



**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ЛАБОРАТОРНИХ
РОБІТ З ДИСЦИПЛІНИ
«СУЧАСНІ МЕТОДИ ТА ОРГАНІЗАЦІЯ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ
БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ В АГРАРНІЙ СФЕРІ»**
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
спеціальності *091 Біологія та біохімія*



Методичні рекомендації підготувала:
кандидат с.-г. наук, доцент Даценко А.А.

Рецензент: – Улянич О.І., доктор с.-г. наук, професор кафедри
овочівництва Уманського НУС

Методичні рекомендації схвалено на засіданні кафедри біології
(протокол від 6 серпня 2024 року № 1).

Схвалено науково-методичною комісією факультету
плодоовочівництва, екології та захисту рослин (Протокол від 9 серпня
2024 року № 1).

Методичні рекомендації до лабораторних занять з дисципліни «Сучасні
методи та організація наукових досліджень біологічних об'єктів в аграрній
сфері» для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
спеціальності 091 *Біологія та біохімія*. А.А. Даценко, Л.В. Розборська.
2024. 34 с.

3
ЗМІСТ

Лабораторна робота №1. СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ У ДОСЛІДНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ.....	6
Лабораторна робота № 2. МЕТОДИ ВІДБОРУ ТА ПІДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ПЕВНОГО ТИПУ ДОСЛІДЖЕНЬ. СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ, ЛАБОРАТОРНОГО ПОСУДУ, ПРИМІЩЕННЯ.....	12
Лабораторна робота № 3. ОСОБЛИВОСТІ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ РОСЛИН НА КЛІТИННОМУ ТА ОРГАНІЗМОВОМУ РІВНЯХ РОСЛИННА КЛІТИНА ЯК ОСМОТИЧНА СИСТЕМА.....	15
Лабораторна робота № 4. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВОДИ ТА СУХИХ РЕЧОВИН У РІЗНИХ ЧАСТИНАХ РОСЛИНИ.....	17
Лабораторна робота № 5. ПРИГОТУВАННЯ ВИТЯЖКИ РОСЛИННИХ ПІГМЕНТІВ ТАЇХ РОЗПОДІЛ ЗА Г.КРАУСОМ.....	19
Лабораторна робота № 6. ФОТОСИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У РОСЛИННОМУ ОРГАГІЗМІ. ВИДІЛЕННЯ КИСНЮ ЗЕЛЕНОЮ РОСЛИНОЮ НА СВІТЛІ.	21
Лабораторна робота № 7. ТЕРМОРЕГОЛЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ РОСЛИНИ. ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ПРОДИХОВИХ КОМПЛЕКСІВ ЛИСТКІВ МЕТОДОМ ВІДБИТКІВ.....	23
Лабораторна робота № 8. АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ СИСТЕМИ ДИХАННЯ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТІВ.	25
Лабораторна робота № 9. ВИЯВЛЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИННИХ ЗРАЗКАХ ПОЛЬОВИХ КУЛЬТУР.....	27
Лабораторна робота № 10. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО АЗОТУ В НАСІННІ ТА ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН	29
Лабораторна робота № 11. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АМІЛАЗИ ЗА СМІТОМ, РОЄМ	31

Мета та завдання навчальної дисципліни

Навчальна дисципліна «Сучасні методи та організація наукових досліджень біологічних об'єктів в аграрній сфері» належить до основних дисциплін, вивчення яких передбачено освітньо-професійною програмою «Агробіологія» підготовки фахівців другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 091 Біологія та біохімія галузі знань 09 Біологія та Біохімія.

Метою викладання курсу навчальної дисципліни «Сучасні методи та організація наукових досліджень біологічних об'єктів в аграрній сфері» є формування методології проведення наукових досліджень, формування уявлень, знань і навичок надання знань та вміння, що створюють необхідне методологічне підґрунтя для здійснення фахової науково-дослідницької роботи та її презентації науковій спільноті. Ознайомлення студентів з сучасними методами біологічних досліджень, підготовка фахівців, які здатні вирішувати задачі певної спеціалізованої складності, презентації отриманих знань та застосування навиків у практичних проблеми у галузі біології, як у професійній, так і у дослідницькій та інноваційній діяльності у певних сферах народного господарства.

