

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Агрономічний факультет

Кафедра здоров'я фітоценозів і трофології

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ДО ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ПРОВЕДЕННЯ
НАВЧАЛЬНОЇ ПРАКТИКИ
З ДИСЦИПЛІНИ «МІКРОБІОЛОГІЯ»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство»
спеціальності 202 «Захист і карантин рослин»
за освітньо-професійною програмою «Захист і карантин рослин»

Методичні рекомендації до організації та проведення навчальної практики з дисципліни «Мікробіологія» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності 202 «Захист і карантин рослин» за освітньо-професійною програмою «Захист і карантин рослин»

Укладачі:

Ірина ІВАЩЕНКО кандидат біологічних наук, доцент кафедри
здоров'я фітоценозів і трофології Поліського
національного університету

Рецензенти :

Людмила КОТЮК доктор біологічних наук, професор кафедри екології
факультету лісового господарства та екології Поліського
національного університету

Лариса АСТАХОВА кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки,
біоресурсів та збереження біорізноманіття
природничого факультету Житомирського
державного університету імені Івана Франка

Іващенко І. Методичні рекомендації до організації та проведення навчальної практики з дисципліни «Мікробіологія» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» спеціальності 202 «Захист і карантин рослин» за освітньо-професійною програмою «Захист і карантин рослин». Житомир : Поліський національний університет, 2024. 19 с.

Розглянуто і затверджено:

на засіданні кафедри здоров'я фітоценозів і трофології,
протокол № 3 від 04. 10. 2024 р.

на засіданні навчально-методичної комісії агрономічного факультету,
протокол № 2 від 17.10. 2024 р.

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Програма навчальної практики.....	5
Тема 1. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.....	6
Тема 2. Виділення чистої культури мікроорганізмів.....	10
Тема 3. Ідентифікація мікроорганізмів.....	11
Тема 4. Візуальний метод виявлення фітовірусної інфекції.....	14
Критерії оцінювання.....	17
Рекомендована література.....	17

ВСТУП

Навчальна практика здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство» зі спеціальності 202 «Захист і карантин рослин» є однією з форм організації освітнього процесу і компонентом освітньо-професійної програми підготовки здобувачів вищої освіти за даною спеціальністю. Методичні вказівки щодо проведення навчальної практики розроблені на підставі робочої програми навчальної практики та робочої програми дисципліни «Мікробіологія». Основним завданням навчальної практики є закріплення теоретичних знань, отриманих студентами під час аудиторного навчання, набуття й удосконалення практичних навичок і вмінь, формування та розвиток у студентів професійної здатності приймати самостійні рішення, оволодіння сучасними методами та формами організації праці, здатності логічно мислити. Практика є продовженням освітнього процесу, активною формою поєднання теорії і практики. Мета навчальної практики з мікробіології – практично закріпити отримані впродовж вивчення курсу «Мікробіологія» теоретичні знання про морфологію, ультраструктуру, поширення мікроорганізмів у фітоценозах, фітопатогенні мікроорганізми, методи виділення мікроорганізмів у чисту культуру, їх культивування на поживних середовищах, ідентифікацію, візуальні методи діагностики фітовірусної інфекції з тим щоб практично впливати на окремі групи мікроорганізмів, зокрема фітопатогенні мікроорганізми для підвищення продуктивності сільськогосподарських культур.

Під час проходження навчальної практики у здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти в межах освітньо-професійної програми спеціальності 202 «Захист і карантин рослин» в комплексі забезпечується формування наступних компетентностей та результатів навчання:

ЗК 2. Здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях.

ЗК 3. Знання і розуміння предметної області та розуміння професійної діяльності.

ЗК 9. Здатність приймати обґрунтовані рішення.

Програмні результати навчання (ПРН):

РН 4. Знати і розуміти математику і природничі науки в обсязі, необхідному для професійної діяльності із захисту і карантину рослин.

РН 6. Коректно використовувати доцільні методи спостереження, опису, ідентифікації, класифікації, культивування об'єктів агробіоценозів та підтримання їх стабільності для збереження природного різноманіття.

РН 14. Застосовувати міжнародні та національні стандарти і практики в професійній діяльності.

За час проходження навчальної практики студент повинен оволодіти сучасними методами і формами організації праці, на базі одержаних у навчальному закладі знань, формувати професійні уміння

та навички, необхідні для прийняття самостійних рішень, систематично оновлювати свої знання та творчо їх застосовувати у практичній діяльності.

У результаті проходження навчальної практики здобувач вищої освіти повинен знати: завдання мікробіології, суть найважливіших мікробіологічних процесів, що відбуваються у фітоценозах, значення мікроорганізмів у захисті рослин від шкідливих організмів, методологію і технологію ведення аграрного виробництва з урахуванням досягнень мікробіології для захисту рослин.

Вміти : готувати та мікроскопіювати препарати мікроорганізмів, здійснювати відбір зразків рослинного матеріалу для аналізу на наявність мікробних патогенів, готувати середовища для культивування мікроорганізмів, автоклавувати, здійснювати пересіви культур, виділяти мікроорганізми в чисту культуру, ідентифікувати отримані ізоляти, аналізувати результати та складати звіти.

