվի որոշումը, ջրի կոլի-տիտրի և կոլի-ինդեքսի որոշումը երկփուլ խմորման մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Մանրէազերծված Պետրիի թասեր (10), սրվակներ (10), պիպետներ (10), 500 մլ տարողությամբ անոթներ, մանրէազերծված 150-200 մլ 0.85% NaCl-ի լուծույթ (կամ ծորակային ջուր), 150 մլ ՄՊԱ, 30 մլ կիսահեղուկ սննդամիջավայր գլյուկոզով (լցված 7 կամ 10-ական մլ սրվակների մեջ), 50 մլ Էնդոյի սննդամիջավայր՝ լցված 2-3 մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ, 33 մլ 10× խիտ ԿՈԴԱ կամ Կեսլերի սննդամիջավայր՝ լցված 10-ական մլ 150-200 մլ ծավալ ունեցող 3 անոթների մեջ, ինչպես նաև 1-ական մլ 3 սրվակների մեջ, 60 մլ ԿՈԴԱ կամ Կեսլերի ստանդարտ խտությամբ սննդամիջավայր՝ լցված 10-ական մլ 3 հատ սրվակների մեջ, լողաններ:

Աշխատանքի ընթացքը

Ջրի նմուշահանում: Սանիտարամանրէաբանական հետազոտությունների համար նմուշահանել առնվազն 500 մլ ջուր և լցնել նախապես մանրէազերծված շշերի կամ սրվակների մեջ: Բաց մակերեսով ջրամբարներից և լողավազաններից նմուշահանումը կատարել 10-15 սմ խորությունից: Ծորակային ջրի նմուշահանումն իրականացնել նախապես սպիրտով թրջված բամբակով մշակված, ապա 10-15 րոպե ջրի հոսքից հետո: Նմուշահանումից հետո անոթը փակել ռետինե խողովակով: Քլորացված ջրի նմուշահանման համար նախապես մանրէազերծ անոթի մեջ տեղադրել դեքլորացնող նյութ՝ 10 մգ նատրիումի հիպոսուլֆատ:

Ջրի նմուշների բակտերիաբանական հետազոտությունը իրականացնել ոչ ուշ քան 2 ժամ նմուշահանումից հետո, իսկ դրա անհնարինության դեպքում՝ նմուշը պահպանել 1-6°C ջերմաստիճա-

նում, և իրականացնել հետազոտությունը ոչ ուշ, քան նմուշահանումից 6 ժամ հետո:

Ջրում մանրէների ընդհանուր թվի որոշումը: Նմուշները ցանքից առաջ նոսրացնել մանրէազերծված ծորակային ջրով կամ ֆիզիոլոգիական լուծույթով: Պատրաստել հաջորդական նոսրացումները՝ օգտագործելով յուրաքանչյուր նոսրացման համար նոր մանրէազերծված պիպետ: Յուրաքանչյուր նոսրացումից 1-ական մլ տեղափոխել մանրէազերծված Պետրիի թասերի մեջ, որից հետո ծածկել 10-15 մլ հալեցված և մինչև 45-50°C պաղեցված ՄՊԱ-ով: Թողնել մինչև սննդամիջավայրի պնդանալը, ապա ինկուբացնել 37°C պայմաններում 1 օր:

Բաց ջրամբարների ջրի ցանքը կատարել երկու թասերում, որոնցից մեկը ինկուբացնել 37°C պայմաններում 1 օր, իսկ մյուսը՝ 20°C պայմաններում 2 օր: Ինկուբացումից հետո հաշվել սննդամիջավայրի մակերեսին և խորքում աճած գաղութների թիվը: Հաշվարկել 1 մլ հետազոտվող ջրում մանրէների ընդհանուր թվաքանակը:

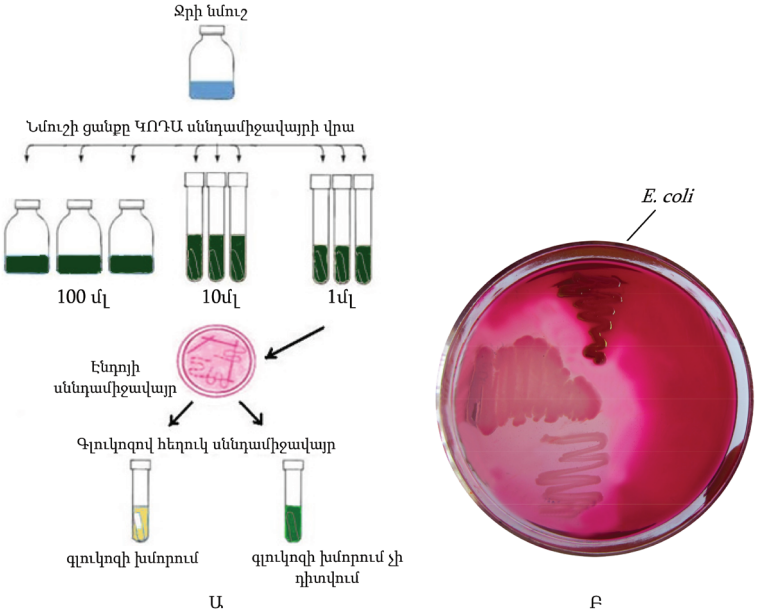
Ջրի կոլի-տիտրի և կոլի-ինդեքսի որոշումը: Բաց ջրամբարների ջրի հետազոտման համար սննդամիջավայր ներմուծել 100, 10, 1 և 0.1 մլ ծավալով ջրի նմուշներ, իսկ ծորակային ջրի հետազոտման համար՝ 100, 10 և 1 մլ ծավալով ջրի նմուշներ: Նշված ծավալներով հետազոտվող նմուշները ավելացնել Կեսլերի կամ ԿՈԴԱ սննդամիջավայրեր պարունակող անոթների և սրվակների մեջ: 100 և 10 մլ ջրի ցանքը իրականացնել համապատասխանաբար 10 և 1 մլ խիտ սննդամիջավայրում, իսկ 1 և 0.1 մլ ծավալով ջուրը՝ ստանդարտ խտությամբ 10 մլ սննդամիջավայրում (նկար 117 Ա): Ինկուբացնել 24 ժամ 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Պղտորության, թթվի և գազի բացակայության դեպքում տվյալները համարել բացասական և ավարտել հետազոտությունը:

Յուրաքանչյուր սրվակից, որում նկատվել է պղտորություն, թթվառաջացում կամ գազառաջացում, իրականացնել ցանք 3-4 հատվածների բաժանված Էնդոյի սննդամիջավայրի վրա: Ցանքանյութը վերցնել այն հաշվարկով, որ ստացվեն առանձին գաղութներ: Թասերը ինկուբացնել 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում 16-18 ժամ: Աճի բացակայության կամ աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիաներին ոչ բնորոշ գաղութների առկայության դեպքում ստացված տվյալները համարել բացասական և ավարտել հետազոտությունը:

Կարմիր, վարդագույն, բաց վարդագույն մետաղական փայլով կամ առանց փայլի (լակտոզդրական գաղութներ) գաղութներից (նկար 117 Բ) պատրաստել քսուքներ, ներկել ըստ Գրամի և ստուգել օքսիդազների առկայությունը: Այդ նպատակով սննդամիջավայրի մակերեսից 2-3 առանձին գաղութներ ապակյա ձողով վերցնել և տեղադրել երկմեթիլ-*n*-ֆենիլենդիամինով թրջած ֆիլտրի թղթի վրա: Բացասական օքսիդազային թեստի դեպքում թղթի գույնը չի փոխվում, դրականի դեպքում՝ այն կապտում է 1 րոպեի ընթացքում: Օքսիդազբացասական և գրամբացասական բակտերիաները կրկնակի աճեցնել 0.5% գլյուկոզ պարունակող կիսահեղուկ սննդային ագարում: Ինկուբացնել մեկ օր 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Թթվառաջացման և գազի առկայության դեպքում ստացված տվյալները գնահատել դրական և հաստատել հետազոտվող ջրում աղիքային ցուպիկի խմբի ներկայացուցիչների առկայությունը:

Տվյալները արտահայտել կոլի-ինդեքսով՝ հաշվարկելով ըստ աղյուսակներ 15-ի և 16-ի: Կոլի տիտրը կարելի է ածանցել կոլի ինդեքսից ըստ հետևյալ բանաձևի՝

Կոլի-տիտր = 1000/կոլի-ինդեքս:



Նկար 117. Կոլի-տիտրի որոշման փորձի ընթացքի գծապատկերը (Ա), Էնդոյի սննդամիջավայրի մակերեսին աճած գաղութները (Բ):

Աղյուսակ 15.

Ջրի կոլի-ինդեքսի որոշումը

Հետազոտվող ջրի ծավալը, մլ				Կոլի-ինդեքս	Կոլի-տիտր
100	10	1	0.1		
-	-	-	-	9-ից պակաս	111-ից ավելի
-	-	+	-	9	111
-	+	-	-	10	105
+	-	-	-	23	43
+	-	+	-	94	10
+	+	-	-	230	4
+	+	-	+	960	1
+	+	+	-	2380	0.4
+	+	+	+	2380-ից ավելի	0.4-ից պակաս

Աղյուսակ 16.

Խմելու ջրի կոլի-ինդեքսի որոշումը

Ջրի հետազոտման դրական տվյալների թիվը			Կոլի-ինդեքս
100 մլ պարունակող երեք անոթներից	10 մլ պարունակող երեք սրվակներից	1 մլ պարունակող երեք սրվակներից	
0	0	0	3-ից պակաս
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120

Ջրի հետազոտման դրական տվյալների թիվը			Կոլի-ինդեքս
100 մլ պարունակող երեք անոթներից	10 մլ պարունակող երեք սրվակներից	1 մլ պարունակող երեք սրվակներից	
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	1100-ից ավել

Առաջադրանք 2

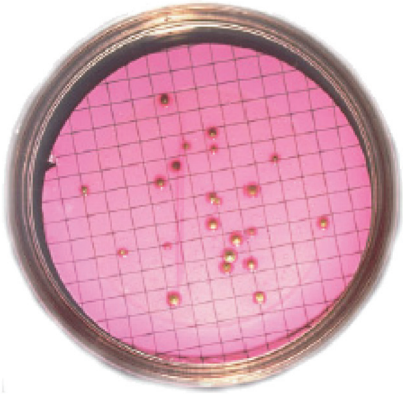
Ջրի կոլի-տիտրի և կոլի-ինդեքսի որոշումը թաղանթային ֆիլտրերի մեթոդով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: Պետրիի թասեր, սրվակներ, պիպետներ, 150, 250 և 500 մլ տարողությամբ անոթներ, ապակյա հրակայուն բաժակներ, ապակյա ձողիկներ, ունելիներ, մանրէաբանական ասեղ, խոշորացույց, ճընշաչափ, Զեյցի ֆիլտր, պոմպ, թաղանթային ֆիլտրեր, ֆիլտրի թուղթ, բամբակ, մանրաղիտակներ, առարկայական ապակիներ և ծածկապակիներ, ջերմապահարաններ, մանրէազերծված ֆիզիոլոգիական լուծույթ կամ ծորակային ջուր, Էնդոյի, Կեսլերի և ԿՈԴԱ սննդամիջավայրեր, ՄՊԱ, գլյուկոզով կիսահեղուկ սննդամիջավայր, երկմեթիլ-*n*-ֆենիլենեերկամինի թարմ պատրաստված լուծույթ, թարմ պատրաստված KOH-ի 3% լուծույթ, նատրիումի հիպոսուլֆիտ, ըստ Գրամի ներկման անհրաժեշտ ներկանյութեր, ֆուքսին, 70% էթանոլ:

Աշխատանքի ընթացքը: Ծորակային և արտեզյան ջրհորների ջրերի ֆիլտրման համար նմուշահանել 333 մլ ծավալով ջուր, բաց ջրամբարների մաքուր ջրի ֆիլտրման համար՝ 100, 10, 1 և 0.1 մլ, ավելի աղտոտված ջրերի դեպքում՝ 0.1, 0.01 և 0.001 մլ:

Ջրի ֆիլտրման համար օգտագործել, օրինակ՝ թաղանթային ֆիլտրեր «Վլադիպոր» № 3: Նախապես մանրէազերծել Զեյցի ֆիլտրն էթանոլով: Ֆիլտրը տեղադրել վակուումային պոմպին միացված սարքի ձագարում: Հետազոտությունը սկսել ջրի մեծ նոսրացումներից: Եթե ֆիլտրվող ջրի քանակությունը 1 մլ կամ պակաս է, ապա նոսրացնել մանրէազերծված ծորակային ջրով մինչև 10 մլ և ֆիլտրել: Ֆիլտրումն ավարտելուց հետո ֆիլտրերը տեղադրել Էն-

