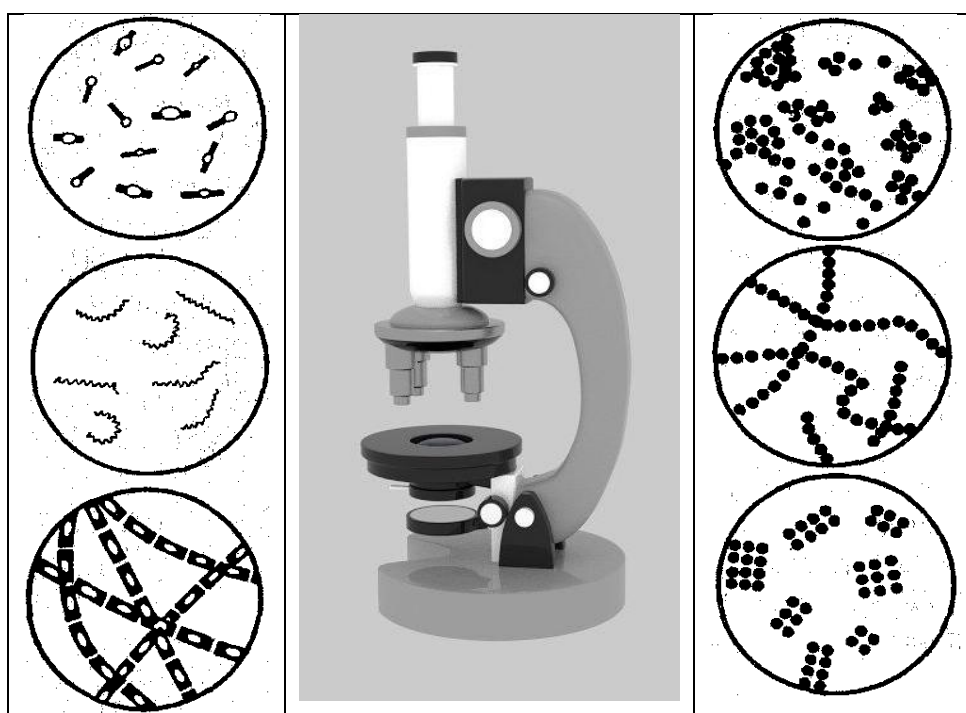


**Міністерство освіти і науки України**  
**Національний університет «Чернігівська політехніка»**  
**ІНІ бізнесу, природокористування і туризму**  
Кафедра аграрних технологій та лісового господарства

## АГРОНОМІЯ

Методичні вказівки  
до виконання лабораторних робіт з мікробіології для студентів ІІ  
курсу з спеціальності 201 «Агрономія»



**ЗАТВЕРДЖЕНО**  
на засіданні кафедри  
аграрних технологій та лісового  
господарства  
протокол №1 від 01.08.2020

Чернігів 2020

Агрономія Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з мікробіології для студентів II курсу з спеціальності 201 «Агрономія» / Укл.: к.с.-г.н. Шевченко Л.А., к.е.н. Кудряшова К.М., к.е.н. Рябуха Г.І. Чернігів: НУ «Чернігівська політехніка», 2020. 38 с.

Укладачі: ШЕВЧЕНКО ЛЮБОВ АНАТОЛІЇВНА, доцент кафедри аграрних технологій та лісового господарства, кандидат сільськогосподарських наук;  
КУДРЯШОВА КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА, доцент кафедри аграрних технологій та лісового господарства, кандидат економічних наук;  
РЯБУХА ГАЛИНА ІГОРІВНА, доцент кафедри туризму, кандидат економічних наук

Відповідальний за випуск: Шевченко Л.А., доцент кафедри аграрних технологій та лісового господарства, кандидат сільськогосподарських наук

Рецензент: Волкогон В. В. , доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН

## ЗМІСТ

<b>Лабораторна робота №1.</b> Будова мікроскопа. Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів.....	04
<b>Лабораторна робота №2.</b> Мікроскопічне вивчення основних форм бактерій. Особливості будови та функціонування бактеріальної клітини.....	09
<b>Лабораторна робота №3.</b> Будова дріжджової клітини та виявлення запасних речовин. Дослідження міцеліальних грибів.....	16
<b>Лабораторна робота №4.</b> Методи стерилізації. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.....	20
<b>Лабораторна робота №5.</b> Дослідження мікробіоти ґрунту. Кількісний облік мікроорганізмів шляхом підрахунку колоній (чашковий метод Коха).....	25
<b>Лабораторна робота №6.</b> Мікробіологічні методи дослідження ґрунту. Якісний аналіз.....	28
<b>Лабораторна робота №7.</b> Дослідження епіфітної мікробіоти рослин.....	32
<b>Лабораторна робота №8.</b> Фітопатогенні мікроорганізми – збудники захворювань рослин.....	35
<b>Бібліографія.....</b>	38

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

### **Тема. Будова мікроскопа. Методи мікроскопічного дослідження мікроорганізмів**

**Мета.** Ознайомитися з будовою та основними правилами роботи з світловим мікроскопом. Навчитися виготовляти тимчасові препарати культур мікроорганізмів для вивчення під мікроскопом.

*Матеріали та обладнання:* мікроскопи, спиртівки, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, піпетки, штативи для пробірок, пробірки з стерильною водою, фільтрувальний папір, об'єкт для мікроскопування (розсіл з квашених овочів або білий йогурт).

### **ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ**

Основним інструментом для вивчення будови бактеріальної клітини є мікроскоп. Світловий мікроскоп – це складний оптичний прилад, призначений для вивчення дрібних предметів, організмів і структур тканин, тобто таких об'єктів, яких не видно неозброєним оком. Сучасний мікроскоп забезпечує можливість вивчати об'єкти в променях світла, що проходить крізь систему лінз та об'єкт, проводити фазово-контрастну, люмінесцентну, інтерференційно-поляризаційну та інші види мікроскопічних досліджень.

Основними елементами конструкції світлових мікроскопів є механічна (штатив, предметний столик, тубус) й оптична (об'єктив, окуляр) частини та система освітлення.

Основні характеристики об'єктива – збільшення і апертура. Від апертури об'єктива залежить роздільна здатність оптичного мікроскопа. Для збільшення апертури об'єктива заповнюють простір між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом імерсійною речовиною, яка має  $n > 1$ . Наприклад, показник заломлення води становить 1,33, гліцерину – 1,47, кедрової олії – 1,51.

Окуляр складається, як правило, з двох лінз: одна з них направлена до об'єкта, а друга – до ока. Вибір окулярів для роботи залежить від типу об'єктива, який використовується в роботі. Окуляри відрізняються за збільшенням та будовою.

Система освітлення оптичного мікроскопа складається з конденсора, дзеркала та джерела світла. Вона призначена для найкращого освітлення препарату. Конденсор закріплений над дзеркалом і складається з декількох лінз. Він збирає паралельні промені, відбиті дзеркалом від джерела світла в одній точці – фокусі, який має міститися в площині препарату. Конденсор разом з оправою може вертикально переміщатися в межах 20 мм за допомогою спеціального гвинта. Дзеркало, увігнуте з одного боку і плоске з іншого, закріплене в основі штатива.

Роздільна здатність оптичного мікроскопа – це та найменша відстань між двома крапками (чи рисками), за якою вони спостерігаються роздільно (не зливаються).

Загальне збільшення мікроскопа ( $V$ ) визначається добутком збільшення об'єктива ( $V_{об.}$ ) на збільшення окуляра ( $V_{ок.}$ ):  $(V) = V_{об.} \times V_{ок.}$

Для повного використання роздільної здатності мікроскопа і найкращого розглядання об'єкта необхідно використати оптимальне сполучення об'єктива й окуляра, яке дає так зване *корисне збільшення*. Установлено, що корисне збільшення мікроскопа не може перевищувати числову апертуру об'єктива більш як у 1000 разів. Виходячи з корисного

збільшення, підбирають окуляр, який оптимально відповідає даному об'єктиву.

У цілому, коли йдеться про мікроскопію у світловому полі, то роздільна здатність сучасного оптичного мікроскопа становить 0,2 мкм.

### ОСНОВНІ ПРАВИЛА РОБОТИ З МІКРОСКОПОМ

1. Розмістити мікроскоп (тримаючи обома руками за основу та тубусотримач) на робочому столі за 5-10 см від краю. Протерти лінзи окуляру та об'єктиву м'якою серветкою.
2. Підняти тубус. Покласти підготовлений мікропрепарат на предметний столик мікроскопа і затиснути його клемми.
3. Встановити обертанням револьвера необхідний об'єктив (8×, 40×). Під час роботи з об'єктивом 90×, який призначений для роботи під імерсією (має темну смужку), на препарат нанести краплю кедрової олії або гліцерину.
4. Дивлячись збоку, обережно, за допомогою макрогвинта, опустити тубус мікроскопа до тих пір, поки об'єктив не буде на відстані 4-5 мм від препарату (або так, щоб лінза об'єктива занурилась в імерсійну рідину).
5. Дивлячись в окуляр, дуже повільно піднімати тубус за допомогою макрогвинта, поки в полі зору не з'явиться зображення досліджуваного об'єкта.
6. Для отримання чіткого зображення використовують мікрометричний гвинт.
7. При необхідності вивчення різних ділянок мікропрепарату переміщують предметний столик гвинтами або сам препарат на столику.
8. Після завершення роботи зняти мікропрепарат з предметного столика, перевести мікроскоп на мале збільшення. У разі використання імерсійного об'єктива зняти серветкою кедрову олію чи гліцерин. Накрити мікроскоп захисною плівкою.