Практика передбачає обов'язкове знання теоретичного курсу «Мікробіологія» та основних методів мікробіологічних досліджень, які опанували студенти впродовж практичних занять.

Навчальна практика проводиться у вигляді будь-яких форм занять, що носять прикладний практичний характер: навчально-ознайомлювальні екскурсії, консультації, практикуми, майстер-класи, безпосередня участь у проведенні відбору зразків рослин з ознаками ураження збудниками хвороб з наступним їх виділенням у чисту культуру та ідентифікацією мікроорганізмів.

База практики: Базою проведення практики є Ботанічний сад Поліського національного університету, лабораторія кафедри.

ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОЇ ПРАКТИКИ

№ з/п	Тема	Кількість годин
1.	Тема 1. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів Відбор зразків рослинного матеріалу для аналізу на наявність фітопатогенної мікрофлори. Обстеження надземної частини рослин та кореневої системи. Приготування поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, стерилізація.	6
2.	Тема 2. Виділення мікроорганізмів у чисту культуру. Опанування різних методів посіву мікроорганізмів. Демонстрація техніки виділення мікроорганізмів у чисту культуру. Культивування виділених мікроорганізмів.	6
3.	Тема 3. Ідентифікація мікроорганізмів.	6

	Дослідження культуральних особливостей виділених культур мікроорганізмів. Методи приготування препаратів мікроорганізмів. Мікроскопіювання. Ідентифікація отриманих ізолятів мікроорганізмів. Аналіз результатів.	
4.	Тема 4. Візуальний метод виявлення фітовірусної інфекції. Відбір зразків рослинного матеріалу із симптомами вірусної інфекції. Обстеження надземної частини рослин, виявлення симптомів вірусної інфекції. Опис симптоматики вірусних хвороб рослин у звіті. Застосування методу біотестів для виявлення вірусної інфекції. Обговорення деструктивної дії вірусів на клітинні комплекси, поширення та резервації вірусів у фітоценозах.	6
5.	Тема 5. Презентації та обговорення звітів.	6

Тема 1. ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ, СТЕРИЛІЗАЦІЯ

Мета: навчитись готувати поживні середовища та здійснювати їх стерилізацію автоклавуванням.

Завдання:

1. Приготувати картопляний агар.
2. Підготувати до стерилізації чашки Петрі, піпетки, пробірки, колби.
3. Простерилізувати приготовлене середовище.

Для культивування мікроорганізмів розроблені різноманітні поживні середовища. Вони містять всі необхідні для нормального росту і розвитку мікроорганізмів елементи: макро- і мікроелементи, вітаміни, стимулятори росту тощо. За складом середовища поділяють на дві групи: природні і синтетичні.

Природними називають середовища, які складаються із продуктів тваринного або рослинного походження, які мають складний невизначений хімічний склад. Їх основа – різні частини рослин, тваринні тканини, солод, дріжджі, ґрунт, гній, вода морів, озер та мінеральних джерел. Більшість з них використовують у вигляді екстрактів або настоїв. На природних середовищах добре розвивається більшість мікроорганізмів, оскільки вони містять всі компоненти, необхідні для росту і розвитку.

Синтетичні середовища – це такі, до складу яких входять в точно вказаних концентраціях тільки відомі хімічно чисті сполуки. Синтетичні середовища бувають простими за складом, або мають відносно великий набір компонентів.

Існують *напівсинтетичні* середовища, які виготовляють з хімічних речовин і натуральних продуктів.

Виноградським С. М. в практику мікробіології введені елективні (вибіркові) середовища для певних груп мікроорганізмів, які забезпечують переважний розвиток одного виду або групи споріднених мікроорганізмів і менш придатні або зовсім непридатні для розвитку інших.

Використовують поживні середовища різної консистенції: *рідкі, щільні, напіврідкі*. Щільні живильні середовища використовують для обліку щільності бактерій, виділення їх в чисту культуру та інших діагностичних цілей (рис. 21). Їх виготовляють із рідких, додаючи 1,5–2,5% агар-агару або 10–15% желатину. При приготуванні напіврідких середовищ вносять 0,1–0,2% агар-агару.

Агар-агар – рослинний колоїд, який отримують із деяких морських водоростей. До його складу входять головним чином полісахариди з незначним вмістом азотистих речовин. Желатина – кислий азотомісткий продукт, який добувають при варінні кісток і хрящів. Виноградським С. М. введені в мікробіологічну практику гелеві пластини, які широко застосовують як щільні живильні середовища.

Для культивування мікроорганізмів, які використовують органічні форми азоту, часто застосовують м'ясо-пептонні середовища: м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, м'ясо-пептонну желатину.

Картопляний агар

200 г очищеної і промитої водою картоплі нарізають шматочками, заливають 1 л води, варять 30 хв. Відвар фільтрують крізь вату і доводять водою до початкового об'єму. До отриманої рідини додають 2% агар-агару (20 г), кип'ятять до його розчинення і встановлюють нейтральну реакцію середовища (рН 7,0). Середовище розливають в пробірки, які закривають ватяними корками. Стерилізують в автоклаві за тиску 1 атм. 30 хв.