դոյի սննդամիջավայր պարունակող Պետրիի թասերի մեջ ֆիլտրող մակերեսով վեր: Մեկ Պետրիի թասի վրա կարելի է տեղադրել 3-4 ֆիլտր: Թասերը ֆիլտրերով ինկուբացնել 18-24 ժամ 37°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Հաշվարկի համար ընտրել այն ֆիլտրերը, որոնց վրա առկա են 10-ից ոչ պակաս և 50-ից ոչ շատ գաղութներ: Հաշվարկել բոլոր մետաղական փայլ ունեցող և չունեցող կարմիր գաղութները (նկար 118): Աղիքային ցուպիկի խմբի բակտերիաների պատկանելիությունը որոշել նախորդ առաջադրանքում նկարագրված գծապատկերով:



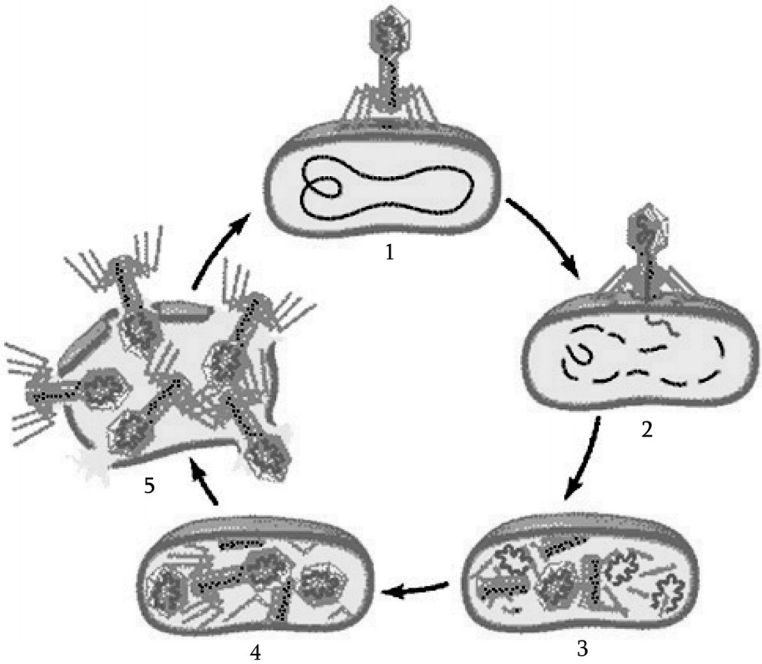
Նկար 118. Էնդոյի սննդամիջավայրի վրա ջրի ֆիլտրատի աճեցումից հետո առաջացած գաղութները:

Թեմա 7
Բակտերիաֆագերի աճեցման և քանակական վերլուծության մեթոդներ

Աշխատանք 1
T-զույգ բակտերիաֆագերի աճեցումը

Բովանդակություն: Հեղուկ սննդամիջավայրում ակտիվ բազմացող բակտերիական կուլտուրայում որոշակի քանակությամբ համապատասխան ֆագի ներմուծման դեպքում վերջիններս մակակլանվում են բակտերիական բջիջների մակերեսին և գաղտնի (լատենտ) շրջանից հետո լիզիսի ենթարկում դրանք: Դուստր բակտերիաֆագերը վարակում են առողջ բջիջները՝ առաջացնելով վարակի երկրորդ փուլը: Այսպես հաջորդաբար վարակվում են կախույթի բոլոր բջիջները, և գործընթացը շարունակվում է ընդհուպ բոլոր զգայուն բջիջների լիզիսը: Տեսականորեն ֆագի ելքը համապատասխանում է բակտերիաների պոպուլյացիայի թվաքանակին՝ բազմապատկած ելքի՝ մեկ բջջի լիզիսի արդյունքում առաջացած բակտերիաֆագերի միջին թվին: Իրական ելքը հաճախ ավելի պակաս է, քանի որ որոշ բակերիաֆագեր կրկնակի մակակլանվում են վարակված, բայց դեռևս լիզիսի չենթարկված բջիջների կամ լիզիսի ենթարկված բակտերիաների մնացորդների վրա:

Ժամանակահատվածը, որն անհրաժեշտ է բջջի լիզիսի համար, կախված է հիմնականում գաղտնի (լատենտ) շրջանի տևողությունից և ներմուծված ֆագային մասնիկների քանակությունից: Ֆագալիզիսի գործընթացի վրա ազդում են նաև ջերմաստիճանը, օդավորումը, սննդամիջավայրի կազմը, pH-ը և բակտերիաների ֆիզիոլոգիական վիճակը: Այսպես, օրինակ՝ ստացիոնար փուլում բակտերիական կուլտուրայի վարակումը չի բերում ֆագային սերնդի առաջացմանը: Լոգարիթմական փուլի վերջում բջիջների խտությունը սննդամիջավայրի 1 մլ-ում հասնում է մինչև $1x10^9$: Հավանականությունը, որ այդ փուլում կուլտուրան $1x10^9$ թվով ֆագային մասնիկներով վարակելիս բոլոր բակտերիաները կվարակվեն և 1-2 ժամ հետո ամբողջությամբ լիզիսի կենթարկվեն: Ֆագային մասնիկների թիվը 1 մլ-ում կարող է հասնել մինչև 10^{11}, քանի որ յուրաքանչյուր բակտերիական բջջի լիզիսի հետևանքով ձևավորվում են 100-200 ֆագային մասնիկներ:



Նկար 119. T4 ֆագի կենսացիկլը *E. coli*-**ի բջիջներում:**

1. Ֆագի մակակլանում E. coli-ի բջիջների մակերեսին, 2. Ֆագային ԴՆԹ-ի ներարկում պեր բջջի մեջ և պեր բջջի ԴՆԹ-ի քայքայում, 3. Ֆագային գենոմի և սպիտակուցների սինթեզ, 4. Ֆագային մասնիկների շտապորում, 5. Տեր բջջի լիզիս:

Առաջադրանք 1

T4 ֆագի կախույթի ստացումը *E. coli* տեր բջիջների կիրառմամբ:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *E. coli*-ի մեկօրյա կուլտուրա, T4 ֆագի կախույթ, մսապեպտոնային արգանակ, ագար-ագար, 250 մլ տարողությամբ անոթ, սրվակներ, մանրէազերծված պիպետներ, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ, ջերմապահարան, թափահարիչ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը: 250 մլ ծավալով մանրէազերծված անոթի մեջ ավելացնել 30 մլ մսապեպտոնային արգանակ և 3 մլ *E. coli*-ի մեկօրյա կուլտուրա: Խառնուրդը տեղադրել թափահարիչի վրա 37°C և ինկուբացնել 1.5 ժամ: Պղտորաչափական եղանակով որոշել 3 մլ նմուշում պղտորության աստիճանը: Օպտիկական խտությունը (λ=595 նմ) պետք է տատանվի 0.3-0.4 տիրույթում: Բակտերիական կախույթը վարակել՝ ներմուծելով հայտնի տիտրով ֆագի կախույթը 0.1 վարակային բազմապատիկով (ֆագային մասնիկների հարաբերությունը բակտերիական բջիջների թվին): Ֆագով վարակված բջիջների կախույթը տեղադրել ջերմապահարանում թափահարման պայմաններում 30 րոպե: Այնուհետև լիզիսի չենթարկված բջիջների ոչնչացման նպատակով ավելացնել մի քանի կաթիլ քլորոֆորմ և շարունակել թափահարումը ևս 15 րոպե: Բջիջների քայքայված մասնիկները և ֆագակայուն բջիջները հեռացնելու նպատակով ստացված լիզատը կենտրոնախուսել 4000 g-ի պայմաններում 20 րոպե: Ստացված ֆագային կախույթը պահել սառնարանում հետագա աշխատանքի համար:

Առաջադրանք 2

Ֆագի որակական վերլուծությունը կաթիլային եղանակով:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *E. coli*-ի մեկօրյա կուլտուրա, T4 ֆագի կախույթ, ՄՊԱ, մանրէազերծված պիպետներ, մածկաթիակ, Պետրիի թաս, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ, ջերմապահարան:

Աշխատանքի ընթացքը: Նախապես մանրէազերծված ՄՊԱ-ն լցնել Պետրիի թասերի մեջ: Սննդամիջավայրի մակերեսը չորացնել և պիպետով տեղադրել 1 մլ *E. coli*-ի մեկօրյա կուլտուրա: Մածկաթիակով վերջինս հավասարաչափ տարածել թասի ամբողջ մակերեսով: Այնուհետև մանրէազերծված պիպետով թասի եզրին մոտ կաթեցնել T4 ֆագի կախույթը, ապա Պետրիի թասը թեքել այնպես, որպեսզի կախույթի կաթիլը ծորա թասի տրամագծով: Թասը ինկուբացնել ջերմապահարանում 37°C պայմաններում 1 օր: Կախված ֆագի քանակությունից ֆիլտրատում կաթիլի ծորման ուղիով առաջանում է աճի բացակայության բիծ (նեգատիվ գաղութ) (նկար 120):

Նկար 120. Նեգատիվ գաղութի առաջացումը կաթիլային եղանակով ֆագի որակական վերլուծության դեպքում:

Առաջադրանք 3

Բակտերիաֆագի տիտրումը ագարային շերտերի մեթոդով:

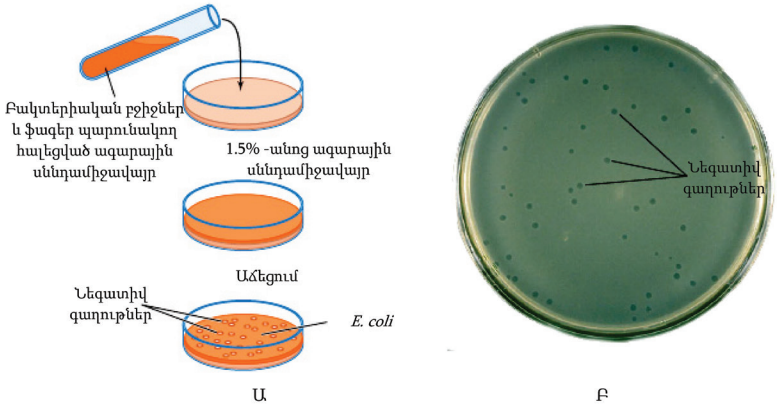
Բովանդակություն: Բակտերիաֆագերի ակտիվությունը որոշում են ըստ բակտերիական կուլտուրան լիզիսի ենթարկելու դրանց ունակությամբ և քանակապես արտահայտում են առավելագույն նոսրացման այն աստիճանով, որում ֆագը արտահայտել է իր լիտիկ ազդեցությունը: Բակտերիաֆագի ակտիվությունը որոշվում է միավոր ծավալում վարակային ակտիվ միավորների քանակությամբ, այսինքն՝ բակտերիաֆագի տիտրով:

Բակտերիաֆագի տիտրը որոշվում է ագարային շերտերի մեթոդով: Մեթոդի էությունը կիսահեղուկ ագարում (0.8%) 48°C պայմաններում զգայուն բակտերիական կուլտուրայի համապատասխան նոսրացմամբ բակտերիաֆագով վարակելն է: Այս խառնուրդը լցնում են 1.5% ագար-ագար պարունակող սննդային ագարի վրա, թողնում մինչև պնդանալը և ինկուբացնում ջերմապահարանում: 6-12 ժամ հետո բակտերիաները բազմանում են կիսահեղուկ շերտում՝ առաջացնելով բազմաթիվ գաղութներ: Վերին ագարային շերտի քիչ մածուցիկության շնորհիվ ֆագային մասնիկները լավ դիֆուզվում են սննդամիջավայրում՝ վարակելով և լիզիսի ենթարկելով մոտակա բակտերիական բջիջները: Արդյունքում առաջանում են դուստր կամ երկրորդ սերնդի ֆագային մասնիկներ, որոնք իրենց հերթին ունակ են վարակելու մոտակա նոր բակտերիաների: Ի վերջո, աճող բակտերիական գազոնի վրա առաջանում են աճի բացակայության բծեր կամ նեգատիվ գաղութներ, որոնցից յուրաքանչյուրի առաջացումը, հավանական է, հարուցվել է մեկ բակտերիաֆագով: Ուստի, նեգատիվ գաղութների քանակությունը կարող է հետազոտվող լուծույթում ֆագային մասնիկների քանակության պայմանական ցուցանիշ ծառայել:

Փորձի ընթացքի համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները: *E. coli*-ի մեկօրյա կուլտուրա, T4 ֆագի կախույթ, Լուրիա-Բերտրանի (ԼԲ) սննդամիջավայր, ագար-ագար, 250 մլ տարողությամբ անոթ, սրվակներ, մանրէազերծված պիպետներ, Պետրիի թասեր, սպիրտայրոց, բամբակյա անձեռոցիկ, ֆիլտրի թուղթ, մանրէազերծող լուծույթ, ջերմապահարան, թափահարիչ, ջրային բաղնիք:

Աշխատանքի ընթացքը: Ֆագային կախույթը նոսրացնել 10^8 անգամ ԼԲ սննդամիջավայրում: Յուրաքանչյուր նոսրացումից 1-ական

մլ ֆագային կախույթ տեղափոխել նոր սրվակների մեջ: Յուրաքանչյուր սրվակին ավելացնել 0.1 մլ զգայուն բջիջների՝ *E. coli* C-T4 մեկօրյա կուլտուրա, որի օպտիկական խտությունը պղտորաչափական եղանակով չափմամբ չի գերազանցում 0.5-0.6 (λ=595 նմ): Պահել սենյակային ջերմաստիճանում 15 րոպե: Խառնուրդին ավելացնել 6 մլ 0.7-0.8% ագար-ագար պարունակող ԼԲ սննդամիջավայր: Այդ սննդամիջավայրը նախապես հալեցնել և պաղեցնել ջրային բաղնիքում մինչև 48°C: Սրվակները զգուշությամբ և լավ խառնել, սրվակի պարունակությունը լցնել 1.5% ագար-ագարով ԼԲ սննդամիջավայր պարունակող Պետրիի թասի մեջ՝ համաչափ բաշխելով ագարի մակերեսով (նկար 121 Ա): Սննդամիջավայրի վերին շերտի պնդանալուց հետո (10-15 րոպե) թասերը շրջել հատակով վեր և ինկուբացնել ջերմապահարանում 37°C պայմաններում 1 օր: Հաջորդ օրը հաշվել նեգատիվ գաղութների քանակությունը (նկար 121 Բ) յուրաքանչյուր թասի վրա և որոշել ֆագի տիտրը սկզբնական նմուշում՝ հաշվի առնելով նոսրացման աստիճանը և ներմուծվող նմուշի ծավալը: Օրինակ՝ եթե թասերի վրա ավելացվել է $1 \cdot 10^7$ նոսրացումով 0.1 մլ ֆագային կախույթ և այդ թասի վրա առաջացել է 150 նեգատիվ գաղութ, ապա ֆագալիզատի տիտրը հավասար կլինի (150 x 10) x 10^7 = 1.5 x 10^{10} մասնիկ 1 մլ-ում:



Նկար 121. Ագարային շերտերի մեթոդով ֆագերի տիտրման ընթացքի հաջորդականությունը (Ա) և աճեցումից հետո նեգատիվ գաղութների առաջացումը (Բ):

ԹԵՍՏԵՐ ԵՎ ԱՌԱՋԱԴՐԱՆՔՆԵՐ

1. Պրոկարիոտ բջիջների օրինակներ են՝
Ա) վիրուսները և բակտերիաները,
Բ) ցիանաբակտերիաները և պրիոնները,
Գ) արքեաները և ցիանաբակտերիաները,
Դ) լեյկոցիտները և վիրոիդները:

2. Արքեաները՝
Ա) վիրուսներ են,
Բ) բակտերիաներ են,
Գ) պրոկարիոտներ են,
Դ) էուկարիոտներ են:

3. Գտնել համապատասխանությունները՝

Ա) պրոկարիոտներ	1. թարթչավորներ
Բ) ոչ բջջային ձևեր	2. սնկեր
Գ) շաքարասնկեր	3. դիատոմայիններ
Դ) էուկարիոտ նախակենդանիներ	4. վիրուսներ
Ե) միաբջիջ ջրիմուռներ	5. բակտերիաներ:

4. Բակտերիական բջջի բազմացման եղանակ է՝
Ա) միտոզը և մեյոզը,
Բ) միտոզը և երկակի կիսումը,
Գ) բազմակի և երկակի կիսումը,
Դ) բողբոջումը և մեյոզը:

5. Թվարկել պրոկարիոտներին բնորոշ առնվազն երեք հատկանիշ:

_____

6. Վիրուսները պարունակում են՝
Ա) կորիզ,
Բ) ԴՆԹ կամ ՌՆԹ,
Գ) ԴՆԹ և ՌՆԹ,
Դ) նուկլեոիդ:

7. Նուկլեոիդը դա
Ա) քրոմոսոմների հավաքն է, որը սահմանազատված է ցիտոպլազմից

կորիզաթաղանթով,

Բ) ժառանգակիր նյութն է, որը համապատասխանում է մեկ քրոմոսոմին և ցիտոպլազմից սահմանազատված է կորիզաթաղանթով,

Գ) օղակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլ է,

Դ) օղակաձև ԴՆԹ-ի մոլեկուլ է, որը ցիտոպլազմից սահմանազատված է կորիզաթաղանթով:

8. Էուկարիոտ մանրէներ են

Ա) սնկերը, բակտերիաները և վիրուսները,

Բ) ջրիմուռները, սնկերը և արքեաները,

Գ) ջրիմուռները, սնկերը և նախակենդանիները,

Դ) սնկերը, նախակենդանիները և ցիանաբակտերիաները

9. Նշել պրոկարիոտների կառուցվածքային առանձնահատկությունները:

_____

_____

10. Բակտերիաների միջին չափսերը տատանվում են _____ սահմաններում:

11. Մանրէների մաքուր կուլտուրան դա՝

Ա) մեկ կամ մի քանի տեսակի մանրէների պոպուլյացիան է,

Բ) մեկից ավելի տեսակի մանրէների պոպուլյացիան է,

Գ) մեկ տեսակի մանրէների պոպուլյացիան է,

Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

12. Աշխատանքից առաջ լամինար բոքսերը՝

Ա) լվանում են ախտահանիչ նյութերով

Բ) մանրէազերծում են ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով,

Գ) մանրէազերծում են ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով և լվանում ախտահանիչ նյութերով,

Դ) ճիշտ պատասխանը բացակայում է:

13. Մանրէների աճեցման համար նախատեսվող աշխատանքային տարածքը պետք է մանրէազերծել ՝

Ա) քլորամինով կամ 70% էթանոլով,

Բ) ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով,

Գ) ավտոկլավացմամբ և իզոպրոպիլ սպիրտով,
Դ) ճիշտ են Ա) և Բ) պատասխանները:

14. Սպիրտայրոցի կամ գազայրոցի բոցի առավելագույն ջերմաստիճանը դրա՝
Ա) ստորին և կենտրոնական հատվածներում է,
Բ) կողմնային և կենտրոնական հատվածներում է,
Գ) վերին և ստորին հատվածներում է,
Դ) վերին և կողմնային հատվածներում է:

15. Քեմոօրգանահետերոտրոֆ մանրէների համար ածխածնի և էներգիայի աղբյուր են ՝
Ա) օրգանական միացությունները,
Բ) CO_2-ը կամ միածխածնային այլ միացությունները,
Գ) ածխածնի թե՛ օրգանական, թե՛ անօրգանական միացությունները,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

16. Ֆոտոլիթոտրոֆ մանրէների համար էլեկտրոնների դոնոր են՝
Ա) օրգանական միացությունները,
Բ) ջուրը կամ անօրգանական վերականգնված միացությունները,
Գ) նիտրատները և սուլֆատները,
Դ) ճիշտ պատասխանը բացակայում է:

17. Քեմոլիթոտրոֆ մանրէների համար էներգիայի աղբյուր են՝
Ա) բարդ օրգանական միացությունները,
Բ) որոշ վերականգնված անօրգանական միացությունները,
Գ) լույսը,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

18. Ավտոտրոֆ մանրէների համար որպես ածխածնի աղբյուր են՝
Ա) մի- և երկածխածնային միացությունները,
Բ) բարդ օրգանական միացությունները,
Գ) CO_2-ը և այլ միածխածնային միացությունները,
Դ) բացակայում է ճիշտ պատասխանը:

19. Դիազոտրոֆ մանրէների համար ազոտի աղբյուր են՝
Ա) ամինաթթուները,
Բ) նիտրատները,

Գ) միզանյութը,
Դ) մոլեկուլային ազոտը:

20. Մանրէների աճի ընթացքում սննդամիջավայրի pH-ը կայուն պահպանելու համար սննդամիջավայրին ավելացնում են՝
Ա) կավիճ,
Բ) ֆոսֆատային բուֆեր,
Գ) $NaHCO_3$-ի 10%-ոց ջրային լուծույթ,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

21. Ընտրել նշված մանրէների ֆիզիոլոգիական խմբերի աճեցման համար համապատասխան սարքավորումը (հնարավոր են մեկից ավելի տարբերակներ)՝

Ա) օբլիգատ անաերոբներ	1. թափահարիչ
Բ) օբլիգատ աերոբներ	2. անաերոստատ
Գ) ֆակուլտատիվ անաերոբներ	3. վակուումային էքսիկատոր
Դ) աերոտոլերանտներ	4. ֆերմենտյոր

22. Որոշակի ծավալով անոթում մանրէային կուլտուրայի աճեցման 72-րդ ժամում կուլտուրան զբաղեցնում է անոթի կեսը: Կուլտիվացման ո՞ր ժամում կուլտուրան կզբաղեցնի ամբողջ տարան, եթե այդ կուլտուրայում մանրէների բջիջների կիսումների միջև ընկած ժամանակը 1 ժամ է:

23. Որոշել մանրէի կիսումների միջև ընկած ժամանակը, եթե 5 ժամում բջիջների թիվը կախույթում աճում է 10^2-ից մինչև 10^4:

24. Բջիջների բաժանման հաստատուն առավելագույն արագությունը մանրէների աճի ընթացքում դիտվում է՝
Ա) էքսպոնենցիալ (log) փուլում,
Բ) մահացման փուլում,
Գ) ստացիոնար փուլում,
Դ) սկզբնական (lag) փուլում:

25. Թվարկել պարբերական կուլտուրայի և անընդհատ կուլտուրայի միջև եղած սկզբունքային տարբերությունները:

_____

_____

26. Ընտրել նշված նյութերի և պարագաների մանրէազերծման ճիշտ պայմանակարգը՝

Ա) կաթ և հյութեր,
Բ) գլիցերին և վազելինային նյութեր,
Գ) մասպեպտոնային արգանակ և ՄՊԱ,
Դ) վիտամիններ և ամինաթթուներ պարունակող սինթետիկ սննդամիջավայրեր,
Գ) ապակյա ամանեղեն,

1. ավտոկլավացում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում,
2. ֆիլտրում թաղանթային ֆիլտրերով,
3. ավտոկլավացում 0.5 ամճ պայմաններում 15-30 րոպեի ընթացքում,
4. չոր մանրէազերծում <180°C ջերմաստիճանային պայմաններում 1-3 ժամ,
5. չոր մանրէազերծում ջեռոցներում 160°C պայմաններում 2 ժամ:

27. Մանրէազերծումը դա՝
Ա) մանրէների բնական աղբյուրներից մեկուսացումն է,
Բ) ախտածին մանրէների ոչնչացումն է,
Գ) բոլոր կենդանական ձևերի ոչնչացումն է,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

28. Մանրէազերծման մեթոդ է՝
Ա) ծորակային ջրով լվացումը,
Բ) թորած ջրով լվացումը,
Գ) ինֆրակարմիր ճառագայթներով մշակումը,
Դ) ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով մշակումը:

29. Պաստերացումն իրականացնում են՝
Ա) 40-60°C 10-30 րոպեի ընթացքում,
Բ) 60-80°C 10-30 րոպեի ընթացքում,
Գ) 100-120°C 10-30 րոպեի ընթացքում,
Դ) 140-180°C 10-30 րոպեի ընթացքում:

30. Մանրէազերծման համար օգտագործվում են՝
Ա) ծակոտու 10-20 մկմ տրամագիծ ունեցող ֆիլտրեր,
Բ) ծակոտու 5-10 մկմ տրամագիծ ունեցող ֆիլտրեր,
Գ) ծակոտու 1.8-5 մկմ տրամագիծ ունեցող ֆիլտրեր,
Դ) ծակոտու 0.2-1.8 մկմ տրամագիծ ունեցող ֆիլտրեր:

31. Չոր ջերմամշակմամբ մանրէազերծման պայմաններից են՝

Ա) 140°C ջերմաստիճանում, 60 րոպե տևողությամբ,

Բ) 170°C ջերմաստիճանում, 180 րոպե տևողությամբ,

Գ) 160°C ջերմաստիճանում, 150 րոպե տևողությամբ,

Դ) 150°C ջերմաստիճանում, 150 րոպե տևողությամբ:

32. Ջեռոցում կարելի է մանրէազերծել՝

Ա) վազելինային յուղ և գլիցերին,

Բ) մածկաթիակներ, անոթներ և սրվակներ,

Գ) քիմիական բաժակներ, կենտրոնախուսակային ապակյա սրվակներ և Բուրիի խողովակներ,

Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

33. Գտնել համապատասխանությունները՝

Ա) էլեկտրոնների փունջն անցնում է օբյեկտի շատ բարակ շերտով,	1. ՍԷՄ
Բ) տեսանելի լույսն անցնում է օբյեկտով,	2. ԿԼՍՄ,
Գ) օբյեկտների միջով անցնելիս լույսի ճառագայթների փուլային տաբերությունները փոխակերպվում են ամպլիտուդայինի,	3. փուլացայտերանգային մանրադիտակ,
Դ) տեսանելի լույսի ճառագայթները ցրվում են օբյեկտի վրա ընկնելիս և օբյեկտը դառնում է տեսանելի մութ դաշտում,	4. ՏԷՄ,
Ե) մանրադիտակ, որում օգտագործվում է ուլտրամանուշակագույն լուսարձակումը,	5. լուսարձակող մանրադիտակ,
Զ) օբյեկտի մակերեսը հաջորդաբար էլեկտրոնների փնջով ռմբահարմամբ սքանավորված պատկեր է ձևավորվում,	6. մանրադիտակային հետազոտումը մութ դաշտում,
Է) լազերային ալիքը ճեղքող տատանվող հայելու միջոցով անընդհատ և հաջորդաբար, գիծ առ գիծ սքանավորում է հետազոտվող օբյեկտի մակերեսը,	7. լուսային մանրադիտակ:

34. Իմերսիոն յուղի բեկման ցուցիչը մոտ է՝

Ա) ապակու բեկման ցուցչին,

Բ) ջրի բեկման ցուցչին,
Գ) ձիթայուղի բեկման ցուցչին,
Դ) օդի բեկման ցուցչին:

35. Մանրէային բջիջների մեծությունը սովորաբար արտահայտվում է՝
Ա) միկրոմետրերով,
Բ) նանոմետրերով,
Գ) անգստրեմներով,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները

36. Լուսային մանրադիտակի լուծող ունակությունը՝
Ա) հակադարձ համեմատական է երկու կետերի միջև եղած նվազագույն հեռավորությանը, երբ այդ կետերն ընկալվում են առանձին,
Բ) ուղիղ համեմատական է երկու կետերի միջև եղած նվազագույն հեռավորությանը, երբ այդ կետերն ընկալվում են առանձին,
Գ) ուղիղ համեմատական է երկու կետերի միջև եղած նվազագույն հեռավորությանը, երբ այդ կետերն ընկալվում են միասին,
Դ) հակադարձ համեմատական է երկու կետերի միջև եղած նվազագույն հեռավորությանը, երբ այդ կետերն ընկալվում են միասին:

37. Լուսային մանրադիտակի լուծող ունակությունն այնքան ավելի բարձր կլինի՝
Ա) որքան երկար է օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունը և մեծ է միջավայրի բեկման ցուցիչը,
Բ) որքան կարճ է օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունը և մեծ է միջավայրի բեկման ցուցիչը,
Գ) որքան կարճ է օգտագործվող լույսի ալիքի երկարությունը և փոքր է միջավայրի բեկման ցուցիչը,
Դ) բացակայում է ճիշտ պատասխանը:

38. Մութ դաշտում մանրադիտակի հետազոտման համար նախատեսված կոնդենսորի միջով պատրաստուկի հարթության վրա ընկնում են՝
Ա) միայն լույսի կենտրոնական ճառագայթները,
Բ) միայն լույսի կողքային ճառագայթները,
Գ) լույսի զուգահեռ ճառագայթները,
Դ) լույսի կենտրոնական և կողքային ճառագայթները:

39. Ընտրել նշված մանրէների կուտակիչ կուլտուրաների ստացման համար համապատասխան էլեկտիվ պայմանները՝

Ա) դենիտրիֆիկացնող բակտերիաներ,	1. օրգանական սուբստրատներ, լույսի բացակայություն, անաերոբ պայմաններ, ջրածին և CO_2,
Բ) ցիանաբակտերիաներ,	2. անաերոբ պայմաններ, օրգանական սուբստրատներ, NO_3^-,
Գ) *Nitrobacter,*	3. լույսը, CO_2, N_2, աերոբ պայմաններ, սուլֆիդների բացակայություն,
Դ) մեթանածին արքեաներ,	4. սննդամիջավայրում բացակայում են ազոտի օրգանական միացությունները, աերոբ պայմաններ, NO_2^-:

40. Քեմոլիթոավտոտրոֆ մանրէներ են՝

Ա) *Clostridium*-ը և *Enterobacter*-ը,

Բ) *Thiobacillus*-ը և *Nitrobacter*-ը,

Գ) *Bacillus*-ը և *Azotobacter*-ը,

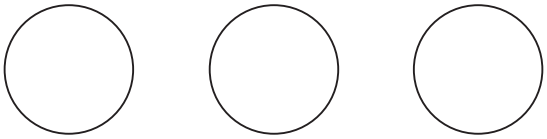
Դ) ցիանաբակտերիաները և ջրիմուռները:

41. Նշել Կոխի մեթոդով մաքուր կուլտուրայի ստացման համար անհրաժեշտ նյութերը և պարագաները:

_____

_____

42. Օղակներում գծապատկերել կուտակիչ կուլտուրայից մաքուր կուլտուրայի ստացման համար պինդ սննդամիջավայրի մակերեսին գծային ցանքի հաջորդականությունների տարբերակները:



43. Եթե ածխածնի աղբյուրն օրգանական նյութ է, էլեկտրոնների դոնորը՝ H_2S-ը, իսկ էներգիայի աղբյուրը՝ լույսը, ապա նյութափոխանակային տիպը՝

Ա) ֆոտոօրգանահետերոտրոֆային է,

Բ) ֆոտոլիթոհետերոտրոֆային է,

Գ) քեմոլիթոավտոտրոֆային է,
Դ) քեմոօրգանահետերոտրոֆային է:

44. Եթե ածխածնի աղբյուրը CO_2-ն է, էլեկտրոնների դոնորը՝ H_2O-ը, իսկ էներգիայի աղբյուրը՝ լույսը, ապա նյութափոխանակային տիպը՝
Ա) ֆոտոօրգանաավտոտրոֆային է,
Բ) ֆոտոլիթոավտոտրոֆային է,
Գ) քեմոլիթոավտոտրոֆային է,
Դ) ֆոտոլիթոհետերոտրոֆային է:

45. Բարդ սպիտակուցների ճեղքման գործընթացում մասնակցում են մանրէների ֆերմենտներից՝
Ա) պրոտեազները,
Բ) ցելյուլազները,
Գ) պերօքսիդազները,
Դ) լիպազները:

46. Ըստ էլեկտրոնների դոնորի բակտերիաները բաժանվում են՝
Ա) ավտո- և հետերոտրոֆների,
Բ) ֆոտո- և քեմոտրոֆների,
Գ) լիթո- և օրգանատրոֆների,
Դ) ճիշտ պատասխանը բացակայում է:

47. Ազոտային ավտոտրոֆները որպես ազոտի աղբյուր օգտագործում են՝
Ա) մթնոլորտային մոլեկուլային ազոտը,
Բ) ամոնիումային ազոտը,
Գ) նիտրատները և նիտրիտները,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

48. Էշբիի էլեկտիվ սննդամիջավայրում որպես ազոտի միակ աղբյուր ավելացնում են՝
Ա) ամոնիումային ազոտ,
Բ) նիտրիտներ և նիտրատներ,
Գ) ամինաթթուներ կամ ազոտ պարունակող այլ օրգանական միացություններ,
Դ) բացակայում է ճիշտ պատասխանը:

49. Այն մանրէները, որոնք գլյուկոզից և ամոնիակային աղերից ունակ են սինթեզելու աճի համար անհրաժեշտ նյութերը, կոչվում են՝

Ա) աուքսոտրոֆներ,
Բ) պրոտոտրոֆներ,
Գ) ավտոտրոֆներ,
Դ) դիազոտրոֆներ:

50. Օբլիգատ աերոբ մանրէների շնչառական շղթայում էլեկտրոնների վերջնական ակցեպտորն է՝
Ա) թթվածինը,
Բ) օրգանական թթուները,
Գ) սուլֆատները,
Դ) նիտրատները:

51. Օբլիգատ անաերոբ մանրէների շնչառական շղթայում էլեկտրոննե-րի վերջնական ակցեպտոր կարող է ծառայել՝
Ա) թթվածինը,
Բ) ջրածինը,
Գ) սուլֆատը կամ նիտրատը,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

52. Դենիտրիֆիկացման վերջնական արգասիքն է՝
Ա) ամոնիակը,
Բ) նիտրիտը,
Գ) N_2,
Դ) բոլոր վերը նշվածները:

53. Մանրէների պահպանման մեթոդներից է՝
Ա) մանրէների պահպանումը սննդամիջավայրում մայրիի յուղի տակ,
Բ) մանրէների աճեցումը թափահարիչում,
Գ) լիոֆիլացումը,
Դ) մանրէների սառեցումը սննդամիջավայրում:

54. Անաերոբ մանրէների պահպանման մեթոդներից է՝
Ա) փոխացանքը շեղակների մակերեսին,
Բ) փոխացանքը 0.2-0.3% ագար-ագար պարունակող կիսահեղուկ սննդամիջավայրերում,
Գ) փոխացանքը հեղուկ սննդամիջավայրեր պարունակող Ռ. Հանգեյ-թի անոթում,
Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

55. Լիոֆիլացումը դա՝

Ա) մանրէազերծում է տաք գոլորշիով,

Բ) սառեցված բջիջների չորացման գործընթացն է վակուումում,

Գ) մանրէների աճեցումն է ֆերմենտյորում,

Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

56. Նշել լիոֆիլիացման գործընթացի փուլերը և օգտագործվող սննդամիջավայրերի կազմը:

_____

_____

57. Մանրէների երկարատև պահպանման համար ո՞ր մեթոդն է նախընտրելի և ինչու՞:

_____

_____

58. Սառեցման եղանակով մանրէների պահպանման համար որպես կրիոպաշտպանիչ օգտագործվում է՝

Ա) մայրիի յուղը,

Բ) 10% NaCl-ի լուծույթը,

Գ) թորած ջուրը,

Դ) 10-20% գլիցերինի լուծույթը:

59. Սպոր առաջացնող անաերոբ բակտերիաների պահպանման համար կիրառվում է՝

Ա) լիոֆիլիացումը,

Բ) մանրէների չորացումը մակակլանիչների վրա,

Գ) սառեցումը սննդամիջավայրի և գլիցերոլի լուծույթում,

Դ) ճիշտ են բոլոր պատասխանները:

60. Լիոֆիլիացված բջիջների վերաակտիվացման համար ավելացնում են

Ա) 1-2% NaCl-ի լուծույթ,

Բ) թորած կամ ծորակային ջուր,

Գ) գլիցերինային լուծույթ,

Դ) 7-10% դիմեթիլսուլֆօքսիդի լուծույթ:

ՀԱՎԵԼՎԱԾ 1
Սնդամիջավայրեր

1. Մսապեպտոնային ագար (ՄՊԱ)

Արգանակ 1000 մլ, պեպտոն 1%, NaCl 0.5%, ագար-ագար 0.8-3%: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20-30 րոպեի ընթացքում:

Արգանակը պատրաստելու համար միսը մաքրել ոսկորներից, ճարպերից և ջլերից, մանր կտրատել կամ աղալ մսաղացով: 500 գ ստացված մսային խճողակին ավելացնել 1 լ ծորակային ջուր և թողնել սենյակային ջերմաստիճանային պայմաններում 12 ժամ կամ 30°C 6 ժամ: Այնուհետև մսաջուրը քամել թանզիվով, իսկ ստացված լուծամզվածքը եռացնել 30 րոպե: Ստացված զանգվածը ֆիլտրել բամբակյա ֆիլտրով, ծավալը հասցնել սկզբնականին՝ ավելացնելով ջուր:

2. Ածիկային քաղցու ագար

Ածիկային քաղցու 1000 մլ, ագար-ագար 0.8-3%: Մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20-30 րոպեի ընթացքում:

Ածիկային քաղցուն պատրաստելու համար գարու հատիկները թրջել սառը ջրով և ծլեցնել 35°C ջերմաստիճանային պայմաններում: Երբ ծիլերը հասնեն հատիկի կրկնակի երկարության, դրանց պետք է չորացնել ածիկ ստանալու համար:

Քաղցուն պատրաստել հետևյալ կերպ. 250 գ աղացած ածիկը ծածկել 1 լ ծորակային ջրով, տաքացնել մինչև 48-50°C և թողնել 30 րոպե՝ անընդհատ խառնելով կախույթը: Այնուհետև ջերմաստիճանը տաքացնել մինչև 55-58°C և պահպանել այն մինչև օսլայի ամբողջական շաքարացումը: Օսլայի ամբողջական շաքարացումը ստուգել յոդի հետ փոխազդեցության ռեակցիայով: Ստացված լուծամզվածքը ֆիլտրել բամբակով կամ թղթե ֆիլտրով: Ֆիլտրատում որոշել շաքարների քանակությունը՝ օգտվելով Բալինգի խտաչափով (°Բ): Անհրաժեշտ շաքարի խտությամբ քաղցուի ծավալը հասցնել ծորակային ջրով:

Որոշ սնկերի աճեցման համար պետք է օգտագործել 3-4°Բ, խմորասնկերի համար՝ 6-8°Բ, քացախաթթվային բակտերիաների համար՝ 4-6°Բ, իսկ կաթնաթթվային բակտերիաների համար՝ 8-12°Բ քաղցու:

3. Անքաշ կաթ

Թարմ կաթը տաքացնել մինչև եռալը, լցնել գլանների մեջ և պա-

հել սառնարանում 10-20 ժամ: Այնուհետև սերը հեռացնել և մասամբ յուղազրկված կաթը լցնել անոթների մեջ և մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 30 րոպեի ընթացքում:

4. Յուղազրկված կաթ

Անքաշ կաթը զատիչով ամբողջովին յուղազրկել, այնուհետև սերը հեռացնել և ստացված կաթը լցնել անոթների մեջ: Յուղազրկված կաթը կարելի է ստանալ նաև կենտրոնախուսմամբ (15 րոպե 650-1500 g), կամ եռացնելով, ապա թողնել սառնարանում 2 օր: Մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 30 րոպեի ընթացքում:

5. Կազեինի հիդրոլիզատ

20 գ կազեինը լուծել 200 մլ ջրում, ավելացնել 10 մլ խիտ H_2SO_4 և հիդրոլիզել ավտոկլավում 1.5 ամճ պայմաններում 4 ժամվա ընթացքում:

6. Շաքարասնկային ավտոլիզատ

40 գրամ թարմ մամլված շաքարասնկերը (կամ 10 գ չոր շաքարասնկերը) լուծել 100 մլ ջրի մեջ, ավելացնել թիմոլի մի քանի բյուրեղ կամ 1-2 մլ քլորոֆորմ: Ստացված խառնուրդը տեղադրել 50-55°C ջերմապահարանում երեք օր: Ջերմության հավասարաչափ բաշխման նպատակով խառնուրդը թափահարել օրական 1-2 անգամ: Ստացված դարչնագույն ավտոլիազատը լավ խառնել և եռացնել 20 րոպե: Այնուհետև լուծույթը ֆիլտրել թղթե ֆիլտրով: Ավտոլիզատը մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում:

7. ՄՌՇ սննդամիջավայր (Մեն, Ռոզոզա և Շարպի սննդամիջավայր)

Կազեինի հիդրոլիզատ 10 գ, փոշիացված մսապեպտոնային արգանակ 10 գ, շաքարասնկային լուծամզվածք 5 գ, գլյուկոզ 20 գ, CH_3COONa 5 գ, ամոնիումի կիտրոնաթթվային աղ (երկտեղակալված) 2 գ, տվին 80 1 մլ, K_2HPO_4 2 գ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 գ, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 գ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 6.2-6.5: Սննդամիջավայրը մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20-30 րոպեի ընթացքում:

8. Էշբիի սննդամիջավայր

Սախարոզ կամ մաննիտ 20 գ, K_2HPO_4 0.2 գ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 գ, NaCl 0.2 գ, K_2SO_4 0.1 գ, $CaCO_3$ 5 գ, միկրոտարրերի խառնուրդ 1 մլ, թորած ջուր 1000 մլ: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

Միկրոտարրերի լուծույթ (ըստ Ֆյոդորովի). H_3BO_3 5 գ, $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 5 գ, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 գ, KI 0.5 գ, NaBr 0.5 գ, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 0.3 գ, թորած ջուր 1000 մլ:

9. ԼԲ (Լուրիա-Բերտրանիի) սննդամիջավայր

Տրիպտոն 10 գ, շաքարասնկային լուծամզվածք 5 գ, NaCl5 գ, թորած ջուր 1000 մլ: Մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20-30 րոպեի ընթացքում:

10. ԿՈԴԱ սննդամիջավայր

Թողարկվում է չոր փոշու ձևով: Բաղկացած է պեպտոնից, ձկան հիդրոլիզատից, նատրիումի դոդեցիլսուլֆատից, NaCl-ից, լակտոզից, բրոմթիմոլկապույտից: Սննդամիջավայրը պատրաստում են ըստ պիտակի վրա առկա ցուցումների:

11. Էնդոյի սննդամիջավայր

Ձկան ալյուրի պանկրեատինային հիդրոլիզատ 12 գ, շաքարասնկային լուծամզվածք 1 գ, NaCl 3. 4 գ, Na_2SO_3 0.8 գ, Na_2HPO_4 0.5 գ, D-լակտոզ 10 գ, հիմնային ֆուքսին 0.2 գ, ագար-ագար 15 գ, թորած ջուր 1000 մլ: Բոլոր բաղադրիչները բացառությամբ լակտոզի, լուծել 900 մլ ջրում, իսկ լակտոզը լուծել 100 մլ ջրում և մանրէազերծել առանձին՝ եռացնելով 15 րոպե կամ ավտոկլավով 0.5 ամճ պայմաններում 30 րոպեի ընթացքում: Հայտանյութը պատրաստման համար Na_2SO_3 լուծել 5 մլ թորած ջրում, որին ավելացնել հիմնային ֆուքսինի սպիրտային լուծույթ այնքան, մինչև լուծույթը կարմիրից դառնա թույլ վարդագույն: Ներկանյութը ամբողջովին ավելացնել մանրէազերծված սննդամիջավայրին: Սննդամիջավայրի pH 7.4-7.6:

12. Չիստովիչի դեղնուցաաղային ագար

10 գ NaCl պարունակող 100 մլ մանրէազերծված ՄՊԱ-ին ավելացնել 10-20 մլ ձվի դեղնուցակիթ, pH 6.9-7: Դեղնուցակիթ պատրաստել մանրէազերծ պայմաններում ձվի դեղնուցը՝ ավելացնելով 200 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթին և լավ խառնել:

13. Ցենտրիմիդային ագար

Ժելատինի պանկրեատինային հիդրոլիզատ 20 գ, MgCl 1.4 գ, K_2SO_4 10 գ, ցենտրիմիդ 0.3 գ, ագար-ագար 15 գ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 7.2±0.2: Սննդամիջավայրերի բաղադրամասերը լուծել թորած ջրում, ավելացնել 10 մլ գլիցերին: Սննդամիջավայրը եռացնել բաղադրամասերի լավ լուծվելու նպատակով, մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում:

14. Շոկոլադային ագար

Պեպտոն 20 գ, գլյուկոզ 0.5 գ, NaCl 5 գ, Na_2HPO_4 5 գ, ագար-ագար

15 գ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 7.3±0.2: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Մանրէազերծ պայմաններում 90 մլ մանրէազերծված սննդամիջավայրին ավելացնել 10 մլ արյուն: Ջրային բաղնիքում 80°C պայմաններում տաքացնել 10 րոպե մինչև սննդամիջավայրի գույնը փոխվի դարչնագույնի:

15. Կազամինային սննդամիջավայր

Կազամինային թթու 5 գ, շաքարասնկային լուծամզվածք 1 գ, Na-գլյուտամատ 1 գ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 գ, NaCl 200 գ, KCl 2 գ, Na-ցիտրատ 3 գ, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 36 մգ, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.36 մգ, ագար-ագար 20 գ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 7-7.2: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում:

16. Լովենշտեյն- Ջենսենի սննդամիջավայր

L-ասպարագին 3.6 գ, KH_2PO_4 2.4 գ, $MgSO_4$ 0.24 գ, մագնեզիումի ցիտրատ 0.6 գ, կարտոֆիլային օսլա 30 գ, մալաքիտ կանաչ 0.4 գ, 12 մլ գլիցերին, 600 մլ թորած ջուր: Բաղադրամասերը լուծել ջրում (բաղադրամասերը լավ լուծելու նպատակով եռացնել 15 րոպե) և մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում: Մանրէազերծ պայմաններում պատրաստել ձվի դեղնուցակիթ (370 մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթին ավելացնել մեկ ձվի դեղնուցակիթ և լավ խառնել): Ստացված ձվի դեղնուցակիթը ավելացնել մանրէազերծված հիմնական սննդամիջավայրին:

17. Գաուզեի սննդամիջավայր

KNO_3 1 գ, K_2HPO_4 0.5 գ, $MgSO_4$ 0.5 գ, NaCl 0.5 գ, $FeSO_4$ 0.5 գ, կարտոֆիլային օսլա 20 գ, ագար-ագար 20 գ, ծորակային ջուր 1000 մլ, pH 7-7.4: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

18. Սննդամիջավայր *Thermus* ցեղի ներկայացուցիչների աճեցման համար

Պեպտոն 1 գ, հիդրոլիզացված կազեին 1 գ, նիտրիլոքացախաթթու 100 մկգ, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 60 մկգ, $MgSO_4$ 100 մկգ, NaCl 8 մկգ, KNO_3 103 մկգ, $NaNO_3$ 689 մկգ, Na_2HPO_4 111 մկգ, $FeCl_3$ 2.8 նգ, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 22 մկգ, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 մկգ, H_3BO_3 5 մկգ, $CuSO_4$ 160 նգ, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 250 նգ, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 460 նգ, ագար-ագար 20-30 գ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 8.2: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

19. Օրմերուդի սննդամիջավայր

KH_2PO_4 0.6 գ, K_2HPO_4 0.9 գ, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5-1.25 գ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 գ, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.075 գ, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.012 գ, խնձորաթթու 6 գ, ԷԴՏՔ

0.02 գ, միկրոտարրերի լուծույթ 1 մլ, բիոտին 15 մգ, թորած ջուր 1000 մլ, pH 6.8: Պինդ սննդամիջավայր ստանալու համար ավելացնել ագար-ագար 20 գ: Սննդամիջավայրը պատրաստել առանց բիոտինի և մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում: Բիոտինը մանրէազերծել ֆիլտրմամբ և մանրէազերծ պայմաններում ավելացնել հիմնական սննդամիջավայրին:

Միկրոտարրերի լուծույթ. H_3BO_3 280 մգ, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 210 մգ, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 24 մգ, $Ca(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 4 մգ, թորած ջուր 100 մլ:

20. Մաննինգի և Ջոնսոնի սննդամիջավայր

Սննդամիջավայրը կազմված է երեք բաղադրամասերից.

Ա) 300 մլ թորած ջրում լուծել $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 33.4 գ և 10 ն H_2SO_4-ով թթվեցնել մինչև pH 2: Մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

Բ) $(NH_4)_2SO_4$ 6 գ, KCl 0.2 գ, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 գ, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 0.02 գ, թորած ջուր 550 մլ, pH 3: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 15 րոպեի ընթացքում:

Գ) ագարոզ 7 գ, 150 մլ թորած ջուր: Մանրէազերծել ավտոկլավում 1 ամճ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

Բ և Գ լուծույթները պաղեցնել մինչև սենյակային ջերմաստիճան և մանրէազերծ պայմաններում խառնել, ապա ավելացնել Ա լուծույթը:

ՀԱՎԵԼՎԱԾ 2
Ներկանյութերի և ռեակտիվների բաղադրատոմսեր

1. Ֆուքսին հիմնային (հագեցած սպիրտային լուծույթ)

Ֆուքսին հիմնային 10 գ, 96% էթանոլ 100 մլ:

2. Ֆուքսին հիմնային կարբոլային (Ցիլի ֆուքսին)

Թարմ թորած ֆենոլի 5% ջրային լուծույթ 100 մլ, ֆուքսին հիմնային հագեցած սպիրտային լուծույթ 10 մլ: Պատրաստի խառնուրդը 48 ժ հետո ֆիլտրել: Ներկանյութն աչքի է ընկնում կայունությամբ:

3. Ֆուքսին հիմնային, ջրային լուծույթ

Ցիլի կարբոլային ֆուքսին 1 մլ, թորած ջուր 9 մլ: Ջրային ֆուքսինը կայուն չէ, հետևաբար պետք է պատրաստել օգտագործումից անմիջապես առաջ:

4. Մեթիլեն կապույտի հագեցած լուծույթ

Մեթիլեն կապույտ 3 գ, 96% էթանոլ 100 մլ: Լուծույթը թողնել 2-3 օր, խառնել, ապա ֆիլտրել:

5. Մեթիլեն կապույտ 1:40

Մեթիլեն կապույտի հագեցած սպիրտային լուծույթ 1 մլ, թորած ջուր 40 մլ:

6. Մեթիլեն կապույտ (ըստ Լյոֆլերի)

Մեթիլեն կապույտի հագեցած սպիրտային լուծույթ 30 մլ, թորած ջուր 100 մլ, 1% KOH-ի ջրային լուծույթ 1 մլ:

7. Գենցիանային մանուշակագույն կարբոլային

Լուծույթ 1. գենցիանային մանուշակագույն 1 գ, 96% էթանոլ 10 մլ:

Լուծույթ 2. թարմ թորած 5% ֆենոլի ջրային լուծույթ100 մլ:

Գենցիանային մանուշակագույնը լուծելուց հետո լուծույթները խառնել:

8. Բյուրեղային վիոլետի ջրային լուծույթ

Բյուրեղային վիոլետ 20 մգ, թորած ջուր 100 մլ:

9. Սաֆրանին, ջրային լուծույթ

2.5% սաֆրանինի լուծույթը 96% էթանոլում 10 մլ, թորած ջուր 100 մլ:

10. Ռեակտիվներ մտրակների ներկման համար.