**Увага!** Під час роботи мікроскоп не рухати.

### Завдання 1

Ознайомитися з будовою мікроскопа та правилами роботи з ним. Зробити дописи до малюнку 1 та заповнити таблицю 1 та 2.

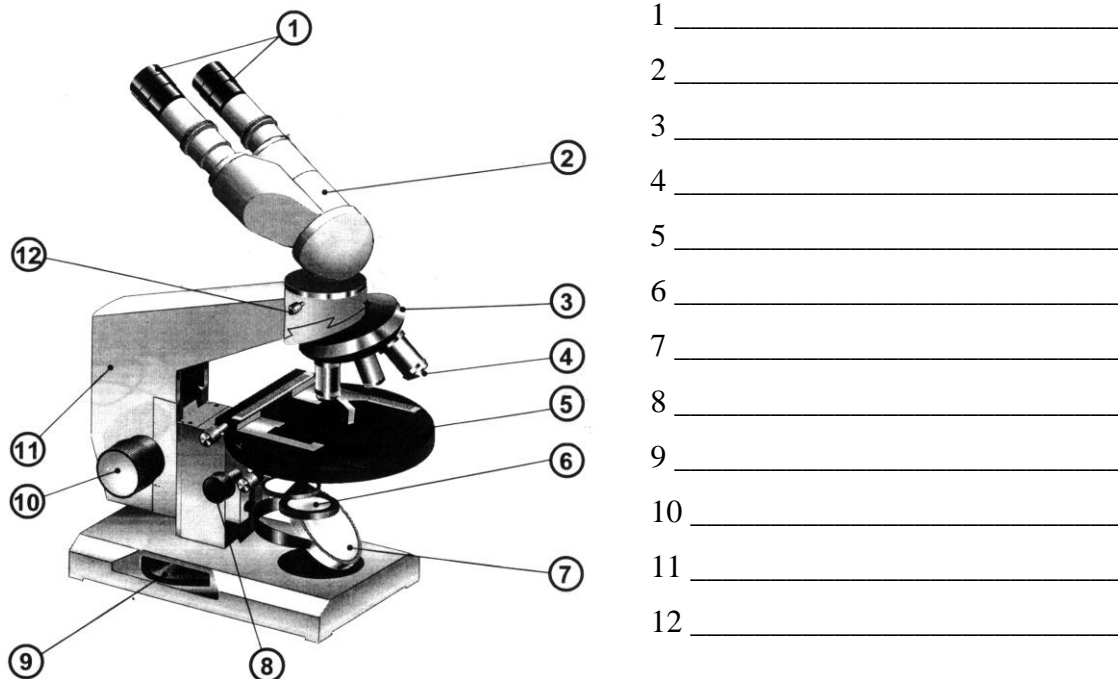


Рис. 1. Загальний вигляд мікроскопа

Таблиця 1. Будова мікроскопа

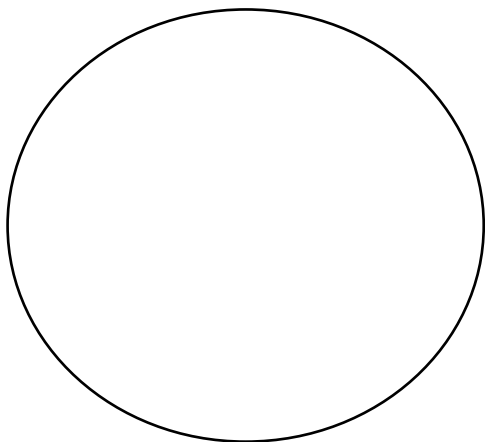
Система	Складова частина	Призначення
Механічна	Тубус	
	Револьвер	
	Підошва	
	Предметний столик	
	Макрогвинт	
	Мікрогвинт	
	Гвинт конденсора	
Оптична	Окуляр	
	Об'єктив	
	Дзеркало	
	Конденсор	
	Діафрагма	

Таблиця 2. Порівняння світлового та електронного мікроскопів

Параметри	Світловий мікроскоп	Електронний мікроскоп
Джерело випромінювання		
Довжина хвилі		
Максимальне корисне збільшення		
Максимальна роздільна здатність		
Лінзи		
Об'єкт		
Барвники		
Зображення		

Завдання 2

Виготовити тимчасовий мікропрепарат «волокно вати в краплі води». Розглянути мікропрепарат при малому збільшенні мікроскопа. Замалювати вигляд побаченого об'єкта.



*Рис. 2. Волокно вати в краплі води*

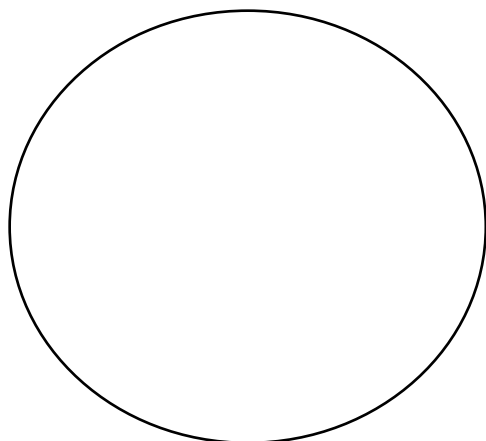
Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення об'єктиву \_\_\_\_\_; окуляру \_\_\_\_\_

Загальне збільшення мікроскопа \_\_\_\_\_

Завдання 3

З розсолу квашених овочів або білого йогурту виготовити препарат «роздавлена крапля», розглянути під мікроскопом (об'єктив 40×) і замалювати.



*Рис. 3. \_\_\_\_\_*

Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення об'єктиву \_\_\_\_\_; окуляру \_\_\_\_\_

Загальне збільшення мікроскопа \_\_\_\_\_

Висновок: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_



*Самостійна теоретична підготовка:*

1. З яких основних частин складається світловий мікроскоп?
2. Які правила користування світловим мікроскопом?
3. Як визначити загальне збільшення та роздільну здатність світлового мікроскопа?
4. Етапи мікроскопії препаратів мікроорганізмів.
5. Наведіть принципи фазово-контрастної, люмінесцентної та електронної мікроскопії та приклади їх застосування.



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

### Тема. Методи мікроскопічних досліджень бактерій. Морфологія бактерій

Мета. Ознайомитися з морфологічними особливостями будови бактеріальної клітини. Навчитися виготовляти різні типи препаратів для мікроскопування.

*Матеріали та обладнання:* мікроскопи, спиртівки, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, пробірки з культурою мікроорганізмів, фільтрувальний папір, фарбник, штатив для предметних скелець.

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для вивчення мікроорганізмів за допомогою світлового мікроскопа виготовляють мікропрепарат з суспензії мікробних культур або культури вирощеної на твердому живильному середовищі. Для приготування препаратів живих мікроорганізмів необхідні предметні та накривні скельця очищені й знежирені (так, щоб крапля води рівномірно розтікалася по їхній поверхні). Тому перед виготовленням мікропрепарату предметне скельце протирають марлею або стерилізують його у полум'ї спиртівки. Після охолодження наносять краплину суспензії мікробної культури або виготовляють мазок.

У мікробіологічній практиці для дослідження мікроорганізмів використовують препарати «роздавлена крапля», «висяча крапля», «відбиток» та препарати фіксованих забарвлених клітин.

**Виготовлення мазка.** На предметне скельце наносять петлею невеличку кількість досліджуваного матеріалу і розмазують його по склу тоненьким шаром (рис. 4).

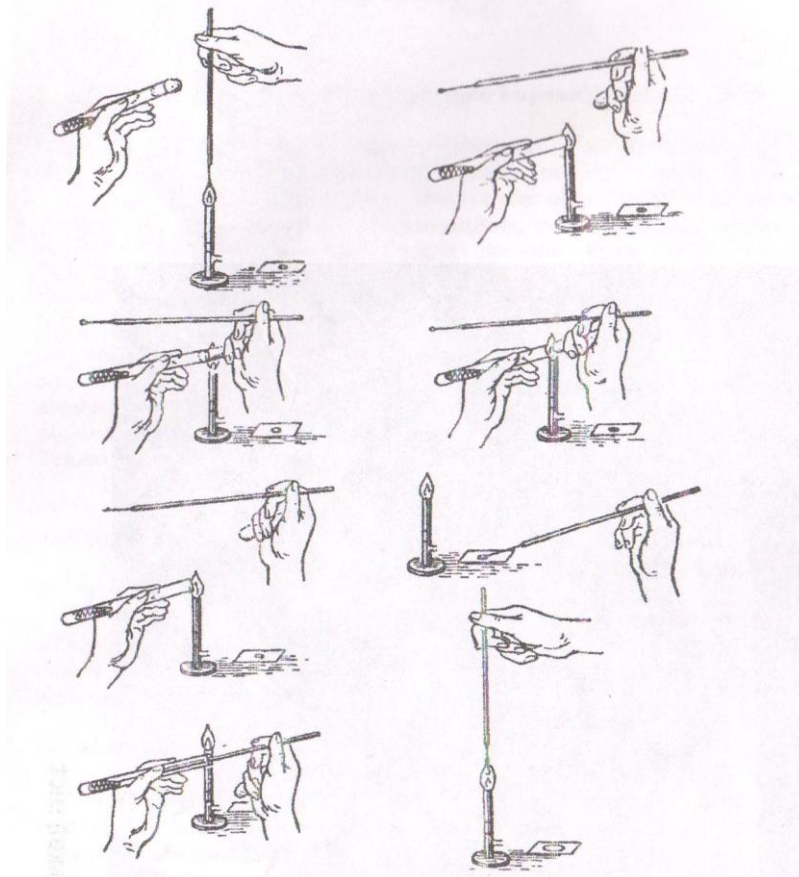


Рис 4. Схема послідовності відбору проби та виготовлення мікропрепарату

Скельце з виготовленим мазком розміщують на спеціальному штативі (рис. 5) зі скляних трубочок і висушують за кімнатної температури.