Завданням вивчення дисципліни є:

- надати знання про методи, види та основні етапи проведення наукових досліджень, пов'язаних з вивченням біологічних властивостей, закономірностей взаємодії в навколишньому середовищі;
- сформувати у студентів здатність використовувати новітні досягнення у різних галузях біології в їх професійній діяльності;
- сформувати навички щодо використання світової наукової інформації та комунікаційних технологій у міжнародному контексті;
- сформувати здатність на базі отримання всебічної новітньої інформації формувати власні ідеї у вирішенні поставлених науково-дослідних задач у галузі біології;
- сформувати у студентів вміння проводити експериментальні дослідження з застосуванням комплексу різних біологічних методів для вирішення поставлених біологічних задач;
- сформувати у студентів розуміння етапів підготовки до проведення науково-дослідної роботи за певною темою, створення модельних систем для проведення досліджень, оволодіння понятійним апаратом, сформувати

здатність до статистичної оцінки отриманих даних та їх обговорення з використанням даних світових досліджень у цьому напрямку;

- сформувати у студентів алгоритм представлення презентації отриманих даних на наукових конференціях вітчизняного та світового рівнів, активувати навички коректної форми ведення наукової дискусії з урахуванням етичних міркувань, академічної доброчесності.

Місце дисципліни у структурно-логічній схемі підготовки здобувачів вищої освіти: нормативна навчальна дисципліна «Сучасні методи та організація наукових досліджень біологічних об'єктів в аграрній сфері» є обов'язковою складовою циклу професійної підготовки фахівців освітньо-кваліфікаційного рівня «магістр», є базовою для вивчення таких спеціальних дисциплін як «Біохімія сільськогосподарських культур», «Інтегративна регуляція фізіологічних функцій», «Анатомія рослин», «Інтегративна регуляція фізіологічних функцій». Методи та прийоми сучасних досліджень біологічних об'єктів в аграрній сфері можуть застосовуватись як у дослідженнях суміжних наук, так і в міждисциплінарних.

Лабораторна робота №1.
СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ РОБОТИ У ДОСЛІДНІЙ
ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ.

Тема: Організація мікробіологічної лабораторії. Правила техніки безпеки при роботі з мікроорганізмами. Методи підготовки і стерилізації мікробіологічного посуду і матеріалів. Харчові потреби мікроорганізмів.

Мета заняття. Ознайомлення з організацією мікробіологічної лабораторії, технікою безпеки і правилами роботи в ній; ознайомлення з принципами і методами стерилізації; ознайомлення з потребами мікроорганізмів у поживних речовинах, принципами складання та стерилізації поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.

Практичні завдання

1. Ознайомитись з структурою бактеріологічної лабораторії і правилами роботи в ній.

2. Ознайомитися з пристроями, що використовуються для стерилізації посуду, поживних середовищ, повітря (автоклав, сушильна шафа, фільтри, бактерицидні лампи).

3. Підготувати до стерилізації пробірки, піпетки, чашки Петрі.

4. Підготувати для стерилізації пробірки з водопровідною водою (по 9 мл).

5. Приготувати 500 мл МПА згідно інструкцій (з них 100 мл розлити по пробіркам по 5 мл), підготувати його до стерилізації.

Матеріали та обладнання: піпетки, колби конічні та круглі плоскодонні, пробірки, чашки Петрі, папір, м'ясо-пептонний агар.

Студенти повинні знати

- сучасне лабораторне устаткування і апаратуру,
- основні правила роботи в мікробіологічній лабораторії,
- методику мікробіологічних досліджень, питання їх планування і організації;
- техніку безпеки при проведенні мікробіологічних робіт в лабораторних умовах;
 - принципи та методи стерилізації,
 - основні правила підготовки посуду і матеріалів до стерилізації,
 - потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту);
 - типи поживних середовищ за їх складом та призначенню;
 - загальні вимоги до поживних середовищ;
 - принципи складання та правила стерилізації поживних середовищ.