Թուրմ: 12 գ տանինը տաքացնելով լուծել 48 մլ թորած ջրում, լուծույթին ավելացնել 30 մլ $FeSO_4$-ի հագեցած ջրային լուծույթ և 6 մլ ֆուքսինի հագեցած սպիրտային լուծույթ: Լուծույթը ֆիլտրել և պահել հղկված խցանով անոթում: Թուրմը պետք է օգտագործել պատրաստումից մի քանի օր հետո միայն և կարող է պահպանվել մի քանի ամիս:

Ներկանյութ: Ցիլի կարբոլային ֆուքսին և թորած ջուր 1:1 հարաբերությամբ:

Թուրմը և Ցիլի կարբոլային ֆուքսինը պատրաստել նախապես: Նոսրացված ֆուքսինը հարկավոր է պատրաստել օգտագործումից ոչ շատ առաջ: Աշխատանքից անմիջապես առաջ թուրմը և նոսրացված ֆուքսինը ֆիլտրել թղթե ֆիլտրով:

11. Ներկանյութեր լիպիդների հայտնաբերման համար

1. Սուդան III 0.5 գ, խիտ կաթնաթթու 100 մլ:

2. Սուդան սև B 0.3 գ, 70% տաք էթիլ սպիրտ 100 մլ:

Լուծույթները պահում են խցանված շշում 60°C-ում մի քանի ժամ, այնուհետև սառեցնել և ֆիլտրել:

12. Գրամի մշակմամբ Լյուգոլի լուծույթ

Բյուրեղային յոդ 1 գ, KI 2 գ, թորած ջուր 300 մլ: 30-50 մլ ծավալով հավանգի մեջ տեղադրել յոդի և KI-ի ճիշտ կշռված քանակությունները, խառնուրդը տրորել, ավելացնել 1 մլ թորած ջուր և, շարունակելով տրորել բյուրեղները, ավելացնել ևս 5 մլ ջուր: Յոդը լուծվում է KI-ի լուծույթում: Լուծույթը ամբողջությամբ տեղափոխել անոթի մեջ և ծավալը հասցնել 300 մլ-ի: Լուծույթը պահպանել մուգ տարայի մեջ, այն պիտանի է մինչև 30 օր:

13. Լյուգոլի լուծույթ գլիկոգենի և գրանուլյոզի հայտնաբերման համար

I_2 1 գ, KI 3 գ; թորած ջուր 300 մլ: Լուծույթը պատրաստել ինչպես նախորդը:

14. Թուղթ՝ ներծծված քացախաթթվային կապարի լուծույթով

Կտրատել ֆիլտրի թղթի կտորներ (0.2-0.4×5-6 սմ), ընկղմել դրանք 5% $Pb(CH_3COO)_2$-ի ջրային լուծույթի մեջ, չորացնել օդում, տեղադրել Պետրիի թասում և մանրէազերծել ավտոկլավում 0.5 ամմ պայմաններում 20 րոպեի ընթացքում:

15. Նեսլերի ռեակտիվ

Լուծույթ 1. 70 գ KI-ի և 100 գ HgI_2-ի նմուշները լուծել 400 մլ թորած ջրում:

Լուծույթ 2. 100 գ KOH-ի նմուշը լուծել 500 մլ թորած ջրում:

1 և 2 լուծույթները խառնել և ընդհանուր ծավալը հասցնել 1 լ-ի: Ընստվածքի առաջացման դեպքում վերին թափանցիկ շերտը հեռացնել: Լուծույթը պահպանել մուգ ապակյա տարայի մեջ:

16. Գրիսի ռեակտիվ

Լուծույթ 1. 0.5 գ սուլֆանիլաթթուն լուծել 30 մլ սառցաքացախաթթվի մեջ: Ավելացնել 100 մլ թորած ջուր և ֆիլտրել: Սուլֆանիլաթթվի լուծույթը կայուն է մինչև մեկ ամիս:

Լուծույթ 2. 0.1 գ α-նավթիլամինը լուծել 100 մլ եռացրած թորած ջրում: Պաղեցնել և ավելացնել 30 մլ սառցաքացախաթթու: α-նավթիլամինի լուծույթը ֆիլտրել և պահել մեկ շաբաթից ոչ ավել: Օգտագործումից անմիջապես առաջ այս լուծույթները խառնել հավասար ծավալներով:

17. Էրլիխի ռեակտիվ

Պարա-երկմեթիլամինոբենզալդեհիդ 1 գ, 96% էթանոլ 95 մլ, խիտ HCl 20 մլ: Էթանոլի փոխարեն կարելի է օգտագործել նաև իզոամիլ կամ ամիլ սպիրտ:

18. Օսլա-յոդային ռեակցիայում նիտրիտների հայտնաբերման համար ռեակտիվներ

Լուծույթ 1. Օսլա 0.4 գ, $ZnCl_2$ 2 գ, թորած ջուր 100 մլ: $ZnCl_2$ լուծել 10 մլ ջրում, եռացնել և ավելացնել օսլան: Ծավալը հասցնել 100 մլ և թողնել սենյակային ջերմաստիճանում մեկ շաբաթ: Այնուհետև ֆիլտրել և ավելացնել 100 մլ 0.2% KI-ի լուծույթ:

Լուծույթ 2. Խիտ HCl 16 մլ, թորած ջուր 84 մլ:

19. Քրոմային խառնուրդներ լաբորատոր պարագաների լվացման համար.

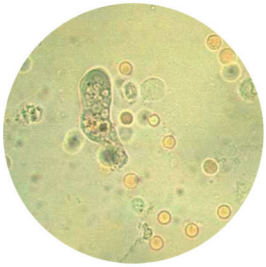
- Խիտ ծծմբական թթվին ավելացնել 5% փոշիացված բյուրեղային $K_2Cr_2O_7$ և ջրային բաղնիքում զգուշությամբ տաքացնել ճենապակյա թասի մեջ մինչև լուծվելը:
- 6 գ $K_2Cr_2O_7$ լուծել 100 մլ ջրում, այնուհետև լուծույթին զգուշությամբ ավելացնել 100 մլ ծծմբական թթու (խտությունը՝ 1.84):

Բազմակի օգտագործումից հետո քրոմային խառնուրդի մուգ նարնջագույն երանգը փոխվում է մինչև մուգ կանաչ: Այդպիսի խառնուրդն այլևս օժտված չէ լվացող հատկությամբ: Քրոմային խառնուրդով խորհուրդ չի տրվում լվանալ պարաֆինով, կերոսինով, հանքային յուղերով և նավթի թորման այլ արգասիքներով աղտոտված պարագաները:

Ուշադրություն: Քրոմային խառնուրդը քայքայում է բուսական և կենդանական ծագման հյուսվածքները, հետևաբար դրա հետ պետք է աշխատել շատ զգույշ: Եթե այն թափվել է ձեռքերի կամ հագուստի վրա, ապա վնասված հատվածը հարկավոր է անմիջապես լվանալ մեծ քանակությամբ ջրով, այնուհետև ամոնիակի կամ սոդայի նոսրացված լուծույթով և կրկին ջրով:

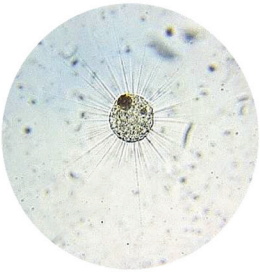
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 3

Էուկարիոտ մանրէներ

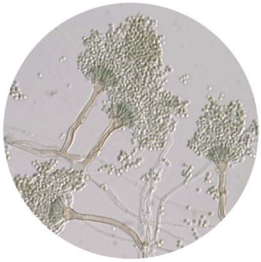


Entamoeba histolytica (400×)

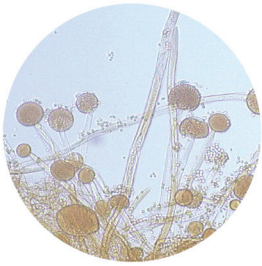
Paramicula caudatum (1000×)



Actinosphaerium sp. (1000×)

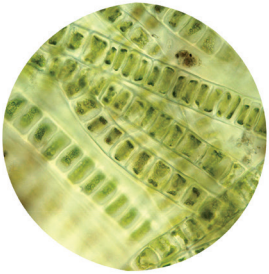


Aspergillus flavus (400×)



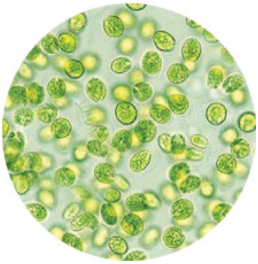
Mucor sp. (400×)

Candida albicans (400×)



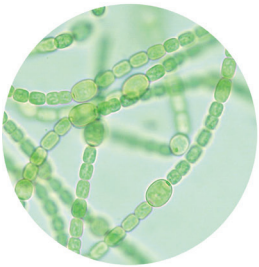
Ulothrix zonata (400×)

Volvox sp. (400×)

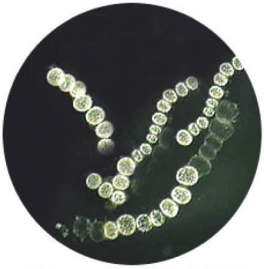


Chlorella sp. (400×)

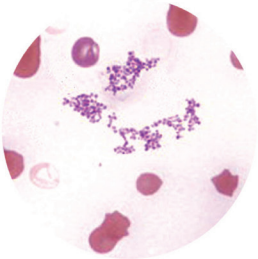
Բակտերիաներ



Nostoc azollae (1000×)

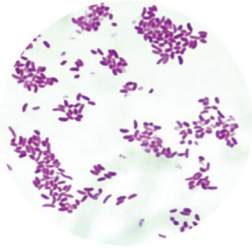


Thiomargarita namibiensis (100×)

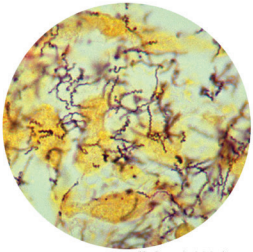


Mycoplasma haemofelis (1000×)

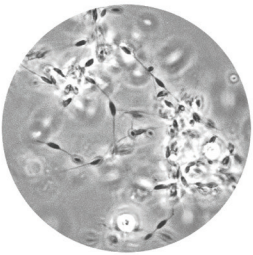
Corynebacterium diphtheriae (1000×)



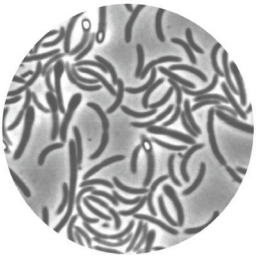
Vibrio cholera (1000×)



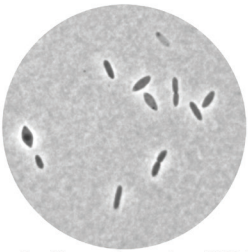
Treponema pallidum (1000×)



Rhodomicrobium vannielii (1000×)

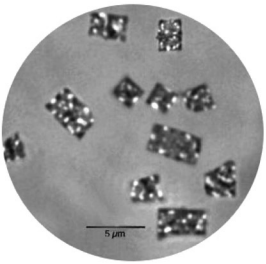


Desulfosporosinus auripigmentum (1000×)