Методи стерилізації

Стерилізація – один з найважливіших прийомів у мікробіологічній практиці. Стерилізація – знепліднення, тобто повне знищення мікроорганізмів, їхніх спор у поживних середовищах, посуді, на інструментах тощо. Розрізняють фізичні, хімічні, механічні методи стерилізації. Найчастіше застосовуються хімічна і фізична стерилізації. Можливість і доцільність використання того чи іншого методу стерилізації визначається особливостями матеріалу, який необхідно стерилізувати, його фізичним та хімічним складом.

До фізичних методів стерилізації відносять стерилізацію високою температурою (термічна), ультрафіолетовим, іонізуючим, інфрачервоним, радіочастотним опроміненнями, ультразвуком, фільтруванням крізь бактеріальні фільтри.

Термічну стерилізацію здійснюють прожарюванням предметів у полум'ї пальника, кип'ятінням, сухим жаром, парою під тиском (в автоклаві) і текучою парою.

Розрізняють повну стерилізацію (повне знищення мікроорганізмів) і неповну або часткову (спори не знищуються).

Прожарювання в полум'ї

Прожарювати у полум'ї пальника можна безпосередньо перед використанням платинові петлі, голки, шпатель, дрібні металеві предмети, а також скляні палички, предметні, покривні скельця тощо.

Стерилізація сухим жаром

Цим методом стерилізують скляний посуд в печі Пастера, або у спеціальній сушильній шафі за температури 160–170°C впродовж 2 год. (рис. 22). Температура вище 170°C не рекомендується, оскільки псуються ватяні корки і папір (буріють, стають ламкими).

Перед стерилізацією скляний посуд закривають ватяними корками, отвори колб обв'язують папером, чашки, пробірки, піпетки загортають у папір. Після закінчення стерилізації шафу не відчиняють до повного охолодження.

Пастеризація

Пастеризація – це неповна або часткова стерилізація. Метод, запропонований Л. Пастером, використовують для знищення неспороносних мікроорганізмів. Пастеризація може проводитися в термостаті або на водяній бані. У лабораторних умовах її проводять за 60–75°C від 15–30 хв. до 1 год., за 80°C – 10–15хв. Цей метод широко використовують у харчовій промисловості для знезараження молока, соків, пива, вина тощо.

Стерилізація парою під тиском

Стерилізація парою під тиском в автоклавах – найбільш швидкий і надійний спосіб стерилізації, за якого гинуть не тільки вегетативні клітини мікроорганізмів, але і їхні спори. Цим методом стерилізують більшість поживних середовищ, посуд, матеріали.

Автоклави бувають різної конструкції, але принцип їх будови однаковий (рис. 25, 26). Автоклав – це металевий котел, здатний витримувати високий тиск (рис. 25). Внутрішня частина котла – стерилізаційна камера (1). В ній є отвори, з'єднані з краном виходу повітря (2), з контрольним і контактним манометрами, що автоматично підтримує певний тиск, із запобіжним клапаном (4), який випускає надлишок пари, запобігаючи розриву автоклава.

Між подвійними стінками котла є простір – водопарова камера (5), яка заповнюється через лійку (6) водою. Водяна пара через отвір (7) потрапляє в стерилізаційну камеру і створює підвищений тиск. Показанням монومتра відповідає певна температура: 0,5 атм. – 115°C; 1,0 – 120°C; 1,5 – 127°C; 2,0 – 133°C. Надійної стерилізації досягають нагріванням за 120°C, тиску 1 атм. впродовж 20 хв. Температура в автоклаві і тривалість автоклавування визначаються складом поживних середовищ.

Дезинфекція

Хімічна стерилізація ґрунтується на згубній дії хімічних речовин на мікроорганізми. Якщо хімічні речовини застосовуються для знищення патогенних мікроорганізмів в об'єктах зовнішнього середовища (в приміщенні, на робочому місці, руках, робочій одежі), то в цьому випадку говорять про дезінфекцію.

Оскільки робота з мікроорганізмами проводиться з дотриманням повної стерильності, використовують різні засоби дезінфекції. Обробку всіх предметів у боксі здійснюють дезінфікуючими речовинами (дезінфектантами), котрі поділяють на декілька груп.

- Речовини, що містять активний хлор: 0,5–10% водні розчини хлораміну, 10% розчини гіпохлориту натрію та кальцію, 1% розчин дезаму, 0,1–10% хлорне вапно.
- Окисники: карбонові кислоти, пероксид водню (2–6%), ізопропіловий (60%), етиловий (70–80%) та n-пропіловий (50%) спирти, йодоформ, оксид пропілену.
- Феноли, продукти перегонки кам'яновугільної смоли: 3–5% фенол (карболова кислота), 3–10% лізол, крезол, крезолове мило, креолін.
- Альдегіди: формальдегід (40% водний розчин формаліну), глютаральдегід (1%).
- Бетапропіолактон (0,05%). Має велику віруліцидну дію, яка притаманна також йодоформу, етанолу, хлораміну.

При роботі у мікробіологічній та вірусологічній лабораторіях необхідно суворо дотримуватись правил асептики та антисептики.