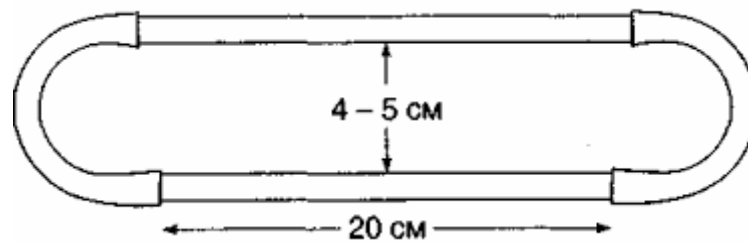


Рис. 5. Штатив для предметних скелець

**Фіксація мазка** проводиться з метою вбити мікроби, прикріпити їх до скла і зробити чутливішими до фарби. Найзручніше робити фіксацію мазка у полум'ї спиртівки. Для цього предметне скло тримають між великим і вказівним пальцями мазком догори і 3–4 рази проводять через полум'я. Якщо рука при дотиканні до скла відчуває легкий опік, це свідчить, що мазок зафіксований.

**Фарбування мазка** — фіксований препарат розміщують на штативі і на мазок наносять кілька крапель розчину фарби, наприклад, метиленову синьку, еозин, фуксин (простий спосіб фарбування) та інші. Тривалість фарбування становить від однієї до п'яти хвилин. Після цього препарат промивають дистильованою водою, висушують і вивчають під мікроскопом.

**Фарбування за Грамом.** На фіксований мазок досліджуваної культури кладуть клаптик фільтрувального паперу і наносять на нього 2-3 краплі карболового генціанвіолету (рис. 6). Витримують фарбу протягом 1-2 хвилин. Потім знімають папірець, на препарат наносять 2-3 краплі розчину Люголя і витримують протягом 1-2 хвилин. Зливають розчин Люголя і обробляють мазок етиловим спиртом протягом 30 с. Після цього препарат промивають дистильованою водою, дофарбовують фуксином (1 хв), знову промивають водою і висушують. Виготовлений препарат вивчають під мікроскопом за допомогою імерсійної системи.

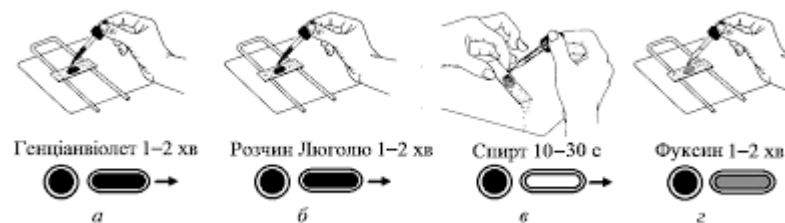


Рис. 6. Порядок фарбування клітин мікроорганізмів за Грамом

Мікроорганізми в живому стані вивчають на препаратах: «роздавлена крапля», «висяча крапля» та препаратах «відбитків».

Для виготовлення препарату «роздавлена крапля» на середину стерильного предметного скла наносять бактеріологічною петлею (або піпеткою) краплю суспензії досліджуваної мікробної культури. Якщо мікроби ростуть на твердому поживному середовищі, то попередньо на предметне скло вносять краплину стерильної води, а тоді вже вносять бактеріальну масу. Краплю накривають покривним скельцем і вивчають під мікроскопом.

Препарат «висяча крапля» виготовляють на спеціальному предметному скельці з луночкою. Краї луночки обмазують вазеліном. На середину покривного скельця наносять

невеличку краплю досліджуваного матеріалу, скельце швидко перевертають крапелькою вниз і накривають ним лунку так, щоб крапля була в центрі заглиблення і не торкалася його дна (рис. 7).

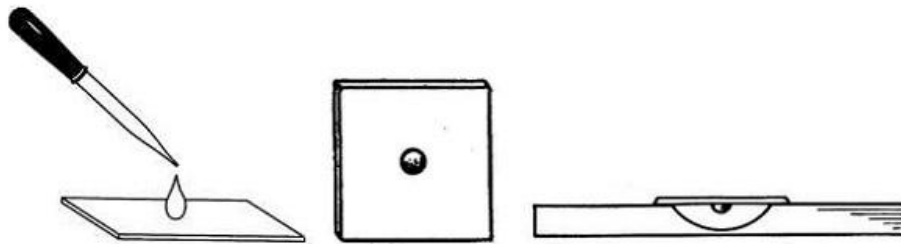


Рис. 7. Виготовлення препарату «висяча крапля»

Препарат «відбитків» найчастіше виготовляють з мікроорганізмів, які ростуть на агарових пластинках у чашках Петрі. Скальпелем вирізують шматочок агарової пластинки з колонією досліджуваних мікробів і розміщують його на предметному склі колонією догори. Зверху скляною паличкою або петлею легенько притискують чисте накривне скельце. Потім скельце обережно знімають і вміщують відбитком униз у краплину води на другому предметному склі. Виготовлений препарат вивчають під мікроскопом.

### Завдання 1

Замалювати різні за морфологією типи клітин бактерій (рис. 8).

<b>Мікрококи</b>	<b>Диплококи</b>	<b>Стрептококи</b>	<b>Тетракоки</b>
<b>Сарцини</b>	<b>Стафілококи</b>	<b>Бацили</b>	<b>Вібріони</b>
<b>Спірили</b>	<b>Спірохети</b>	<b>Нитчасті</b>	<b>Незвичної форми</b>

Рис.8. Форми бактерій

Завдання 2

Приготувати фіксовані препарати бактерій з роду *Streptococcus* (виділених з кисломолочних продуктів) або інших культур запропонованих викладачем. Фіксовані мазки зафарбувати метиленовим синім (3 хв), промити, просушити, розглянути з імерсією (збільшення об'єктива  $\times 90$ ). Замалювати (рис. 9).

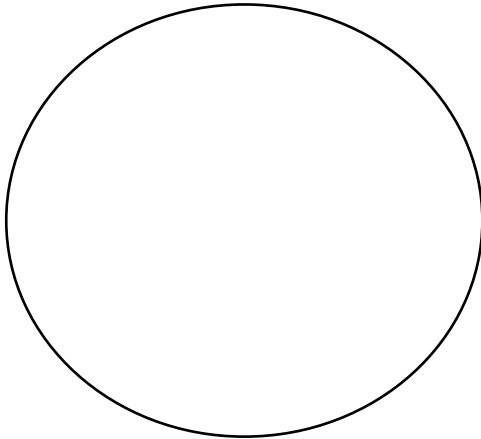


Рис. 9. \_\_\_\_\_

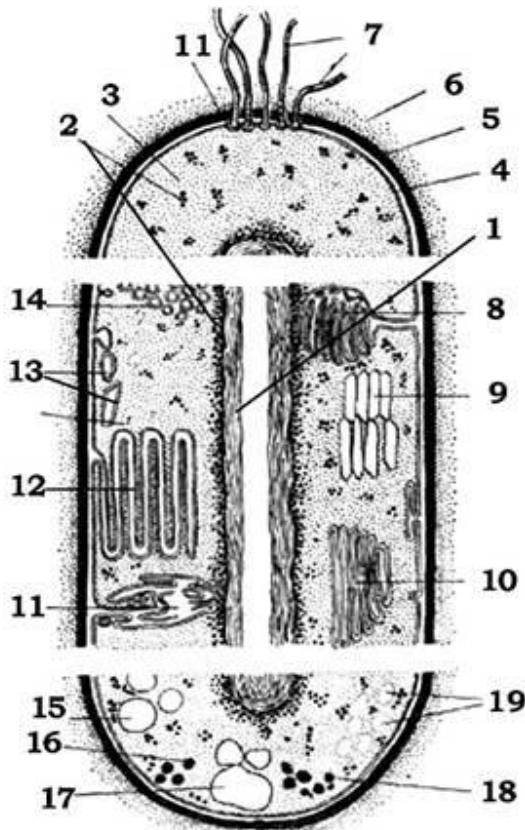
Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення об'єктиву \_\_\_\_\_; окуляру \_\_\_\_\_

Загальне збільшення мікроскопа \_\_\_\_\_

Завдання 3

Розглянути рис. 9 та зробити відповідні дописи. Заповнити таблицю 2.



- 1- \_\_\_\_\_
- 2- \_\_\_\_\_
- 3- \_\_\_\_\_
- 4- \_\_\_\_\_
- 5- \_\_\_\_\_
- 6- \_\_\_\_\_
- 7- \_\_\_\_\_
- 8- \_\_\_\_\_
- 9- \_\_\_\_\_
- 10- \_\_\_\_\_
- 11- \_\_\_\_\_
- 12- \_\_\_\_\_
- 13- \_\_\_\_\_
- 14- \_\_\_\_\_
- 15- \_\_\_\_\_
- 16- \_\_\_\_\_
- 17- \_\_\_\_\_
- 18- \_\_\_\_\_
- 19- \_\_\_\_\_

Рис. 9. Схематичне зображення будови бактеріальної клітини

Таблиця 2. Характерні ознаки клітин прокариот і еукаріот

Ознаки	Прокаріоти	Еукаріоти	
		Рослини	Тварини
Розмір клітин			
Форма			
Генетичний матеріал			
Рибосоми			
Клітинна стінка			
Органели			
Ендоплазматична сітка			
Клітинний центр			
Мітохондрії			
Комплекс Гольджі			

Лізосоми			
Пластиди			
Вакуолі			
Поділ клітин			
Дихання			
Фотосинтез			
Фіксація азоту			

Висновок: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_



*Самостійна теоретична підготовка:*

1. Дайте характеристику будови бактеріальної клітини. Охарактеризуйте особливості її хімічного складу та виконувані функції.