Студенти повинні вміти: застосовуючи дані про рецептуру, виготовляти поживне середовище для заданої групи мікроорганізмів, використовуючи систематизовані дані про принципи стерилізації, проводити стерилізацію.

Студенти повинні мати навички: техніки приготування та підготовки до стерилізації поживних середовищ.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Облаштування мікробіологічної лабораторії і правила роботи в ній: - облаштування лабораторій з різним ступенем безпеки;
 - підготовка лабораторії до роботи;
 - ламінарні бокси;
 - правила роботи з культурами мікроорганізмів;
 - обробка використаних культур і посуду;
 - ведення журналу лабораторних досліджень.
2. Мікробіологічний посуд і поживні середовища.
3. Методи стерилізації (автоклавування (з описанням будови автоклаву); пастеризація; стерилізація сухим жаром; стерилізація газовими сумішами;
4. Потреби мікроорганізмів у поживних речовинах (макро- і мікроелементи, фактори росту). Типи поживних середовищ (за походженням, консистенцією призначенням).

Структура бактеріологічної лабораторії

Бактеріологічна лабораторія - це комплекс приміщень, обладнання і приладів, що дозволяють використовувати різноманітні методи дослідження мікроорганізмів. Лабораторія включає кімнати для мікробіологічних досліджень та підсобні приміщення:

а) кімнати для мікробіологічних досліджень (робочі кімнати) - світлі, просторі, стіни покриті кахельною плиткою, підлога - лінолеумом або плиткою; лабораторні столи добре освітлені і обладнані газовою горілкою або спиртівкою, а також штативом для пробірок і інших приналежностей, необхідних для проведення конкретної роботи.

б) підсобні приміщення – автоклавна (стерилізаційна), мийна, кімната для готування поживних середовищ, матеріальна (для зберігання реактивів, посуду, апаратури та інвентарю), віварій для піддослідних тварин.

Правила роботи та техніка безпеки у мікробіологічній лабораторії

- ◆ забороняється входити в верхньому одязі та класти на столі сумки та інші особисті речі;
- ◆ дозволяється працювати тільки при наявності спецодягу (халат, тапочки);
- ◆ робоче місце мікробіолога повинно утримуватись в повному порядку;
- ◆ в ході роботи необхідно притримуватись стерильності (бактеріологічні петлі знезаражувати в полум'ї спиртівки, використанні піпетки занурювати з дезрозчином та ін.);
- ◆ в лабораторії заборонено приймати їжу;
- ◆ не допускаються зайві переміщення, різкі рухи, сторонні розмови;
- ◆ у випадку попадання досліджуваного матеріалу на руки, стіл, халат необхідно провести дезінфекцію під наглядом викладача;
- ◆ після закінчення дослідження робоче місце ретельно прибирається, використаний матеріал та ін. предмети здаються лаборанту, миються з милом руки.

Стерилізація. Методи стерилізації

Повне звільнення будь-якого матеріалу від живих мікроорганізмів та їх спор називається *стерилізацією*. Агенти, що викликають загибель мікробних клітин, називаються *бактерицидними*: висока температура,

променева енергія, деякі леткі хімічні сполуки. Рідини можна звільнити від мікроорганізмів фільтруванням.

а) стерилізація під дією високих температур:

- прокалювання в полум'ї горілки - фламбування; стерилізують бактеріологічні петлі, кінчики пінцетів та деякі інші металеві предмети;
 - стерилізацію кип'ятінням здійснюють у стерилізаторі; стерилізують шприці, металеві інструменти (ножиці, скальпелі, пінцети);
 - пастеризація (неповна стерилізація) – нагрівання рідин до температури нижче 100 0С (при 60 0С протягом 30 хвилин, при 75 0С протягом 15 хвилин або при 80 0С протягом 10 хвилин); пастеризують продукти харчування;
 - стерилізація сухим жаром здійснюється в сушильних шафах; стерилізують скляний посуд при температурі 160-165 0С протягом 2 годин;
 - стерилізація насиченою парою під тиском (автоклавування) найбільш надійний та універсальний спосіб стерилізації поживних середовищ і матеріалів; повна стерилізація поживних середовищ при 120 0С і тиску 1 атм. забезпечується протягом 20 хвилин; - стерилізація текучою парою (дрібна стерилізація) здійснюється у апаратах Коха або у автоклаві з відкритим вентиляем; температура досягає 100 0С і нагрівання протягом 30-45 хв. забезпечує загибель вегетативних клітин бактерій, але загибелі спор не забезпечує. Повна стерилізація здійснюється протягом 3 днів;
- б) стерилізація опроміненням – використовують ультрафіолетові промені бактерицидної лампи; в) хімічна стерилізація (дезінфекція): спирт, фенол, H₂O₂ та ін.; г) стерилізація фільтруванням – використовується для поживних середовищ, що містять термолабільні (вітаміни, амінокислоти) компоненти, які швидко руйнуються під дією високих температур.

Харчові потреби мікроорганізмів

Мікроорганізмам, як і усім іншим організмам, необхідним є набір різних хімічних елементів. Деякі елементи – С, N, H, P, O, S, Ca, Mg, K, Fe необхідні у відносно великих кількостях і тому їх відносять до макроелементів, інші – Zn, Mn, B, Cu, J – у слідових кількостях, тому їх називають мікроелементами. Окрім того, деяким мікроорганізмам необхідні певні готові органічні сполуки, які називають фактори росту.

Виходячи із харчових потреб мікроорганізмів, для їх вирощування у лабораторних умовах створюють поживні середовища, які являють собою комплекс органічних і мінеральних речовин, що забезпечують ріст і розвиток мікроорганізмів.

Поживні середовища мають виключне значення у мікробіології. Правильний підбір складу середовища забезпечує можливість виділення мікроорганізмів із місць їх мешкання, отримання чистих культур, вивчення їх морфології і біохімічних особливостей, сприяють швидкій і правильній діагностиці інфекційних захворювань, дають можливість отримувати біомасу корисних для народного господарства мікроорганізмів.

Вимоги, що висуваються до поживних середовищ

1. До складу середовищ мають входити усі необхідні для мікроорганізму джерела живлення.

2. Окремі інгредієнти у поживні середовищах мають бути у певних співвідношеннях, що приблизно відповідають співвідношенню їх у клітині.

3. Середовища повинні мати достатню вологість, що забезпечує можливість дифузії поживних речовин у клітину.

4. Середовища повинні мати певну кислотність, величина якої різна для певних груп мікроорганізмів. 5. Середовища повинні мати певний окисно-відновний потенціал, який визначає насиченість середовища киснем і позначається rh_2 .

6. Середовища повинні бути ізотонічними для мікробної клітини, тобто осмотичний тиск у середовищі має бути таким самим, як усередині клітини.

7. Середовища повинні бути стерильними, щоб забезпечити ріст чистих культур мікроорганізмів. Оскільки потреби мікроорганізмів надзвичайно різноманітні, неможливо скласти універсальне середовище, оптимальне для росту усіх мікроорганізмів.

За походженням і складом поживні середовища можна розділити на *натуральні (або природного походження), синтетичні (штучні) і напівсинтетичні*

1. *Натуральні середовища* бувають рослинного і тваринного походження. Вони містять у своєму складі усі інгредієнти, необхідні для росту і розвитку мікроорганізмів. Склад цих середовищ не визначений. Такими середовищами є відвари злаків, трав, овочеві і фруктові соки, молоко, тваринні тканини, кров, сироватка, сеча, відвари м'яса, вода морів, озер і мінеральних джерел, дріжджовий автолізат, м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) і м'ясо-пептонний агар (МПА).