Асептика – комплекс профілактичних заходів та прийомів, спрямованих на попередження проникнення мікроорганізмів на (в) певний об'єкт: досліджуваний матеріал, організм людини, бактеріологічний бокс, окремі приміщення, стерильний розчин. Вона передбачає використання стерильних інструментів та матеріалів, обробку рук, дотримання особливих санітарногігієнічних правил та прийомів роботи. Асептичні умови створюють за допомогою стерилізації, дезінфекції, антисептики.

Антисептика – спосіб хімічного та біологічного знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів, щоб запобігти зараженню. Як антисептики використовують різні хімічні речовини: 70% етиловий спирт, 5% спиртовий розчин йоду, 0,5–3% розчини хлораміну, 0,1% розчин перманганату калію, 0,5–1% розчини формаліну, 1–2% спиртові розчини метиленового синього або брильянтового зеленого. Хімічні сполуки порушують структуру амінокислот – найважливіших компонентів мікроорганізмів, а це в свою чергу викликає коагуляцію білків і призводить до загибелі мікроорганізмів.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні методи стерилізації, з'ясуйте їхні переваги і недоліки.
2. В яких випадках застосовують стерилізацію сухим жаром, пастеризацію?
3. Перелічіть послідовність операцій при автоклавуванні.
4. Назвати дезінфікуючі засоби, що застосовуються у мікробіологічній практиці.
5. На які групи поділяють дезінфікуючі речовини?
6. В чому полягає різниця між асептикою і антисептикою?
7. З якою метою застосовується асептика?
8. Назвіть різницю між природними і синтетичними середовищами.

9. Як поділяються середовища за консистенцією?
10. Які середовища називають елективними?
11. Яка послідовність приготування картопляного агару?

Матеріали і обладнання: бульби картоплі, агар-агар, хімічний стакан, електрична плитка, скальпель, марля, штатив з пробірками, закритими ватяними корками, пептон, м'ясо, вата, паперові фільтри, 20% Na_2CO_3 , лакмусовий папірець, автоклав, сушильна шафа, чашки Петрі, пробірки з ватяними корками, штатив для пробірок, скляні палички, піпетки, папір для обгортання чашок і піпеток, бактеріологічна петля, спиртівка, колба на 250 мл, марля, нитки, вата.

Тема 2. ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета: оволодіти технікою виділення чистої культури мікроорганізмів.

Завдання:

1. Виділити в чисту культуру збудників грибних хвороб із зразків рослин, відібраних в Ботанічному саду Поліського національного університету.
2. Здійснити мікроскопіювання та ідентифікацію грибних патогенів.

Частини рослини, які використовують для виділення патогена, поверхнево дезінфікують, промивають стерильною водою, розрізають на шматочки довжиною 1–2 см та розміщують в чашках Петрі з агар-агаром. Чашки вміщують в термостат за температури 20°C та щоденно проглядають. Як тільки міцелій починає проростати із зрізів і переходить на поживне середовище, його переносять на чисте поживне середовище в іншу чашку. Згодом патоген визначають за типом спороношення.

Визначення фітопатогенних грибів здійснюють переважно за морфологічними ознаками спор. Спори діагностують за забарвленням, формою, розміром, наявністю перетинок і типом проростання.

Якщо гриб, ізольований із уражених частин рослини, не утворює спороношення, застосовують методи стимуляції спороутворення (спеціальні поживні субстрати, певний режим освітлення і температури, високу вологість повітря).

Ідентифікація збудника хвороби включає три етапи:

- 1) виявлення і визначення збудника безпосередньо на хворій рослині;
- 2) виділення збудника в чисту культуру (якщо його не вдалось визначити на попередньому етапі) та його ідентифікація за морфологічними ознаками (морфологія спор, спороносців);
- 3) перевірка патогенності ізольованого гриба (у сумнівних випадках) щодо його здатності викликати хворобу у рослин.

Визначення фітопатогенних грибів базується на їх морфологічних ознаках. Особливе значення мають спори і видозміни міцелію. За наявності міцелію встановлюється лише грибна природа хвороби. Згодом, за виявлення на рослині спороношення, здійснюється мікроскопіювання об'єкта. У випадках відсутності спороношення структури гриба можна виявити в тканинах рослини. Для цього готують зрізи уражених тканин і вивчають під мікроскопом.

В окремих випадках для стимулювання спороутворення у збудників грибних захворювань використовують «вологі камери». Камерою може слугувати будь-який закритий посуд, в якому можна створити відносну вологість повітря 100%. Для цього придатні чашки Коха і чашки Петрі. Дно і кришку чашки вистилають вологим фільтрувальним папером. При цьому не можна допускати накопичення води на дні чашки, щоб не викликати загнивання матеріалу. Перед розміщенням у вологу камеру досліджуваного матеріалу ретельно мийуть проточною водою. Бульби, стебла та інші частини рослин поверхнево дезінфікують спиртом або перманганатом калію та розміщують у чашки для швидшого проростання міцелію на поверхні. При цьому ніж або скальпель періодично прожарюють. Листки розкладають в чашці або розділяють на частини.