2. Наведіть класифікацію кокових бактерій за морфологічними ознаками. Наведіть приклади видових назв.

3. Назвіть послідовні етапи відбору проби та виготовлення мікроскопічного препарату клітин мікроорганізмів.

4. Зазначте порядок дій при виготовленні фіксованого мікроскопічного препарату «мазок».

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

### Тема. Будова дріжджової клітини та виявлення запасних речовин. Дослідження міцеліальних грибів

Мета. Ознайомитися з будовою клітин дріжджів. Ознайомитися з морфологічними властивостями та способами розмноження плісневих грибів.

*Матеріали та обладнання:* мікроскопи, предметні та покривні скельця, мікробіологічні петлі, спиртові горілки, штативи для пробірок, пробірки з стерильною водою, фільтрувальний папір, об'єкт для мікроскопування (культура дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* отримана з хлібопекарських дріжджів).

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

**Дріжджі** – еукаріотичні мікроорганізми з відповідною структурною організацією клітини. На відміну від інших грибів, є одноклітинними організмами, які не утворюють справжнього міцелію. У типовому мікроскопі добре розрізняються клітинна стінка, цитоплазма, вакуолі й диференційоване ядро, а при спеціальних методах фарбування – різні включення.

Розмножуються дріжджі нестатевим і статевим шляхом. Найпоширенішим способом нестатевого розмноження є брунькування, яке можна спостерігати під мікроскопом при застосуванні сухої системи. До найпоширеніших у природі видів дріжджів належать *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 10) і *Saccharomyces vini*. Останні можна виділити із плодово-ягідних соків, які перебувають у стані бродіння.

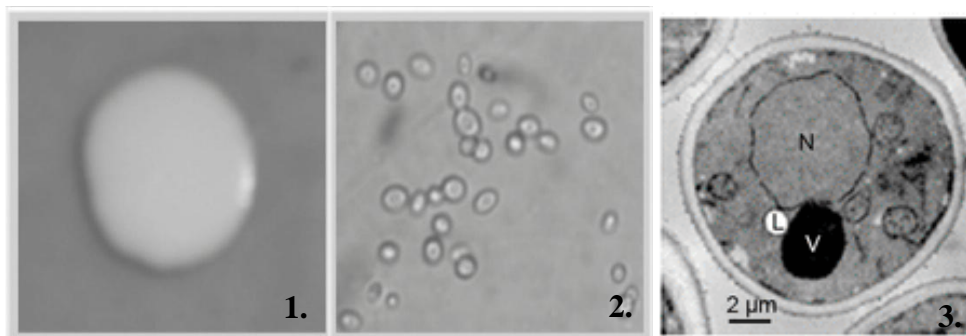


Рис. 10. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

1 – колонія; 2- клітини; 3- будова клітини: N-ядро, V-вакуоля, L-включення жиру

**Плісневі гриби** належать до міцеліальних грибів (фікоміцетів, аскоміцетів, базидіоміцетів, незавершених грибів). Їхній міцелій складається з переплетених гіфів, за допомогою яких гриби прикріплюються до субстрату. Значна частина міцелію може розвиватися в повітрі, утворюючи повітряний міцелій (рис. 11).

Цвілеві гриби *Aspergillus* і *Penicillium* не мають сумчастої стадії спороношення, тому їх відносять до недосконалих грибів. Вони викликають псування харчових продуктів, а деякі з них використовуються у мікробіологічній промисловості для виробництва лимонної кислоти (*Aspergillus niger*) і антибіотиків (*Penicillium chrysogenum*).



Серед інших видів мікроскопічних грибів у навчальних лабораторіях найчастіше вивчаються мукор, ризопус, ботритіс і молочну цвіль, оскільки вони легко ідентифікуються як візуально (за морфологічними культуральними властивостями), так і під мікроскопом.

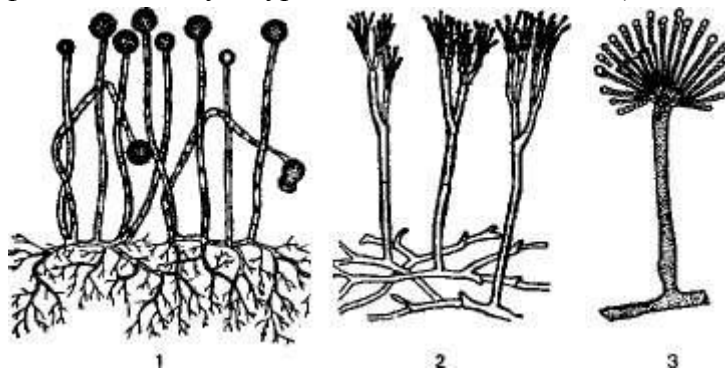


Рис. 11. Плісневі (міцеліальні) гриби: 1- *Mucor*; 2- *Penicillium*; 3- *Aspergillus*

### Завдання 1

Невеличкий шматок (3-5 г) дріжджової маси помістити у теплу підцукрену воду і залишити розчин на 10-15 хв. З краплі мутного розчину культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* виготовити препарат «роздавлена крапля». Розглянути морфологію і спосіб розмноження клітин дріжджів під мікроскопом і замалювати отримане зображення (рис. 12).

### Завдання 2

Для виявлення глікогену (запасна речовина) у краплю суспензії досліджуваних дріжджів внести краплю розчину Люголя ( $J_2$  в КJ). Накрити краплю покривним скельцем і розглянути під мікроскопом (об'єктив  $\times 40$ ). Глікоген забарвлюється розчином Люголя в червоно-коричневий колір. Замалювати зображення (рис. 13).

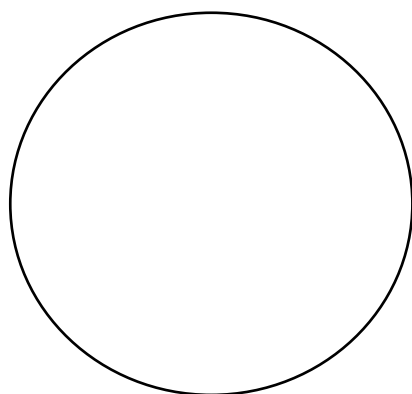


Рис. 12. *Saccharomyces cerevisiae*

Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення \_\_\_\_\_

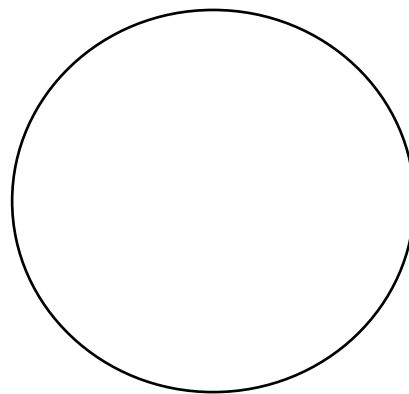


Рис. 13. Гранули глікогену у *Saccharomyces cerevisiae*

Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення \_\_\_\_\_

### Завдання 3

Виготовити, розглянути і замалювати препарат «роздавлена крапля» з культури цвілевих грибів (рис. 14, 15). На предметне скло нанести краплю води і за допомогою бактеріологічної петлі (розігнутої у вигляді гачка) відібрати невелику кількість міцелію і помістити у краплю води. За допомогою двох препарувальних голок обережно розправити у краплі тоненьким шаром і накрити покривним скельцем. Виготовлений препарат розглянути при малому ( $\times 8$ ) та великому ( $\times 40$ ) збільшенні.

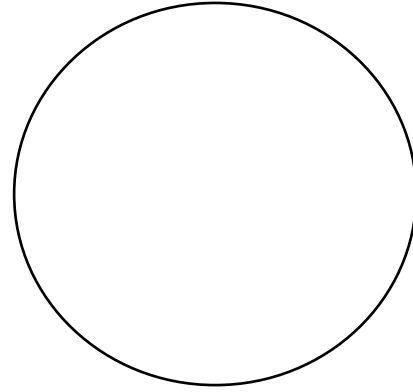
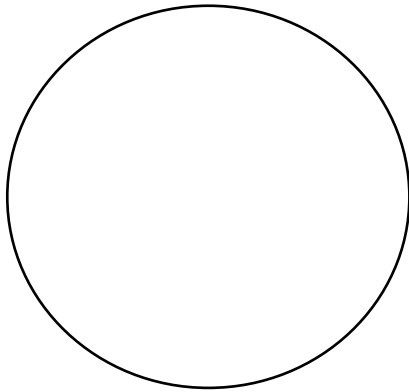


Рис. 14. Будова міцеліальних грибів

Рис.15. Будова міцеліальних грибів

Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Мікропрепарат \_\_\_\_\_

Збільшення \_\_\_\_\_

Збільшення \_\_\_\_\_

### Завдання 4

Заповнити таблицю 3

Таблиця 3. Морфологічні особливості плісневих грибів та дріжджів

Ознаки	Плісневі гриби			Дріжджі
	Mucor	Penicillum	Aspergillus	
Міцелій				
Місце утворення спор				
Розмноження				
Середовище існування				

Значення в природі та житті людини				
Представники				

Висновок: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_



*Самостійна теоретична підготовка:*

1. Яку будову мають дріжджі?
2. Як відбувається розмноження дріжджів?
3. Які запасні речовини виявляють у клітинах дріжджів?
4. Основні характеристики міцеліальних грибів?
5. Вкажіть спільні та відмінні ознаки клітин грибів з рослинними і тваринними клітинами.
6. Які ви знаєте цвілеві гриби залежно від їх пігментного складу?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

### Тема. **Методи стерилізації. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів**

Мета. Ознайомитися з різними типами стерилізації. Навчитися проводити підготовку та стерилізацію лабораторного посуду. Навчитися виготовляти поживні середовища для заданої групи мікроорганізмів.