2. *Синтетичні середовища* готують із певних хімічно чистих сполук у точно вказаних концентраціях. З їх допомогою можна визначити, які речовини і у якій кількості поступають у клітину, зміну цих речовин під впливом мікроорганізмів, виявити метаболіти, що виділяються мікробними клітинами у процесі життєдіяльності. Тому на таких середовищах вивчають обмін речовин мікроорганізмів. Переваги синтетичних середовищ полягають також у тому, що їх можна чітко відтворити. Прикладом синтетичного середовища є середовище Чапека для пліснявих грибів, середовище Ешбі для виділення азот фіксуючих мікроорганізмів.

3. *Напівсинтетичні середовища* мають складний і невизначений склад. Компонентами цих середовищ разом із сполуками відомого складу (вуглеводи, фосфати і др.) є натуральні продукти невизначеного складу – м'ясний відвар, дріжджовий екстракт, пивне сусло. Такі середовища часто застосовуються для вирощування мікроорганізмів у лабораторних і промислових умовах.

За призначенням середовища поділяють на: **загальноновживані і спеціальні**. 1. *Загальноновживані або середовища загального призначення*. На таких середовищах вирощуються і накопичують біомасу багато мікроорганізмів. Це МПА.

2. *Спеціальні середовища або середовища спеціального призначення.* Ці середовища призначені для виявлення тих чи інших біохімічних особливостей мікроорганізмів або для отримання культур мікроорганізмів, що характеризуються особливими властивостями. Серед спеціальних середовищ розрізняють *елективні (вибіркові) і диференційно-діагностичні (індикаторні) середовища.*

Елективні середовища підібрані таким чином, щоби забезпечити найсприятливіші умови для вирощування певних мікроорганізмів. У них можуть бути добавлені речовини, що вибірково пригнічують ріст супутньої мікробіоти. При посіві на них матеріалу, у якому присутні мікроорганізми різних груп, найшвидше будуть рости ті мікроорганізми, для яких дане середовище буде вибірково. Такі середовища використовують для виділення мікроорганізмів із місць їх природного мешкання або для отримання накопичувальних культур. До них відноситься середовище Ешбі. *Диференційно-діагностичні середовища* використовують для визначення видової приналежності досліджуваного мікроорганізму, опираючись на особливості його обміну речовин. Склад цих середовищ дозволяє чітко виявити найхарактерніші властивості досліджуваного мікроорганізму. До таких середовищ відносяться середовища з молоком, кров'ю, желатиною, на яких виявляють протеолітичні і гемолітичні властивості мікроорганізмів. До складу диференційно-діагностичних середовищ, призначених для виявлення цукролітичних і окисно-відновних ферментів, вводять індикатори. Прикладом таких середовищ є середовище Ендо, яке використовується для виділення і визначення бактерій кишкової групи.

Середовища розрізняють за **консистенцією**. Використовуються рідкі, сипучі і щільні середовища.

Рідкі середовища використовують для накопичення біомаси або продуктів обміну мікроорганізмів, для відновлення культур, що довго зберігалися, для підтримки і зберігання тих культур, які погано ростуть на щільних середовищах. На рідких середовищах легше виявляються фізіолого-біохімічні особливості мікроорганізмів.

Сипучі середовища використовують переважно у промисловій мікробіології. Це розварене пшоно, висівки, кварцовий пісок, просочені поживними розчинами.

Щільні середовища необхідні для виділення і описання культуральних властивостей чистих культур мікроорганізмів, для зберігання культур, визначення низки їх властивостей і т.д. Щільні середовища готують із рідких, додаючи до них агар-агар, кремнекислий гель (силікагель) чи желатин. Кращою гелеутворюючою речовиною є агар-агар. Для отримання щільних середовищ вводять у рідкі 1 – 2 % агар-агару. Середовище, у яке внесли агар-агар, нагрівають на водяній лазні до повного розчинення

останнього. Агаризовані середовища зберігають свої властивості після неодноразового плавлення і стерилізації.

Промисловим способом виготовляються деякі середовища у вигляді сухих порошків. Перевага таких середовищ в їх стандартності, стабільності, простоті приготування і зручності при транспортуванні.

Поживні середовища відразу після приготування стерилізують. Режим і спосіб стерилізації визначається складом середовищ і їх консистенцією. Звичайно середовища стерилізують у автоклаві.