Вологі камери витримують за температури 15–20°C. Якщо досліджуваний збудник добре росте і за нижчих температур, то встановлюють температуру 8–10°C, яка затримує розвиток сапрофітних грибів, що заважають виявленню збудника. Тривалість інкубації у вологій камері залежить від терміну, необхідного для утворення спор. Зазвичай цей період обмежений 1–3 днями, іноді триває до трьох тижнів. Впродовж інкубації контролюють вологість і за необхідності зволожують фільтрувальний папір в чашках.

Контрольні запитання

1. Які етапи включає ідентифікація збудників грибних патогенів?
2. Які середовища використовують для культивування фузаріїв?
3. За якими ознаками здійснюють визначення фітопатогенних грибів?
4. З якою метою використовують вологі камери за визначення грибних патогенів?
5. Назвіть послідовність виділення чистої культури грибних патогенів.

Матеріали та обладнання: мікроскопи, бактеріологічні петлі, предметні скельця, спиртівки, термостат, чашки Петрі з картопляним агаром.

Тема 3. ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета. Оволодіти методами виготовлення препаратів мікроорганізмів.

Ознайомитись з барвниками, які застосовують в мікробіологічній практиці. Здійснити ідентифікацію мікроорганізмів із отриманої чистої культури.

Завдання:

1. Виготовити препарат методом «роздавлена крапля» із чистих культур мікроорганізмів.
2. Виготовити препарат методом «висяча крапля» із мікробних культур, вирощених на рідкому поживному середовищі.
3. Виготовити фіксовані препарати із мікробних культур, вирощених на рідкому та щільному поживних середовищах.
4. Здійснити ідентифікацію мікроорганізмів, виділених в чисту культуру.

Найчастіше мікроорганізми в живому стані вивчають на препаратах: «роздавлена крапля», «висяча крапля» та методом «відбитків». На препаратах живих мікроорганізмів можна спостерігати за рухом, розмноженням, утворенням і проростанням спор тощо.

Метод «роздавленої краплі»

На середину стерильного предметного скельця наносять бактеріологічною петлею краплину стерильної води, в яку вносять культуру мікроорганізма і змішують з водою (рис. 6). Краплину накривають покривним скельцем так, щоб під ним не утворювались пухирці повітря. Скляною паличкою притискають покривне скло до предметного і видаляють надлишок води фільтрувальним папером. При вивченні препарату під мікроскопом в імерсійній системі на покривне скельце наносять краплю кедрової олії.

Метод «висячої краплі»

Метод «висячої краплі» застосовують для тривалих спостережень за клітинами мікроорганізмів. На стерильне покривне скельце наносять препарувальною голкою нещільну суспензію мікроорганізмів, вирощених у рідкому поживному середовищі. Покривне скло перевертають і кладуть на стерильне предметне, з лункою посередині так, щоб краплина вільно звисала над лункою. Для герметичності краї лунки змащують вазеліном.

При дослідженні клітин мікроорганізмів методами «роздавленої» і «висячої» крапель застосовують барвники: метиленовий синій, нейтральний червоний в концентрації від 0,001 до 0,0001% (вітальне забарвлення).

Препарати вивчають під мікроскопом у сухій та імерсійній системах.

Препарат «відбитків»

Для виготовлення препарату «відбитків» із агарового середовища в чашці Петрі скальпелем вирізають блок із досліджуваної колонії мікроорганізмів, переносять його на предметне скло колонією догори. На колонію кладуть покривне скельце, обережно натискаючи на нього пінцетом і відразу знімають. Покривне скельце відбитком вниз вміщують у краплину води на іншому предметному склі. Препарат розглядають під мікроскопом у сухій та імерсійних системах.

Фіксовані препарати мікроорганізмів

В мікробіологічній практиці часто застосовують фіксовані препарати мікроорганізмів. Їх розглядають під мікроскопом забарвленими. *Фіксація* – це така обробка живого об'єкта, яка надає можливість швидко перервати життєві процеси в ньому, зберігаючи його тонку структуру. В результаті фіксації клітини

міцно прикріплюються до скла, ліпше фарбуються. Фіксація необхідна і для безпечної роботи з патогенними мікроорганізмами.

Виготовлення мазка

Фіксація мазка. Висушений мазок фіксують. Мета фіксації – вбити мікроорганізми, прикріпити їх до скла і поліпшити наступне фарбування. Для цього скло тримають за ребра мазком догори і проводять його 4–5 разів крізь найбільш гарячу частину полум'я спиртівки. Фіксують мазки також хімічними речовинами – етиловим чи метиловим спиртами, ацетоном та їхніми сумішами.

Фарбування мазка. В мікробіологічній практиці застосовують прості і складні методи фарбування. За простого забарвлення використовують один барвник, при складному – різні. Для фарбування мікробних клітин використовують кислі (цитоплазматичні), основні (ядерні) барвники. Кислі барвники вступають в реакцію з речовинами лужної, лужні – кислотної природи. Оскільки в білках є лужні (NH_2) і кислотні (COOH) радикали, клітинні структури добре фарбуються обома барвниками.