*Матеріали та обладнання:* сушильні шафи, ваги, різні фільтри, чашки Петрі, шпателі Дригальського, піпетки, вата, марля, білі нитки, обгортковий папір, колби на 250 мл і 500 мл, ватні пробки, набір компонентів для приготування поживних середовищ, шпателі, лакмус.

### **ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ**

**Стерилізація** (знепліднення) – один із важливих і необхідних прийомів у мікробіологічній практиці. У практичній роботі стерилізацію трактують як метод знищення усіх форм життя як на поверхні так і в середині об'єктів стерилізації. Стерилізують поживні середовища, посуд, інструменти щоб не допустити розвитку сторонніх мікроорганізмів у досліджуваних культурах. Розрізняють стерилізацію термічну та холодну (хімічна, фільтрування й опромінення).

#### **Термічна стерилізація:**

1. *Прожарювання вогнем або фламбування* застосовують для стерилізації петель, голок, пінцетів, ножиць, шпателів та іншого дрібного інструменту безпосередньо перед використанням.

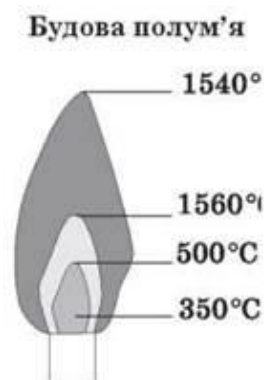
2. *Стерилізацію сухим жаром* за температури 165-170°C протягом 1-2 год здійснюють в сушильних шафах. Цей прийом використовують для стерилізації посуду: чашок Петрі, колб, пробірок, піпеток тощо, зрідка для стерилізації середовищ.

3. *Кип'ятіння у воді* використовують для стерилізації шприців, голок, пінцетів, скальпелів, дрібного скляного посуду, фільтрів. При цьому гинуть переважно вегетативних клітини, спори бактерій зберігають життєздатність.

4. *Пастеризація* — одноразове короткочасне прогрівання матеріалу за температури, що забезпечує знищення вегетативних форм мікроорганізмів. Цей прийом запропонував Л. Пастер. Пастеризацію часто застосовують у харчовій промисловості для обробки продуктів які втрачають смакові та поживні якості під час кип'ятіння: молока, овочевих і фруктових соків, вин, пива та ін. У мікробіологічній практиці пастеризацію застосовують для одержання нагромаджувальних і чистих культур спороутворювальних бактерій і для виявлення здатності бактерій утворювати спори.

Пастеризацію зазвичай проводять при 60-75 °С. Протягом 15-30 хв або при 80 °С 15 хв. Режим пастеризації визначається термостійкістю субстрату, можливістю інфікування мікроорганізмами і метою роботи. У лабораторних умовах матеріал пастеризують в ультратермостаті або на водяній бані.

5. *Тиндалізація* – 3-6-кратне нагрівання (дробна стерилізація) протягом 20-60 хв при 55-80 °С з інтервалом 24 год. У проміжках між нагріванням матеріал, що стерилізується



витримують при 24-37 °С для можливості проростання спор, які гинуть у процесі чергової стерилізації. Цим методом стерилізують середовища, які містять кров, сироватку та інші термолабільні компоненти.

6. *Стерилізація насиченого парою під тиском (автоклавування)* найбільш надійний і широко застосовуваний спосіб стерилізації поживних середовищ і посуду. Він ґрунтується на нагріванні матеріалу насиченою водяною парою при тиску, вищому від атмосферного. Відомо, що температура пари зростає при підвищенні тиску.

Наприклад, при тиску 1,5 атм температура пари становить 112 °С, при 2 атм - 121 °С, при 3 атм - 134 °С. Вважається, що при 121 °С вегетативні клітини гинуть за 10 хв, а спори бактерій – за 15-25 хв.

Автоклавування забезпечує високу ефективність стерилізації: гинуть вегетативні клітини і спори. Стерилізують паром під тиском у спеціальних герметичних товстостінних апаратах – автоклавах. Працювати з автоклавом слід обережно, дотримуючись інструкції.

### **Хімічна стерилізація**

Хімічну стерилізацію використовують для дезінфекції приміщень, столів, знищення патогенних культур мікроорганізмів тощо.

Для стерилізації цим методом можна застосовувати солі важких металів (найчастіше Hg, Cu, Zn), 50-70% розчин етилового спирту, формалін (40% розчин формальдегіду), хлорне вапно, хлорамін, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub>, йод, йодоформ, озон, детергенти й інші хімічні сполуки. Мікробоцидна дія цих речовин залежить від концентрації і температури, а також від виду, віку та фізіологічного стану мікроорганізмів, його чутливості до агента. Речовини, які знижують поверхневий натяг (мило та інші поверхнево-активні речовини), підвищують ефективність дезінфекції.

Обладнання, яке має дзеркальні, оптичні, радіодеталі, а також вироби з термолабільних пластмас (центрифужні пробірки тощо) стерилізують застосовуючи газовий метод. найчастіше використовують C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O, CH<sub>3</sub>Br, CH<sub>2</sub>O, O<sub>3</sub> та ін.

### **Стерилізація опроміненням**

Для стерилізації приміщень, обладнання, харчових продуктів використовують різні види опромінення: інфрачервоного, ультрафіолетового (УФ), рентгенівського, α-, β- і γ-променів. Частіше всього в мікробіологічній практиці використовують УФ-промені довжиною хвилі 260-280 нм.

### **Стерилізація фільтруванням**

Стерилізацію фільтруванням часто застосовують для субстратів, які не витримують нагрівання, зокрема, сироваток, рідких середовищ і розчинів, до яких входять термолабільні білки, вітаміни, цукри, деякі антибіотики. Спосіб полягає у пропусканні рідин через спеціальні дрібнопористі фільтри, діаметр пор яких менший за розміри бактерій. Останні затримуються на поверхні фільтрів. У лабораторіях як бактеріальні фільтри використовують: мембранні (колоїдні) фільтри, виготовлені на основі нітроцелюлози або ацетату целюлози та скляні фільтри.

### **Виготовлення поживних середовищ**

Для вирощування мікроорганізмів у лабораторних чи виробничих умовах використовують поживні середовища. *Поживне середовище* – це набір хімічних сполук, які забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів. Середовища мають відповідати таким вимогам:

- містити необхідні поживні речовини;

- містити необхідну кількість води;
- мати оптимальне значення рН та Eh;
- бути ізотонічним, тобто мати такий же осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- бути стерильним.

Поживні середовища поділяють на групи за такими критеріями: походження, консистенція та призначення.

Таблиця 4. Класифікація поживних середовищ

Поживні середовища								
Походження			Консистенція			Призначення		
Натуральні	Синтетичні	Напівсинтетичні	Рідкі	Напіврідкі	Щільні	Загального призначення	Спеціального призначення	
							Елективні	Диференційно-діагностичні

За походженням розрізняють натуральні (природні), синтетичні та напівсинтетичні поживні середовища. *Натуральні* поживні середовища мають рослинне або тваринне походження та *невизначений склад*. Це відвари злаків, фруктів і овочів; молоко, кров, сироватка, сеча, тваринні клітини, яйця птахів та їх зародки; дріжджовий автолізат; відвари м'яса, витяжки гною і ґрунту; вода озер і морів. До них належать м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонна желатина (МПЖ), пептонна вода (ПВ), суслний агар (СА) тощо. *Синтетичні* поживні середовища готують із хімічно чистих речовин у точно вказаних концентраціях. Вони мають *визначений склад* і легко відтворюються, наприклад: середовище Чапека, Ешбі, Виноградського, Гільтая та ін. *Напівсинтетичні* середовища мають *частково невизначений склад*. Вони містять як хімічно чисті сполуки (вуглеводи, фосфати, нітрати, амоній), так і компоненти чітко не встановленого складу (дріжджовий екстракт, пивне сусло, пептон).

За *консистенцією* виділяють рідкі, напіврідкі і щільні поживні середовища. *Рідкі* середовища містять поживні речовини, розчинені у воді (МПБ, ПВ, середовища Гісса та ін.). *Щільні* та *напіврідкі* середовища готують на основі рідких із внесенням ущільнюючої речовини. Як правило, для ущільнення поживного середовища використовують агар-агар – складний полісахарид, який входить до складу червоних водоростей і складається з агарози й агаропектину. У воді агар-агар утворює гель, який плавиться при температурі  $\sim 100^{\circ}\text{C}$  і ущільнюється при  $\sim 40^{\circ}$ . У щільні середовища вносять 1,5–2,0% агар-агару, а в напіврідкі – 1%. Цінною властивістю агар-агару є те, що він не асимілюється абсолютною більшістю мікроорганізмів. До щільних поживних середовищ належать МПА, СА, крохмало-аміачний агар (КАА), до напіврідких – середовище Гісса, напіврідке нітратне середовище тощо.

Якщо планують вирощувати мікроорганізми на скошеному агаризованому середовищі в пробірках, то кожену пробірку заповнюють середовищем не більше ніж на 1/3. Після стерилізації пробірки з середовищем розташовують для застигання з нахилом (рис. 16). Скошене агаризоване середовище не повинно доходити до ватяної пробки на 4-6 см.