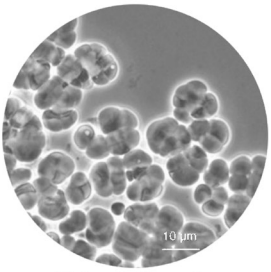


Desulfotomaculum arcticum (1000×)

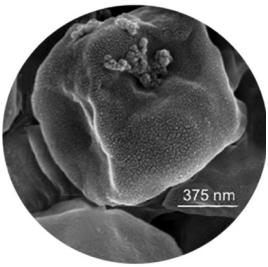
Արքեաներ



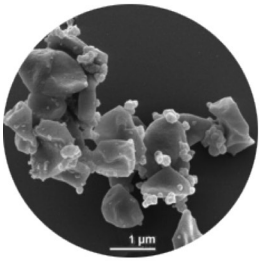
Haloquadra walsbyi



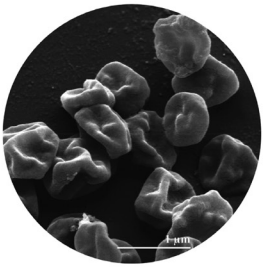
Methanosarcina acetivorans



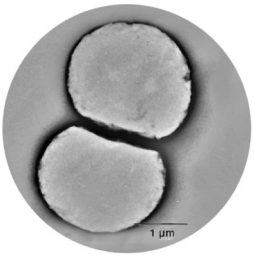
Sulfolobus solfataricus



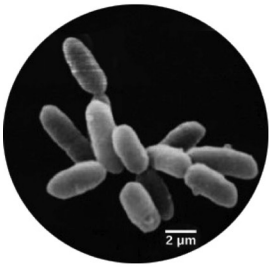
Archaeoglobus profundus



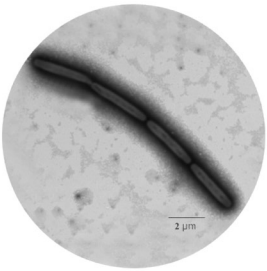
Ignisphaera aggregans



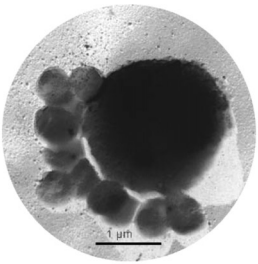
Picrophilus torridus



Halobacterium sp.

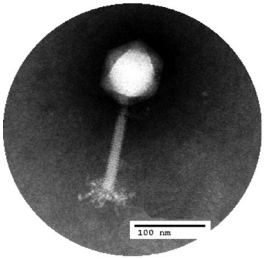


Methanopyrus kandleri

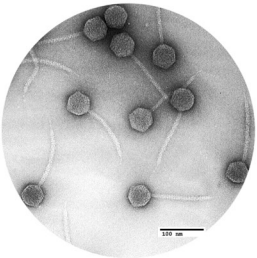


Ignicoccus sp.

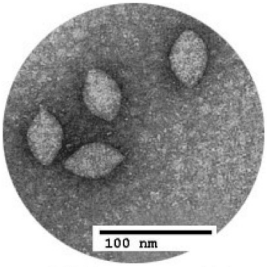
Վիրուսներ



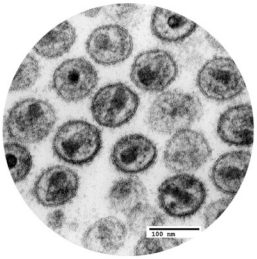
Բակտերիոֆագ T4



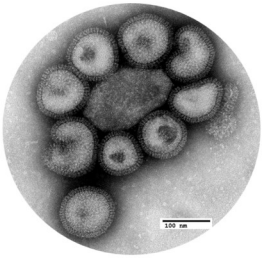
Բակտերիոֆագ λ



Sulfolobus tengcongensis-ի ֆագ *(Fuselloviridae)*

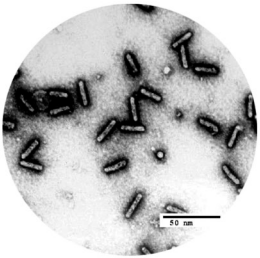


ՄԻԱՎ

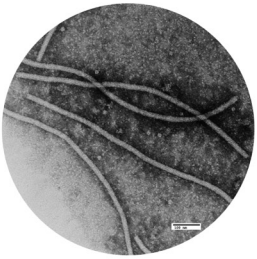


Գրիպի վիրուս

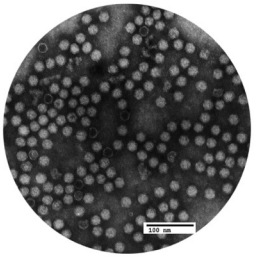
Կատաղության վիրուս



Ծխախոտի խճանկարային վիրուս



Կարտոֆիլի վիրուս (*Potyviridae*)



Սոյայի վիրուս (*Comoviridae*)

ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Դանիելյան Է. Ե., Բաբայան Կ. Ռ., Խաչոյան Վ. Ի., Դանիելյան Ա. Է. Մաշկային և սեռափոխանցվող հիվանդությունների լաբորատոր ախտորոշումը: Երևան, Լույս, 1997, 248 էջ:
2. Հակոբյան Ա. Ն., Մանրէակենսաբանության առարկայի լաբորատոր աշխատանքների կատարման ուսումնական ձեռնարկ: Երևան, Լիմուշ, 2008, 70 էջ:
3. Շեկոյան Վ., Մանուկյան Կ., Բժշկական մանրէաբանություն, վիրուսաբանություն և իմունաբանություն: Երևան, ԵՊԲՀ հրատարակչություն, 2009, 478 էջ:
4. Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Горнова И. Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Москва, ДеЛи принт, 2004, 144 с.
5. Егоров Н. С., Основы учения об антибиотиках. Москва, Издательство МГУ Наука, 2004, 525 с.
6. Еремина И. А., Кригер О. В., Лабораторный практикум по микробиологии. Кемерово, Издательство КТИПП, 2005, 112 с.
7. Избранные задачи большого практикума по микробиологии. Под ред. Егорова Н. С., Москва, Издательство МГУ, 1985, 72 с.
8. Калганова Т. Н., Практикум по микробиологии и биотехнологии, Южно-Сахалинск, СахГУ, 2011, 56 с.
9. Ленгелер Й., Древс Г, Шлегел Г., Современная микробиология: Прокариоты. Изд. Мир. В 2 т., 2005.
10. Методы общей бактериологии. В 3-х томах. Под ред. Ф. Герхарда и др., Москва, Мир, 1983.
11. Пименова М. Н., Гречушкина Н. И., Азова А. Г., Семенова Е. В., Мыльникова С. И., Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Под. ред. Егорова Н. С., Москва, Издательство МГУ, 1983, 224 с.
12. Пиневич А. В., Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т., СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2007.
13. Поздеев О. К., Медицинская микробиология, Москва, Геотар-Мед, 2001, 765 с.
14. Практикум по микробиологии. Под ред. Нетрусова А. И., Москва, Академия, 2005, 606 с.
15. Прунтова О. В., Сахно О. Н., Лабораторный практикум по общей микробиологии, Владимир, Изд-во ВлГУ, 2005, 77 с.
16. Сиротин А. А., Практикум по микробиологии. Белгород: Изд-во

БелГУ, 2007, 80 с.
17. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И., Практикум по микробиологии. Москва, Дрофа, 2004, 256 с.
18. Хоулот Дж, Криг Н., Снит П, Стейли Дж, Уильямс С., Определитель бактерий Берджи. В 2т., 1997.
19. Alexander S. K., Strete D., Niles M. J. ,Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. New York, The McGrow-Hill Companies, 2003, 384 p.
20. Benson H. J., Microbiological Applications: Lab. Manual. Plainview NY, The McGrow-Hill Companies, 8th Edition, 2001, 455p.
21. Black J. G., Black L. J., Microbiology principles and explorations. 8th ed. John Wiley & Sons, 2012, 851 p.
22. Brock Biology of Microorganisms. Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P., 13th ed., Pearson, 2012, 1152 p.
23. Carter J. and Saunders V. Virology: Principles and Applications. John Wiley & Sons Ltd, 2007, 358 p.
24. Harley J. P., Prescott L. M., Laboratory Exercises in Microbiology. 5th edition. New York, The McGraw–Hill Companies. 2002, 466 p.
25. Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M., Color Atlas Medical Microbiology, Thieme Stuttgart, New York, 2005, 724 p.
26. Madigan M. T. Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D.P. Brock Biology of Microorganisms. 13th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2012, 1043 p.
27. Practical handbook of microbiology. Eds, Goldman E. and Green L. H. 2nd ed. CRC Press. Taylor & Francis Group, 2009, 854 p.
28. Prescott H. K., Lansing M. P., John P. H., Donald A. K., Microbiology. Sixth edition. New York, McGraw-Hill Companies, 2005, 992 p.
29. Steve K. A. Dennis S. Mary J. N., Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. Spiral Bound/Comb. 2004, 384 p.
30. Tortora G. J., Funke B. R., Case Ch. L., Microbiology: An introduction. 11th ed., Pearson/Benjamin Cummings, 2013, 811 p.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՄԱՍ ԱՌԱՋԻՆ
ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ ԵՎ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ
ԳԼՈՒԽ 1
ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՀԱՄԱՌՈՏ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ 3
ԳԼՈՒԽ 2
ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅԻ ԿԱՀԱՎՈՐՈՒՄԸ ԵՎ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐԻԱՅՈՒՄ ԱՇԽԱՏԵԼՈՒ ԿԱՆՈՆՆԵՐԸ 10
Մանրէաբանական լաբորատորիայի նախապատրաստումը աշխատանքի 12
Մանրէների կուլտուրաների հետ աշխատանքի կանոնները 14
Փորձնական արդյունքների գրանցումներ 20
ԳԼՈՒԽ 3
ՍՆՆԴԱՄԻՋԱՎԱՅՐԵՐ ԵՎ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԱՃԵՑՈՒՄԸ 21
Մանրէների աճեցման համար կիրառվող սննդամիջավայրեր 21
Մանրէների աճեցման պայմանները 30
Մանրէների աճեցման օրինաչափությունները: Աճի կոր 41
Մանրէների աճեցման եղանակները 45
ԳԼՈՒԽ 4
ՄԱՆՐԷԱԶԵՐԾՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ 48
Սննդամիջավայրերի մանրէազերծում 48
Ապակյա ամանեղենի մանրէազերծումը 59
Լաբորատոր գործիքների և պարագաների մանրէազերծումը 60
ԳԼՈՒԽ 5
ՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿՆԵՐ, ՄԱՆՐԱԴԻՏԱԿՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐ 65
HumanScope Light մակնիշի երկփողյա լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը 65
Մանրադիտակի հետ աշխատանքի կանոնները 69
Մանրադիտակային հետազոտումը մութ տեսադաշտում 71
Մանրադիտակում փուլացայտերանգային հարմարանքի օգնությամբ 72
Լուսարձակային մանրադիտակում 77
Կոնֆոկալ լազերային սքանավորող մանրադիտակում 79
Մանրէների ուսումնասիրությունը լուսային մանրադիտակմամբ 81
Մանրէների կենդանի պատրաստուկներ 82
Մանրէների ֆիքսված պատրաստուկներ 86
Մանրէների չափսերի որոշումը 88
Էլեկտրոնային տրանսմիսիոն, սքանավորող և սքանավորող զոնդային մանրադիտակում 92

ԳԼՈՒԽ 6
ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՄԱՔՈՒՐ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՍԱՑՈՒՄԸ 95
Կուտակիչ կուլտուրայի ստացում 95
Մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը 99
Մաքուր կուլտուրայի անջատումը միայնակ գաղութից 99
Մաքուր կուլտուրայի մեկուսացումը մեկ բջջից 104
Մեկուսացված կուլտուրայի մաքրության որոշումը 105
Մանրէների թվաքանակի որոշման մեթոդները 107
Մանրէային բջիջների թվաքանակի որոշումը մանրադիտակով 107
Բջիջների թվաքանակի հաշվարկումը հաշվիչ
խցիկների կիրառմամբ 108
Մանրէների ուղղակի հաշվարկման մազանոթային մեթոդ 109
Բջիջների հաշվարկը մշտական (ներկված) պատրաստուկում
(Վինոգրադսկու-Բրիդի մեթոդ) 111
Թաղանթային ֆիլտրերի օգնությամբ բջիջների հաշվարկում 112
Մանրէների թվաքանակի որոշումը սննդամիջավայրերում
ցանքի մեթոդով 114
Մանրէների թվաքանակի որոշումը պինդ սննդամիջավայրերի
վրա ցանքի մեթոդով (Կոխի մեթոդով) 115
Բջիջների թվաքանակի որոշումը հեղուկ սննդամիջավայրերում
ցանքի մեթոդով (սահմանային նոսրացումների մեթոդ) 119
Կենսազանգվածի որոշումը կշռելով 122
Բջիջների թվաքանակի և կենսազանգվածի որոշումը
պղտորաչափական մեթոդով 125
Հոսքային բջջաչափման մեթոդ 127
ԳԼՈՒԽ 7
**ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՅԻՆ, ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԵՎ
ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ 129**
Կուլտուրային հատկությունները 129
Աճը պինդ սննդամիջավայրերի վրա 129
Աճը հեղուկ սննդամիջավայրում 133
Ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունները 134
Ածխածնի միացությունների յուրացումը 134
Ազոտի միացությունների յուրացումը 139
Ազոտ պարունակող օրգանական նյութերի յուրացումը 139
Ազոտի հանքային միացությունների յուրացումը 143
Մոլեկուլային ազոտի յուրացումը 144
Մոլեկուլային թթվածնի նկատմամբ մանրէների վերաբերմունքը և
աճը անաերոբ պայմաններում 145
Դենիտրիֆիկացման ունակությունը 147
Խմորման ունակության որոշումը 149