Із основних (лужних) барвників найчастіше в мікробіології використовують: червоні – нейтральний червоний, піронін, сафранін, фуксин, гематоксилін, тіонін; сині – метиленовий синій, вікторія; фіолетові – генціан фіолетовий, кристалічний фіолетовий, метиленовий фіолетовий; зелені – метиленовий зелений, малахітовий зелений; коричневі – везувін, хризоїдин; чорні – індулін. Кислі барвники: червоні-рожеві – кислий фуксин, еритрозин; чорні – нігрозин; жовті – конго, флуоресцин.

При фарбуванні мазка препарат кладуть на штатив. На мазок наносять декілька крапель барвника. В залежності від виду барвника і мети дослідження тривалість фарбування варіює від однієї до 5 хвилин, в окремих випадках до 30 хв. і довше. Тривалість фарбування для фуксину червоного – 2 хв., сафраніну –

2 хв., метиленового синього – 5 хв. Після цього препарат промивають дистильованою водою, мазок промокають фільтрувальним папером, вивчають препарат під мікроскопом в імерсійній системі.

Фарбування живих мікроорганізмів. Живі мікроорганізми фарбують малоотруйними фарбами (метиленова синька, нейтральрот та інші) в низьких концентраціях: 1:1000, 1:10 000, 1:100 000. На предметне скло наносять краплину мікробної культури та краплину фарби, змішують мікробіологічною петлею, накривають покривним скельцем та мікроскопіюють.

Контрольні запитання

1. Яка послідовність виготовлення фіксованих препаратів?
2. Назвіть методи дослідження живих мікроорганізмів.
3. Чим відрізняються лужні і кислі барвники?
4. Назвіть прості і складні методи фарбування.
5. Яка послідовність виділення чистої культури мікроорганізмів?

Матеріали і обладнання: мікробні культури, вирощені на щільному та рідкому поживних середовищах, бактеріологічні петлі, предметні та покривні

скельця, мікроскопи, імерсійна олія, вазелін, предметні скельця з луночками, барвники, спиртівки, штативи для скелець.

Тема 4. ВІЗУАЛЬНИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ФІТОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Мета: ознайомити студентів із симптомами вірусного ураження на рослинах, плодах, насінні; навчити відрізняти симптоми вірусної природи від симптомів, що викликаються іншими збудниками.

Завдання:

1. Відібрати в Ботанічному саду Поліського національного університету зразки рослин з ознаками вірусних захворювань. Описати симптоми на листках, стеблах, генеративних органах.
2. В ботанічному саду відібрати за візуальними ознаками лікарські рослини, що уражені ВТМ, обчислити відсоток уражених рослин.

До основних методів діагностики фітопатогенних вірусів відносять прямі методи – електронна мікроскопія, метод виявлення включень і непрямі – метод рослин-індикаторів, серологічні та імунологічні методи. Найчастіше використовують комплекс методів.

За допомогою візуальної діагностики відбирають рослини з ознаками вірусного ураження. Фітопатогенні віруси, викликаючи зміну форм і забарвлення листкових пластинок, порушують ріст і розвиток як окремих вегетативних та генеративних органів, так і рослини в цілому.

Симптоми вірусних хвороб рослин

Мозаїки. Одним із найбільш розповсюджених симптомів на листках є поява світло- і темно-зелених ділянок, що утворюють мозаїчний візерунок. Межі між темними і світлими ділянками можуть бути чіткими, або розпливчатими. Залежно від розміщення мозаїчних плям розрізняють наступні різновиди мозаїк:

- звичайна мозаїка – світло-зелені плями, чітко обмежені або розпливчаті, безладно чергуються з темно-зеленими ділянками (вірус Х картоплі);
- міжжилкова мозаїка – між жилками виділяються світлі ділянки, при цьому прилеглі до жилок тканини листка залишаються зеленими (мозаїка суниці);
- сітчаста мозаїка – на листках з'являється світла або жовта сітка, по жилках спостерігається посвітління або пожовтіння (посвітління жилок суниці);
- жовта мозаїка – безладно розташовані яскраво-жовті плями на листках, здебільшого обмежені жилками (аукуба-мозаїка на картоплі);
- мармурова мозаїка – світло-зелені або жовті смуги, котрі іноді пересікають жилки;
- кільцева мозаїка – на листках світло-жовті кільця або замкнені лінійні узорі, іноді з некротичною облямівкою (кільцева мозаїка тютюну, кільцева плямистість томату, кільцева плямистість суниці);

- смугаста мозаїка – поздовжні світло-зелені, жовті смуги, або ланцюжки дрібних плям на листках злаків і деяких лілійних (смугаста мозаїка пшениці, мозаїка цибулі, жовта карликовість цибулі, мозаїка лілій).

Хлороз – дифузне пожовтіння тканин листової пластинки.

Найчастіше зустрічаються наступні різновиди хлорозу:

- загальний хлороз – жовтувате забарвлення всієї листової пластинки, жилки не виділяються (скручування листів картоплі, бавовника);
- міжжилковий хлороз – пожовтіння тканин між жилками (жовтяниця бурияка, хлороз малини);
- верхівковий хлороз – пожовтіння листків лише верхівкової формації (верхівковий хлороз махорки).

Некроз.