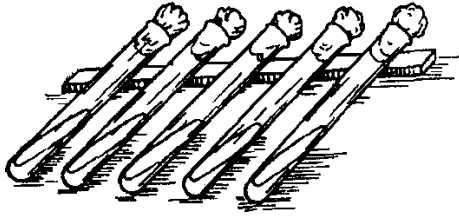


Рис. 16. Приготування скошеного агаризованого середовища

За *призначенням* поживні середовища бувають загального та спеціального призначення. Середовища *загального призначення* використовують для виділення і культивування більшості відомих мікроорганізмів. До таких середовищ належать МПБ, МПА тощо. Середовища *спеціального призначення* готуються з певною метою для конкретних потреб. Серед них розрізняють елективні та диференційно-діагностичні поживні середовища. *Елективні поживні середовища* ввів у мікробіологічну практику С. Виноградський. Вони забезпечують оптимальні умови для розвитку лише певних мікроорганізмів і непридатні для росту інших. Їх використовують головним чином для виділення мікроорганізмів із природних джерел та отримання накопичувальних культур. Прикладом елективного середовища може бути середовище Ешбі для азотофіксаторів. *Диференційно-діагностичні* поживні середовища використовують для вивчення фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів та їх ідентифікації. Наприклад, середовище Гісса – для вивчення здатності мікроорганізмів асимілювати вуглеводи; середовища Ендо, Левіна, Плоскірева – для визначення бактерій кишкової групи.

Основними компонентами будь-якого поживного середовища для культивування мікроорганізмів є вуглець- і азотвмісні сполуки. І саме ці сполуки визначають специфічність переважної більшості поживних середовищ. Поживне середовище для культивування деяких мікроорганізмів повинне включати одну, декілька або повний набір амінокислот. Деякі бактерії здатні використовувати як єдине джерело азоту молекулярний азот  $N_2$ . Це азотфіксатори. У середовище для культивування таких мікроорганізмів сполук азоту можна не вносити. Постачання азотфіксаторів газоподібним азотом здійснюється завдяки контакту середовища з повітрям або культивуванню в атмосфері азоту. Окрім джерел вуглецю, азоту і факторів росту мікроорганізмів для побудови речовин клітини необхідні сірка, фосфор і ін. елементи. Всі вони повинні міститися в поживному середовищі в доступній для мікроорганізмів формі. Потреби різних груп мікроорганізмів в сірці, фосфорі і ін. зольних елементах задовольняються зазвичай за рахунок мінеральних солей. Тому «мінеральний фон» середовища для культивування багатьох мікроорганізмів може бути близьким за складом. Про оптимальні концентрації мікроелементів для різних мікроорганізмів відомо мало, тому запропоновані різні по складу суміші мікроелементів. Розчини мікроелементів рекомендується стерилізувати окремо і вносити до середовища безпосередньо перед її засівом.

### Завдання 1

Ознайомитися з основними методами стерилізації посуду і поживних середовищ. Підготувати до стерилізації в сушильній шафі: чашки Петрі, пробірки, піпетки, колби.

Посуд перед стерилізацією ретельно миють, висушують і загортають в папір (для

збереження стерильності після прогрівання).

Кожну піпетку завертають окремо в довгі смужки паперу шириною 4-5 см. У широкі кінці піпеток, заздалегідь вставляють ватяні тампони. Обмотку починають з протилежного кінця поступовим рухом паперу по спіралі і закінчують біля кінця з тампоном. Загорнуті піпетки додатково завертають по декілька штук разом.

Чашки Петрі загортають разом по 2-4 штуки. Колби, пробірки закривають ватними пробками, а зверху паперовими ковпачками.

Простерилізований посуд зберігають в закритому, захищеному від пилу місці. Розгортають його безпосередньо перед використанням.

### Завдання 2

Виготовити ватно-марлеві пробки для пробірок та колб за зразком (рис. 17).

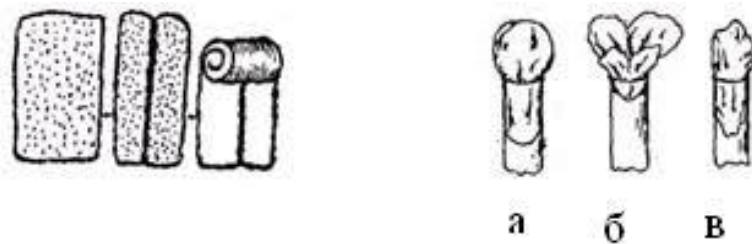


Рис. 17. Виготовлення ватно-марлевих пробок: а-правильний варіант; б, в-неправильний варіант

### Завдання 3

Приготувати задане викладачем поживне середовище.

Висновок: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_

#### *Самостійна теоретична підготовка*

1. Що таке стерилізація? Яке її значення?
2. Які способи термічної стерилізації використовують?
3. Що таке хімічна стерилізація? Які переваги та недоліки цього методу?
4. Що таке стерилізація опроміненням? Наведіть приклади її застосування.
5. Які потреби мікроорганізмів у поживних речовинах?
6. Як поділяють середовища за їхнім складом, призначенням та консистенцією?



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

### Тема. Дослідження мікробіоти ґрунту **Кількісний облік мікроорганізмів шляхом підрахунку колоній (чашковий метод Коха)**

Мета. Навчитися готувати розведення. Використовуючи елективні поживні середовища, визначити чисельність різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів у ґрунтових зразках.

*Матеріали та обладнання:* спиртові горілки, ваги, чашки Петрі, пробірки зі стерильною водою, колби з стерильною водою, поживні середовища, ґрунтові зразки, чашки Петрі, шпателі Дригальського, піпетки.

### **ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ**

Чашковий метод є найбільш поширеним для визначення чисельності мікроорганізмів у ґрунті, воді, повітрі, а також мікробного забруднення різних субстратів. Суть чашкового методу полягає в тому, що проводять посів певного об'єму досліджуваного матеріалу в чашки Петрі з твердим поживним середовищем. При подальшому вирощуванні посіву в термостаті з кожної клітини внаслідок розмноження утворюється колонія. Кількість колоній підраховують.

Як поживне середовище для обліку бактерій застосовують м'ясопептонний агар, для підрахунку цвілевих грибів і дріжджів – сусло-агар або середовище Чапека.

Робота за таким методом включає три етапи: приготування розведень, посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі і підрахунок колоній, що вирости.

*Приготування розведень.* Кількість мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища, як правило, велика, тому для отримання окремих колоній готують ряд розведень досліджуваного субстрата.

Розведення готують у стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині (0,5% водний розчин NaCl), зазвичай використовують десятикратні послідовні розведення (1:10, 1:100, 1:1000 і т. д.) (рис. 18).

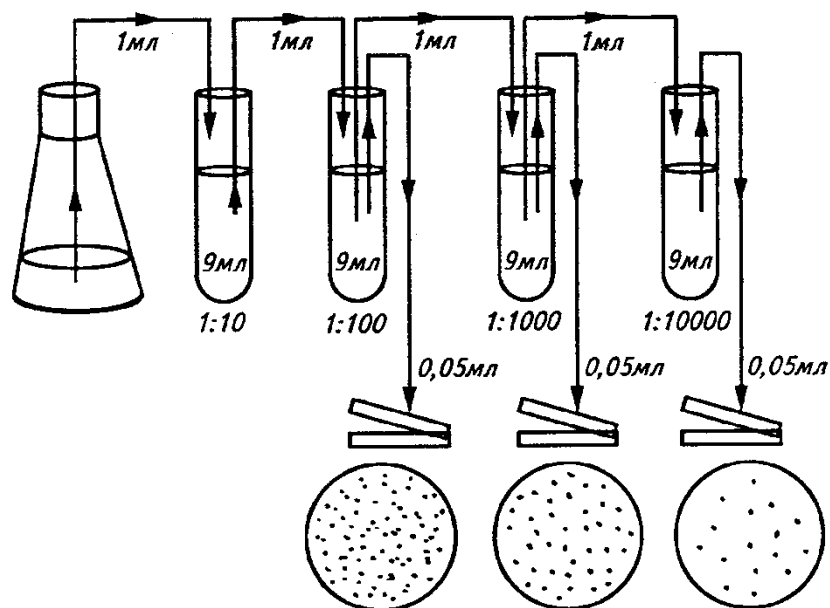


Рис. 18. Приготування послідовних розведень

Для приготування кожного розведення обов'язково використовують окрему піпетку! Нехтування цим правилом може привести до отримання помилкового результату, інколи в 1000 і більше разів того, що перевищує достеменний. Помилка пов'язана з адсорбцією мікроорганізмів на стінках піпетки, внаслідок чого не всі клітини видаляються з піпетки при приготуванні відповідного розведення. Частина клітин, що залишилася на стінках піпетки, може потім потрапити в одне з подальших розведень, що і буде причиною отримання завищеного результату.

*Посів на агаризовані середовища в чашки Петрі (поверхневий).* У стерильні чашки Петрі наливають розплавлене на киплячій водяній бані агаризоване середовище, по 20 мл в кожну. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки не застигне агар. Посів роблять з певних розведень залежно від передбачуваної кількості мікроорганізмів в досліджуваному субстраті. Стерильною піпеткою наносять певний об'єм (зазвичай 0,1 мл) відповідного розведення, заздалегідь ретельно перемішаного, на поверхню агарової пластинки в чашці Петрі. Цей об'єм розподіляють по поверхні середовища стерильним шпателем Дригальського (рис. 19). Для паралельних посівів з одного розведення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем. Для посівів з різних розведень, використовують нову стерильну піпетку і новий шпатель. Чашки із засіяним середовищем поміщають в термостат, відрегульований на певну температуру, сприятливу для розвитку мікроорганізмів, перевернувши їх догори дном.