Արտաբջջային ֆերմենտներ սինթեզելու որոշումը.....150
Հակաբիոտիկների առաջացումը 154
Մանրէների հակաբիոտիկային ակտիվության որոշումը 154
Հակաբիոտիկային նյութերի նկատմամբ մանրէների
զգայունության որոշումը 158
ԳԼՈՒԽ 8
ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ 160
Մանրէների պահպանումը սննդամիջավայրում պարբերական
փոխսացանքերով 161
Մանրէների պահպանումը հանքային յուղում 163
Մանրէների պահպանումը լիոֆիլացմամբ 164
Մանրէների պահպանումը ցածր և գերցածր
ջերմաստիճաններում 166
Մանրէների պահպանումը գլիցերոլում 167
Մանրէների պահպանումը թորած ջրում կամ նատրիումի
քլորիդի 1% լուծույթում 168
Մանրէների պահպանումը մակակլանիչների վրա 168
Մանրէների կենսունակության գնահատումը երկարատև
պահպանումից հետո 169

ՄԱՍ ԵՐԿՐՈՐԴ
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ 170
Թեմա 1
Մանրէների ուսումնասիրության մանրադիտակային մեթոդներ
Աշխատանք 1
Մանրադիտակներ, լուսային մանրադիտակի կառուցվածքը:
Մանրէների կենդանի պատրաստուկներ 170
Առաջադրանք 1
Ծանոթացում լուսային մանրադիտակի կառուցվածքին:
Տիղմի կենդանի պատրաստուկի պատրաստում ճզմված
կաթիլի մեթոդով.....170
Առաջադրանք 2
Spirulina platensis մանրէի կենդանի պատրաստուկի
պատրաստում ճզմված կաթիլի մեթոդով.....172
Առաջադրանք 3
Azotobacter chroococcum մանրէի ճզմված կաթիլի
մեթոդով պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը
լուսային մանրադիտակով փուլացայտերանգային հարմարանքի
օգնությամբ 174
Առաջադրանք 4
Rhodospirillum rubrum մանրէի ճզմված կաթիլի մեթոդով
պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը լուսային
մանրադիտակով փուլացայտերանգային հարմարանքի
օգնությամբ 176

Աշխատանք 2
Մանրէների կենդանի պատրաստուկների պատրաստում մատնահետքերի մեթոդով և պատրաստուկների մանրադիտակում 178
Առաջադրանք 1
Streptomyces roseosporus մանրէի մատնահետքերի մեթոդով պատրաստված պատրաստուկի մանրադիտակումը լուսային մանրադիտակով 178
Աշխատանք 3
Մանրէների ֆիքսված (կամ մշտական) պատրաստուկներ: Մանրէների ձևաբանության ուսումնասիրությունը 181
Առաջադրանք 1
Enterococcus faecium մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 183
Առաջադրանք 2
Neisseria gonorrhoeae մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի մանրադիտակում 185
Առաջադրանք 3
Streptococcus thermophilus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 187
Առաջադրանք 4
Micrococcus luteus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 189
Առաջադրանք 5
Staphylococcus aureus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 191
Առաջադրանք 6
Escherichia coli մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 193
Առաջադրանք 7
Salmonella typhimurium մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 195
Առաջադրանք 8
Pseudomonas aeruginosa մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 197
Առաջադրանք 9
Bacillus subtilis մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում..... 199
Առաջադրանք 10
Clostridium botulinum մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 201
Առաջադրանք 11
Mycobacterium tuberculosis մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի մանրադիտակում 203

Առաջադրանք 12
Thermus scotoductus մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 205
Առաջադրանք 13
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 207
Առաջադրանք 14
Bifidobacterium bifidum մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 209
Առաջադրանք 15
Leptospirillum sp. մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 211
Առաջադրանք 16
Methanospirillum hungatei մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 213
Առաջադրանք 17
Haloarcula japonica մանրէի ֆիքսված պատրաստուկի պատրաստում պարզ ներկման մեթոդով և մանրադիտակում 215
Աշխատանք 4
Մանրէների համակեցությունների կազմի ուսումնասիրությունը մանրադիտակային մեթոդներով 217
Առաջադրանք 1
Մածնի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը.....217
Առաջադրանք 2
Բերանի միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը.....219
Աշխատանք 5
Տարբերակիչ ներկմամբ ֆիքսված պատրաստուկների պատրաստման մեթոդներ.....221
Առաջադրանք 1
Բակտերիաների ներկումն ըստ Գրամի 221
Առաջադրանք 2
B. subtilis-ի էնդոսպորների ներկումը Պեշկովի մեթոդով 225
Առաջադրանք 3
A. chroococcum-ի պատիճի ներկումը Հինսի մեթոդով.....228
Առաջադրանք 4
B. subtilis-ի մտրակների ներկումը Պեշկովի մշակմամբ Լյոֆլերի մեթոդով.....230
Աշխատանք 6
Բջջային ներառուկների ուսումնասիրության մանրադիտակային մեթոդներ 233

Առաջադրանք 1
Գլիկոգենային ներառուկների հայտնաբերումը *S. cerevisiae*-ի բջիջներում 234
Առաջադրանք 2
Լիպիդային ներառուկների հայտնաբերումը *B. megaterium*-ի բջիջներում 236
Առաջադրանք 3
Պոլիֆոսֆատների հայտնաբերումը *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*-ի բջիջներում 238
Առաջադրանք 4
Հարսպորային ներառուկների հայտնաբերումը *B. thuringiensis* -ի բջիջներում 240
Թեմա 2
Մանրէների աճեցման և մաքուր կուլտուրայի մեկուսացման մեթոդներ
Աշխատանք 1
Սննդամիջավայրերի պատրաստում և մանրէազերծում 241
Առաջադրանք 1
Սննդամիջավայրերի և անհրաժեշտ պարագաների մանրէազերծում 241
Աշխատանք 2
Էլեկտիվ սննդամիջավայրերի պատրաստում: Մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացում 243
Առաջադրանք 1
Աերոբ էնդոսպոր առաջացնող մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացումը 243
Առաջադրանք 2
Աերոբ դիազոտորֆ կամ ազոտ ֆիքսող մանրէների կուտակիչ կուլտուրայի ստացումը 244
Աշխատանք 3
Մանրէների մաքուր կուլտուրաների մեկուսացում 245
Առաջադրանք 1
Աշխատանք 2-ում ստացված կուտակիչ կուլտուրաների մանրադիտակային հետազոտությունը և մաքուր կուլտուրայի ստացումը Ռ. Կոխի և նոսրացող գծերի մեթոդով 245
Աշխատանք 4
Օդային ավազանի միկրոբիոտայի ուսումնասիրություն 247
Առաջադրանք 1
Փակ տարածքների օդի մանրէաբանական կազմի որոշումը նստեցման (սեդիմենտացիայի) մեթոդով 248
Աշխատանք 5
Ջրային էկոհամակարգերի միկրոբիոտայի ուսումնասիրություն 249

Առաջադրանք 1
Գետի ջրի մանրէաբանական կազմի որոշումը Կոխի մեթոդով.....249
Աշխատանք 6
Մանրէների կուլտուրային և ձևաբանական հատկանիշների
բնութագրում 251
Առաջադրանք 1
Գաղութների նկարագրություն և մանրադիտակային հետազոտում.....251
Թեմա 3
Մանրէների քանակական հաշվարկման մեթոդներ
Աշխատանք 1
Մանրէների թվաքանակի որոշում Կոխի մեթոդով.....253
Առաջադրանք 1
S. cerevisiae-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը
Կոխի մեթոդով (տե՛ս գլուխ 6) 253
Աշխատանք 2
Մանրէների թվաքանակի որոշում պղտորաչափական մեթոդով.....255
Առաջադրանք 1
S. cerevisiae-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը
սպեկտրալուսաչափական եղանակով 255
Աշխատանք 3
Մանրէների թվաքանակի որոշում Գորյաևի-Տոմի
խցիկի կիրառմամբ 256
Առաջադրանք 1
S. cerevisia-ի կախույթում բջիջների թվի որոշումը Գորյաևի-Տոմի
խցիկի կիրառմամբ 256
Թեմա 4
Մանրէների կենսաքիմիական հատկությունների
ուսումնասիրության մեթոդներ
Աշխատանք 1
Մանրէների հիդրոլազային ֆերմենտների ուսումնասիրությունը.....257
Առաջադրանք 1
Լիպազային ակտիվության որոշումը 258
Առաջադրանք 2
Ամիլազային ակտիվության որոշումը.....260
Առաջադրանք 3
Կազեինալիտիկ և ժելատինազային ակտիվության որոշումը 262
Թեմա 5
Մանրէների փոխհարաբերության ձևերի և հակաբիոտիկների
նկատմամբ զգայունության ուսումնասիրության մեթոդներ
Աշխատանք 1
Մանրէների փոխհարաբերության ձևերի ուսումնասիրությունը.....265

Առաջադրանք 1
Մանրէների միջև հակագոնիզմի ուսումնասիրությունը
փոխուղղահայաց գծային ցանքի մեթոդով 266
Աշխատանք 2
Հակաբիոտիկների նկատմամբ մանրէների զգայունության
որոշումը 267
Առաջադրանք 1
Մանրէների զգայունության որոշումը տարբեր
հակաբիոտիկների նկատմամբ 267
Թեմա 6
Սանիտարամանրէաբանական հետազոտության մեթոդներ
Աշխատանք 1
Ջրի սանիտարամանրէաբանական հետազոտության մեթոդներ 269
Առաջադրանք 1
Ջրում մանրէների ընդհանուր թվի որոշումը, ջրի կոլի-տիտրի և
կոլի-ինդեքսի որոշումը երկփուլ խմորման մեթոդով 270
Առաջադրանք 2
Ջրի կոլի-տիտրի և կոլի-ինդեքսի որոշումը թաղանթային ֆիլտրերի
մեթոդով 274
Թեմա 7
Բակտերիաֆագերի աճեցման և քանակական վերլուծության մեթոդներ
Աշխատանք 1
Տ-զույգ բակտերիաֆագերի աճեցումը 276
Առաջադրանք 1
Տ4 ֆագի կախույթի ստացումը *E. coli* տեր բջիջների կիրառմամբ 278
Առաջադրանք 2
Ֆագի որակական վերլուծությունը կաթիլային եղանակով 279
Առաջադրանք 3
Բակտերիաֆագի տիտրումը ագարային շերտերի մեթոդով 280
ԹԵՍՏԵՐ ԵՎ ԱՌԱՋԱԴՐԱՆՔՆԵՐ 282
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 1
Սննդամիջավայրեր 293
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 2
Ներկանյութերի և ռեակտիվների բաղադրատոմսեր 298
ՀԱՎԵԼՎԱԾ 3 301
ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ 305

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

**ԹՌՉՈՒՆՅԱՆ Ա. Հ., ՓԱՆՈՍՅԱՆ Հ. Հ., ԲԱՉՈՒԿՅԱՆ Ի. Լ.,
ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ Ա. Ա., ՊՈՊՈՎ ՅՈՒ. Գ.**

ՄԱՆՐԷԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ

Համակարգչային ձևավորող՝ Կ. Չալաբյան
Կազմի ձևավորող՝ Ա. Պատվականյան
Տեխ. խմբագիր՝ Լ. Հովհաննիսյան
Սրբագրիչ՝ Վ. Դերձյան

Չափսը՝ 60x84 $^{1}/_{16}$: Տպ. մամուլը՝ 19.75:
Տպաքանակը՝ 100 օրինակ:

ԵՊՀ հրատարակչություն

ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1

ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 2014