Найважчим наслідком вірусної інфекції для рослини є утворення - некрозів. Некроз – це відмирання клітин, тканин, а також загибель рослини. Виявляється він у вигляді окремих плям, кілець, візерунків, смуг та штрихів. Форма і зовнішній вигляд некрозу залежить від рослини, вірусу та умов зовнішнього середовища. Іноді некротизація виникає дуже швидко і розповсюджується по всій рослині. Некрози можуть з'являтися не тільки на зелених частинах рослини, але і на етіюльованих листках, гіпокотиллях, плодах (шарка сливи), насінні і навіть на коренях. Некрози бувають локальними – з'являються на інокульованих листках, а також системними при перміщенні вірусу від місця інокуляції в інші частини рослини.

За мозаїкою і хлорозом часто настає відмирання тканин рослин, але нерідко некроз розвивається самотійно:

- місцеві некрози утворюються в точках проникнення інфекції в рослину, яка має надчутливість до даного збудника. В природних умовах місцеві некрози спостерігаються в місцях уколів листка стилетами комах. Вірус із місцевих некрозів може розповсюджуватись по всій рослині (У – вірус картоплі);
- системний (розсіяний некроз) може проявлятися на будь-яких частинах і органах рослини (листках, стеблах, зав'язях, плодах) у вигляді бурих, буровато-чорних або чорних плям, смуг, рисок, кілець. Різновиди системного некрозу: некротичний малюнок на листках у вигляді тонких рисок і дуг, почорніння жилок з нижньої сторони листка (стрик томата);
- верхівковий некроз – відмирання верхівок пагонів або проростків, пазушних бруньок (жовта карликовість картоплі).

Внутрішній некроз бульб картоплі не може бути віднесений ні до однієї із вищеописаних груп і складає окрему групу з наступними різновидами:

- концентричний некроз – на розрізі бульби спостерігаються темно-бурі смуги, кільця. Іноді вдавнені смуги і кільця видно з поверхні бульби;
- плямистий некроз – бурі плями різного розміру, безладно розкидані в м'якуші бульби (вірус аукуба-мозаїки картоплі);
- сітчастий (судинний) некроз – побуріння судин бульби, особливо в пуповинній частині (вірус скручування листя картоплі, вірус жовтої карликовості картоплі).

Деформації органів рослин при вірусних інфекціях досить різноманітні і можуть бути викликані різними фізіологічними порушеннями :

а) порушення формоутворюючих процесів – зміни форми листкової пластинки, ниткоподібність листя, веретеноподібність бульб;

б) невідповідність швидкості росту різних частин листка або рослини в цілому – зморшкуватість, складчатість, гофрування, пухирчасті здуття листка, викривлення листків і пагонів (зморшкувата мозаїка на картоплі, вірус огіркової мозаїки на тютюні);

в) порушення відтоку асимілятів із листків внаслідок ураження флоєми (скручування листків картоплі, бавовника);

Пригнічення росту може виражатись в загальній карликовості рослин, укороченні міжвузлів на верхівці пагона, пригніченні росту головних пагонів при посиленні росту бічних пагонів (аспермія томату);

В'янення спостерігається при сильному ураженні судинної системи (плямисте в'янення томату, некроз тютюну);

Новоутворення – пухлини на різних органах рослин (вірус раневих пухлин), листкоподібні вирости (енації) (деформуюча мозаїка гороху, аспермія томату);

Абортивність – опадання квіток і зав'язей, усихання плодів або окремих насінин в плодах (мозаїка бобових), безнасінність плодів (аспермія томата).

Антоціаноз – пурпурове, червоно-фіолетове забарвлення листків або жилок, стебел (скручування листків картоплі, аспермія томату);

Строкатість – нерівномірність забарвлення або часткове знебарвлення пелюсток.

На ураженій рослині може бути не одна патологічна ознака, а сукупність симптомів, які змінюються з розвитком хвороби і віком рослини. Тому, для правильного діагностування, симптоми хвороби необхідно досліджувати впродовж всього вегетаційного періоду.

За допомогою візуальної діагностики визначається розповсюдженість вірусних хвороб в агроценозах. При цьому обстежується не менше 10% площі виробничої культури, на дослідних ділянках – усі рослини. Відносна кількість хворих рослин визначається за формулою:

$$P = n \times 100 / N,$$

де P – відсоток уражених рослин; n – кількість рослин із симптомами захворювання, шт. або %;

N – загальна кількість обстежених рослин, шт. або %.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте основні симптоми вірусних хвороб рослин.
2. Назвіть різновиди мозаїк.
3. Як визначити розповсюдженість вірусних хвороб в агроценозах?
4. Від яких чинників залежить форма і зовнішній вигляд некрозу?

Матеріали та обладнання: рослини з ознаками вірусних хвороб, відібрані в ботанічному саду.

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ

Залік з навчальної практики передбачає захист звіту з практики. Обсяг звіту становить 8-10 сторінок. Підготовка до захисту звіту – це формування здобувачем освітнього ступеня доповіді та презентаційних матеріалів за результатами практики. Презентаційний матеріал розроблюється здобувачем освітнього ступеня, як правило, у програмі Microsoft Power Point, кількість слайдів – 8-10 шт.