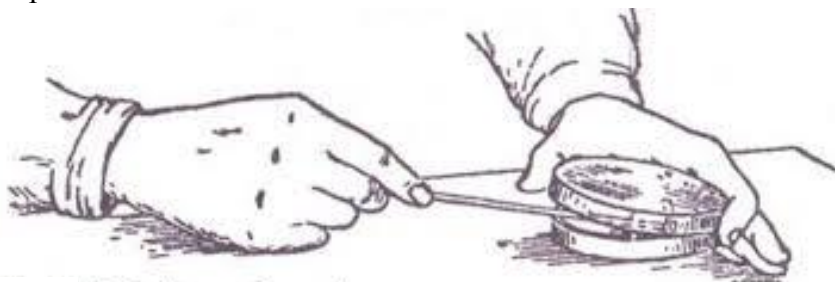


Рис. 19 Посів бактеріальної культури на агаризоване середовище

Для *глибинного посіву* (у товщі середовища) суспензію мікроорганізмів вносять безпосередньо до стерильної чашки Петрі на дно, злегка прочинивши кришку, а потім заливають її розплавленим і охолодженим агаром. Середовище з культурою ретельно перемішують круговими рухами чашки, не піднімаючи її з поверхні столу. Після цього чашку залишають на столі до застигання агару.

### Завдання 1

Наважку ґрунту (10 г), суспендувати протягом 10-15 хв у 100 мл стерильної водогінної води. З отриманої суспензії відібрати 1 мл і перенести в пробірку, наповнену 9 мл стерильної водогінної води (розведення  $1:10^2$ ). З цієї ж пробірки відібрати 1 мл суспензії і перенести в наступну пробірку з 9 мл води (розведення  $1:10^3$ ). Приготувати необхідне розведення ( $10^4$  або  $10^5$ ).

### Завдання 2

З пробірки із заданим розведенням відібрати 0,1 мл суспензії і перенести в чашку Петрі із заздалегідь підготовленим поживним середовищем.

Стерильним шпателем Дригальського рівномірно розподілити краплю по всій поверхні. Працювати необхідно біля полум'я спиртівки дотримуючись умов стерильності, оскільки при потраплянні сторонніх мікроорганізмів на живильне середовище спотворюються результати досліду.

Чашки перевернути догори дном і інкубувати в термостаті за температури 28°C. Підрахунок та опис колоній, що вирости, проводиться на наступному занятті.



Висновок: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_

*Самостійна теоретична підготовка*

1. Якими методами досліджують мікрофлору ґрунту?
2. Що таке біогенність ґрунту?
3. Яка роль в утворенні ґрунту?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

### Тема. Мікробіологічні методи дослідження ґрунту. Якісний аналіз

Мета. Провести підрахунок колоній, що виростили на твердому поживному середовищі. Навчитися визначати культуральні властивості колоній, які переважають в об'єкті та виділяти з них чисті культури бактерій.

*Матеріали та обладнання:* чашки Петрі, мікробіологічна петля.

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Колонії бактерій підраховують зазвичай через 3 доби, колонії грибів і дріжджів — через 5–7 діб. Колонії, як правило, підраховують з невеликим збільшенням, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності позначають прораховану колонію крапкою на зовнішній стороні дна чашки, користуючись маркером. Колонії підраховують наступними способами: якщо вони ізольовані один від одного, великі і в невеликій кількості, то зазвичай їх рахують по всій поверхні чашки. За великої кількості колоній, що виростили, дно чашки Петрі ділять на сектори, підраховують в 2–3 секторах, знаходять, середнє арифметичне на один сектор, а потім множать на кількість секторів (або підраховують кількість колоній в кожному секторі і результати підсумовують).

Щоб визначити чисельність мікроорганізмів в ґрунті, необхідно результат підрахунку кількості колоній в чашках Петрі, помножити на знаменник відповідного розведення. Наприклад, в наважці досліджуваного продукту міститься 60000 бактерій. По отриманих результатах розраховують кількість бактерій в 1 г або 1 см<sup>3</sup> досліджуваного продукту.

Вивчення культуральних властивостей колоній мікроорганізмів, які виростили в чашках Петрі. Для вивчення якісного складу мікрофлори досліджуваних об'єктів необхідно, перш за все, ізолювати окремі види мікробів і виростити їх у вигляді так званих *чистих культур*, а потім, вивчити їх властивості (культуральні, морфологічні і біохімічні).

Велике значення для ідентифікації бактерій мають *культуральні ознаки* – це характер зростання бактерій на щільній і рідкій середовищі. Для вивчення культуральних властивостей бактерій необхідно вибрати на чашках Петрі відособлені найбільш типові колонії. Потім, не відкриваючи чашок, приступити до опису зовнішніх властивостей колоній, звернувши увагу на наступні ознаки (рис. 20):

- а) форма (кругла, кореневидна, неправильної форми, ризоїдна і т. д.);
- б) забарвлення (безбарвна (брудно-білі колонії відносяться до безбарвних), або пігментована - біла, жовта, золотиста, червона, чорна);
- в) поверхня колоній (гладка, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, концентрично або радіально-покреслена і т. д.);
- г) профіль колонії (плоский, опуклий, кратероподібний, конусовидний і т. д.);
- д) блиск і прозорість (колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора);
- е) розмір колонії (діаметр) вимірюють за допомогою звичайної лінійки і вказують її величину в міліметрах. Точковими називають колонії менше 1 мм в діаметрі; дрібні мають 1–2 мм, середні, – 2–4 мм і великі – більше 4 мм в діаметрі;
- ж) край колонії (рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчатий і т. д.) визначають при малому збільшенні мікроскопа. Чашку поміщають на предметний столик мікроскопа;
- з) структура колонії (однорідна, дрібнозерниста, грубозерниста, струмениста і т. д.) визначається при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;

и) консистенцію колонії визначають, торкаючись до її поверхні бактеріальною петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути твердою, м'якою або врастаючою в агар; слизькою (прилипати до петлі), тягучою, крихкою (легко ламатися при дотику петлею).

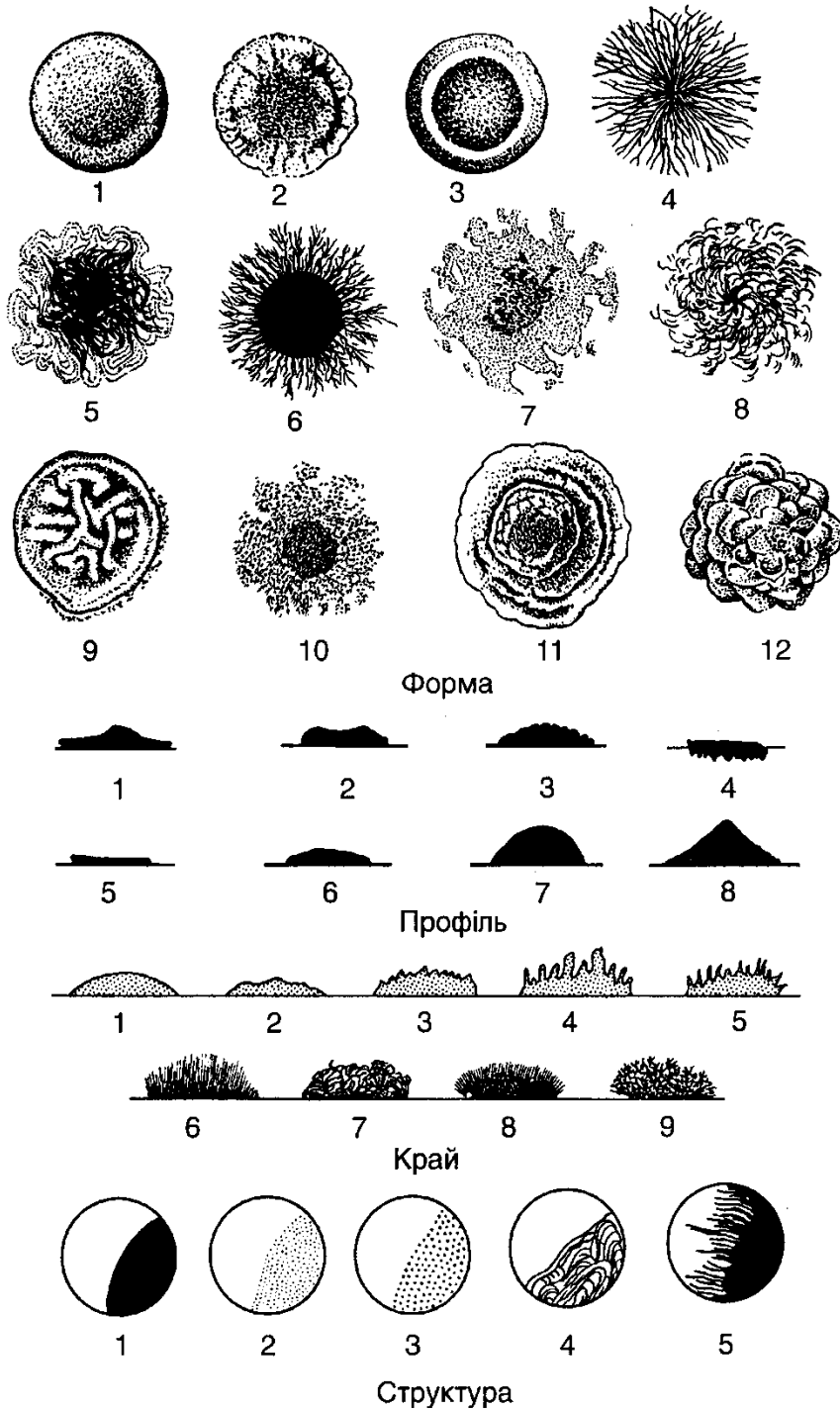


Рис. 20. Характеристика колоній мікроорганізмів:

**Форма:** 1 – округла; 2 – округла з фестончастим краєм; 3 – округла з валиком; 4, 5 – ризоїдна; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – ниткоподібна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна. **Профіль:** 1 – зігнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбкуватий; 4 – врослий у субстрат; 5 – плескатий; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний. **Край:** 1 – гладенький; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – галузистий. **Структура:** 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струминчаста; 5 – волокниста.