Захист звіту з навчальної практики відбувається відповідно до розкладу, затвердженого деканатом агрономічного факультету. Студенти, які виконали всі завдання згідно програми практики, захистили звіт, отримують залік в останній день практики. Підсумкова (залікова) оцінка визначається як середнє арифметичне усіх оцінок, отриманих щодня упродовж навчальної практики та оцінки за звіт. Всього за підсумками практики студент може отримати максимально 100 балів. Залік виставляється, якщо студент набрав не менше ніж 60 балів.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Люта В. А., Кононов О. В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія : підручник (ВНЗ I-III р. а.). Вид. 2-е. Київ, 2018. 576 с.
2. Практикум з мікробіології / Ф. Ж. Ібатулліна та ін. К.: ЦП «Компринт», 2016. 273 с.
3. Широбоков В. П., Климнюк С. І. Практична мікробіологія : навч. посіб. К. : Нова книга, 2018. 584 с.
4. Капрельянц Л. В., Єгорова А. В., Труфкаті Л. В. Лабораторний практикум з загальної мікробіології та вірусології : навч. посіб. Одеса, 2018. 136 с.
5. Мікробіологія / за ред. Філімонової Н. І. Харків, 2019. 676 с.
6. Практична мікробіологія : навчальний посібник / І. В. Іващенко та ін. Житомир: Поліський національний університет, 2023. 129 с.
7. Практична мікробіологія / С. І. Климнюк С. І. та ін. Тернопіль: Укрмедкнига, 2020. 440 с.
8. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології. К.: Либідь, 2001. 312 с.
9. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології. К.: Либідь, 2001. 142 с.
10. Мікробіологія : підручник для студентів вищих навчальних закладів / І. Л. Дикий та ін.; за ред. І. Л. Дикого. Харків : Вид-во НФаУ, 2006. 432 с.
11. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навч. посібник. К.: Поліграфконсалтинг, 2005. 320 с.
12. Мікробіологія / М. Г. Сергійчук та ін. К.: «Київський університет», 2005. 375 с.

13. Практикум із загальної вірусології : навч. посіб. / А. Л. Бойко та ін.; за ред. А. Л. Бойка. К.: Видавничий центр «Київський університет», 2000. 269 с.
14. Токарчук Л. В. Методичні вказівки до практикуму із вірусології для студентів біологічного факультету. Київ, 2000. 160 с.
15. Переносники вірусів рослин : навч. посібник. / А. Є. Рижкова та ін. К. : Фітосоціоцентр, 2002. 68 с.
16. Харіна А. В., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П. Вступ до хіміотерапії вірусних інфекцій : навч. посібник. К. : Фітосоціоцентр, 2003. 144 с.
17. Вірусні інфекції картоплі / Міщенко Л. Т. та ін. Київ : Фітосоціоцентр, 2011. 144 с. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України / В. П. Поліщук та ін.; за редакцією В. П. Поліщука. К. : Фітосоціоцентр, 2001. 220 с.
18. Іващенко І. В. Антимікробна активність етанольного екстракту *Serratula coronata* L. (Asteraceae) за інтродукції в Житомирському Поліссі. Біологічний вісник МДПУ. 2016. Т. 6, № 1. С. 290–303. DOI : 10.15421/201616.
19. Ivashchenko I. V. Chemical composition of essential oil and antimicrobial properties of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae). *Biosystems Diversity*. 2017. Vol. 25, no. 2. p. 119–123. DOI : 10.15421/011.
20. Ivashchenko I. V. Antimicrobial properties of *Tanacetum balsamita* L. (Asteraceae) introduced in Ukrainian Polissya. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 52–57. DOI : 10.15421/201706.
21. Іващенко І. В., Рахметов Д. Б., Іващенко О. А. Антимікробні властивості *Artemisia dracuncululus* L. (Asteraceae) при інтродукції в Поліссі України. *Інтродукція рослин*. 2015. №2. С. 88–95.

Електронні інформаційні ресурси

1. Український біологічний сайт URL: <http://www.biology.org.ua/>.
2. Житомирська обласна універсальна наукова бібліотека імені Олега Ольжича Житомирської обласної ради. URL : <https://www.lib.zt.ua/>.
3. Бібліотека Поліського національного університету.
URL: http://lib.polissiauniver.edu.ua/jirbis2/index.php?option=com_content&view=article&id=229&Itemid=489.
4. Наукова бібліотека НУБіП. URL : <https://nubip.edu.ua/structure/library>.
5. Національна наукова сільськогосподарська бібліотека Національної академії аграрних наук України URL : <https://dnsgb.com.ua/>.
6. Національна бібліотека України імені Ярослава Мудрого.
URL: <https://ube.nlu.org.ua/>.
7. Івано-Франківська обласна універсальна наукова бібліотека ім. І. Франка.
URL : <https://franko.libs.net.ua/>.
8. Вінницька обласна універсальна наукова бібліотека імені Валентина Отамановського. URL : <https://opac.library.vn.ua>.
9. Бібліотека імені В.І. Вернадського. URL: <http://www.nbu.gov.ua>.

10.Бібліотека ім. Л. Каніщенка ЗУНУ

URL: <http://library.wunu.edu.ua/index.php/uk/component/search/?s>.