Колонії, що відрізняються хоч би за однією з вказаних ознак, слід розглядати як різні типи. Для кожного виду бактерій є притаманним певний характер колоній. За числом типів колоній в чашках можна мати уявлення про різноманітність видового складу бактерій досліджуваного об'єкту.

### Завдання 1

Підрахувати чисельність колоній мікроорганізмів, що вирости на твердому поживному середовищі та записати отримані результати в табл. 5.

*Таблиця 5. Чисельність мікроорганізмів*

Поживне середовище	Розведення	Кількість колоній, шт.			Середня кількість колоній, шт.	Чисельність мікроорганізмів, КУО в 1 г ґрунту
		I	II	III		

По закінченні підрахунків колоній визначити середнє з 3 чашок і помножити на розведення, взяте для аналізу. У такий спосіб одержують кількість аеробних мікробів у 1 г сирого ґрунту. Для точних дослідів кількість мікроорганізмів визначається в 1 г повітряно-сухого, а найточніших – абсолютно сухого ґрунту. Для таких розрахунків треба водночас визначати вологість ґрунтової проби.

Кількість мікроорганізмів на 1 г повітряно-сухого ґрунту розраховують за такою формулою:

$$A = \frac{B \times V \times \Gamma}{D}$$

*A* – кількість клітин мікробів у 1 г повітряно-сухого ґрунту, КУО;

*B* – середнє число колоній мікроорганізмів у чашці Петрі;

*V* – відповідне розведення ґрунтової витяжки;

*Г* – кількість крапель у 1 мл рідини в піпетці;

*D* – наважка ґрунту, взята для аналізу, г.

### Завдання 2

Описати та замалювати зовнішній вигляд типових колоній, наявних в чашці Петрі.

	Форма _____
	Профіль _____
	Край _____

	Структура _____
	Форма _____ Профіль _____ Край _____ Структура _____
	Форма _____ Профіль _____ Край _____ Структура _____
	Форма _____ Профіль _____ Край _____ Структура _____

### Завдання 3

Виділити чисті культури бактерій, які переважають в досліджуваному об'єкті.

Висновок: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_

### *Самостійна теоретична підготовка:*

1. Які середовища використовують для кількісного обліку мікроорганізмів?
2. Які етапи визначення чисельності мікроорганізмів у ґрунті?
3. Переваги і недоліки методу підрахунку колоній?
4. Які групи мікроорганізмів населяють ґрунт?
5. Опишіть взаємозв'язки мікроорганізмів з рослинами.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

### Тема. Дослідження епіфітної мікробіоти рослин

Мета. Ознайомитися з основними методами дослідження епіфітної мікробіоти. Навчитися визначати кількісний склад епіфітної мікробіоти рослин та насіння.

*Матеріали та обладнання:* спиртівки, чашки Петрі з поживним середовищем Капустяний агар та МПА, колби з стерильною водою, піпетки, шпателі Дригальського, рослинні зразки (листя), необроблене насіння.

### ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Філосфера — це сукупність усіх надземних поверхонь рослин, а мікроорганізми які її населяють називають *епіфітами*. За нормальних умов вони не проникають у внутрішні тканини і не спричиняють значної шкоди (мікрофлора свіжозібраного за нормальних умов доброякісного зерна). Але за умов підвищення вологості епіфітна мікрофлора здатна спричинити велику шкоду, оскільки вона сприяє процесу самозігрівання зерна внаслідок виділення великої кількості тепла під час дихання.

Епіфітна мікрофлора складається із неспоруютьчих бактерій, які становлять 80-99 % загальної кількості мікроорганізмів, а також грибів родів *Alternaria*, *Mucor*, *Cladosporium* та ін. 1-2 % мікрофлори припадає на частку пліснявих грибів родів *Penicillium* і *Aspergillus*. Джерелом епіфітних мікроорганізмів є проростаюче насіння, ґрунт, пил, краплі води, комахи. Чисельність популяцій бактерій філосфери визначається доступністю вологи і поживних речовин, джерелом яких є сполуки, які вимиваються водою з листків, секреті та ексудати рослин. Як поживні речовини також можуть бути використані осідаючі на поверхні листя частинки, пилок, речовини, розчинні в дощовій воді. Рослини ж від асоційованого з їх поверхнею мікробного консорціуму отримують покращення мінерального живлення, захист від фітопатогенів, абіотичних стресів тощо. Серед епіфітів найчисельнішу групу утворюють бактерії. Склад і розвиток залежить від кліматичних умов, віку, виду рослин та фази їх вегетації, типу ґрунту, умов вирощування. При зростанні вологості чисельність епіфітних мікроорганізмів суттєво зростає, а при пониженні вологості зменшується.

Найпоширеніші представники епіфітної мікробіоти: *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus cereus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Paenibacillus macerans*, *P. polymyxa*, *Aspergillus flavus*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia amylovora*, *Pullularia pullulans*, *Alternaria alternate* тощо.

#### Завдання 1

Визначити кількісний склад епіфітної мікробіоти рослин методом відбитків, заповнити таблицю 6.

Частину листової пластини рослинного зразку щільно притиснути до поживного середовища спочатку зовнішньою стороною листка, а в іншу чашку внутрішньою стороною. Помістити чашки для інкубації мікроорганізмів у термостат на 3 доби (28°C). Після інкубації підрахувати кількість колоній мікроорганізмів та описати їх морфологічні ознаки.



*Таблиця 6.* Визначення кількісного складу епіфітної мікробіоти (методом відбитків)

Середовище	Кількість колоній (КУО)	Морфологічні особливості колоній

*Завдання 2*

Провести кількісний облік епіфітних мікроорганізмів на зерні. Наважку зерна (5-10 г) помістити в колбу з стерильною водою і збовтувати протягом 10 хв. З отриманої суспензії зробити посів на поживні середовища капустяний агар (поверхневий посів) та МПА (глибинний посів). Чашки інкубувати у термостаті 3 доби. Після інкубації підрахувати кількість колоній мікроорганізмів та описати їх морфологічні ознаки.

Заповнити таблицю 7

*Таблиця 7.* Визначення кількісного складу епіфітної мікробіоти (змив з насіння)

Середовище	Кількість колоній, КУО/1 г насіння	Морфологічні особливості колоній

*Завдання 3*

Проаналізувати та узагальнити отримані знання про типи взаємовідносин між мікроорганізмами і рослинами, які формуються в ризо-, ендо- та філосфері. Заповнити таблицю 8.

Таблиця 8. Взаємодія мікроорганізмів і рослин у фітосфері

Екологічна ніша	Характеристика умов та наявності ресурсів	Представники	Особливості рослинно-мікробних взаємовідносин
Ризосфера			
Філософера			
Ендосфера			

Висновок: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 8

### Тема. Фітопатогенні мікроорганізми – збудники захворювань рослин

Мета. Ознайомитися з основними типами інфекцій хвороб рослин. Навчитися визначати захворювання за зовнішніми ознаками уражень рослин.

*Матеріали та обладнання:* презентації, таблиці, рисунки.

#### Завдання 1

За допомогою презентації, рисунків розглянути та вивчити основних збудників бактеріальних захворювань рослин. Заповнити таблицю 9.

*Таблиця 9.* Захворювання рослин

<b>Захворювання</b>	<b>Збудник</b>	<b>Культура</b>	<b>Симптоми</b>
1	2	3	4

1	2	3	4

Завдання 2

Розглянути (на таблицях, схемах, презентаціях) основні типи вірусів (за розмірами, формою, типом симетрії, вмістом нуклеїнової кислоти).

Розглянути основні види вірусних хвороб рослин – мозаїки та жовтяниці. Заповнити таблицю 10.

*Таблиця 10. Вірусні хвороби рослин*

<b>Захворювання</b>	<b>Збудник</b>	<b>Культура</b>	<b>Симптоми</b>

1	2	3	4

Висновок: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Відмітка про зарахування \_\_\_\_\_ Викладач \_\_\_\_\_



*Самостійна теоретична підготовка*

1. Опишіть найпоширеніші бактеріальні хвороби рослин.
2. Особливості будови вірусів?
3. Опишіть найпоширеніші вірусні хвороби рослин та заходи їх профілактики.

## ***БІБЛІОГРАФІЯ***

1. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. М. : Изд-во МГУ, 1995. 224с.
2. Кривцова М. В., Ніколайчук М. В. Екологія мікроорганізмів. Навчальний посібник. Ужгород, 2011. 184 с.
3. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Мікробіологія: практикум, тести. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 228 с.
4. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт із дисципліни «Мікробіологія та основи вірусології» / Уклад. О. О. Ткачук. Вінниця : ВНТУ, 2018. 39 с.