Агаризовані середовища краще стерилізувати при тиску 98 кПа (1 атм) протягом 20 хвилин. Желатинові середовища стерилізують текучою парою три дні підряд, кожного дня по 30 – 40 хвилин, або в автоклаві при 49 кПа (0,5 атм.) протягом 30 хвилин. Рідкі поживні середовища можна стерилізувати фільтруванням. Якщо у складі середовища є субстрати, в яких можуть бути спори, що відрізняються особливою термостабільністю, то такі середовища звичайно стерилізують один раз при 147 – 196 кПа (1,5 – 2 атм) 2 год. або два дні підряд по годині при такому ж тиску, а інколи при 196 кПа (2 атм.) 2 год. До кожної ємності із середовищем обов'язково прикріплюють лист паперу із зазначенням назви середовища і часу його приготування. Підготовлені до використання поживні середовища перевіряють на стерильність. Зберігають поживні середовища у прохолодному, захищеному від світла і не надто вологому приміщенні.

Контрольні запитання:

1. Як розрізняють поживні середовища за консистенцією?
2. Що таке бактеріологічна лабораторія та яка її структура?
3. Які відомі методи стерилізації у лабораторних умовах?
4. Основні вимоги до складу поживних середовищ.
5. Що таке елективні поживні середовища?
6. Яка специфіка приготування агаризованих поживних середовищ?

Лабораторна робота № 2.

МЕТОДИ ВІБОРУ ТА ПІДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ПЕВНОГО ТИПУ ДОСЛІДЖЕНЬ. СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ, ЛАБОРАТОРНОГО ПОСУДУ, ПРИМІЩЕННЯ.

Тема: Відбір та підготовка проб для дослідження. Поверхнєве культивування і визначення чисельності бактерій у повітрі та ґрунті. Техніка посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомлення з потребами певних груп бактерій у поживних речовинах, способами посіву та культивування мікроорганізмів, технікою посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання Проби водопровідної води, терези, стерильна вода у пробірках і колбах для розведень, спиртівки, сірники, агар Горбенко стерильний в колбах, МПА, стерильні чашки Петрі, стерильні піпетки, скляні шпателі Дригальського стаканчики зі спиртом, олівці по склу.

Студенти повинні знати:

- способи посіву мікроорганізмів;
- культуральні властивості мікроорганізмів (ріст на щільних та рідких середовищах);
- умови, що необхідні для вирощування мікроорганізмів (температура, аерація, кислотність середовища).

Студенти повинні вміти: сіяти досліджуваний матеріал у поживні середовища для виявлення мікроорганізмів.

Студенти повинні мати навички: відбирання проб з навколишнього середовища та підготовку їх для мікробіологічного дослідження, техніки розливу поживних середовищ, готування серійних кратних розведень досліджуваного матеріалу, техніки посіву досліджуваного матеріалу для виявлення мікроорганізмів.

Завдання для теоретичної підготовки студентів

1. Способи посіву мікроорганізмів 2. Закономірності залежності росту мікроорганізмів від фізико-хімічних факторів.

Способи посіву мікроорганізмів

Внесення клітин мікроорганізмів у стерильне середовище називають *посівом*, або *інокуляцією*. Спосіб посіву у середовище залежить від його консистенції, якості матеріалу, що сіється, і мети дослідження. Перед посівом необхідно написати на пробірці, колбі або чашці Петрі назву мікроорганізму і дату посіву. Посів матеріалу здійснюють бактеріологічною петлею, голкою або піпеткою.

За необхідності використовують *пересіви культури мікроорганізмів*. Для цього стерильною охолодженою петлею знімають зі щільного середовища невелику кількість клітин, а з рідкого – кількість клітин, що утворює плівку на петлі. Петлю з клітинами мікроорганізмів вводять у пробірку зі стерильним середовищем, не торкаючись стінок чи краю пробірки.

Посів на щільне поживне середовище проводять легким втиранням матеріалу у поверхню середовища, не пошкоджуючи її. *При посіві на скошену поверхню агару* петлю з посівним матеріалом вносять у конденсаційну воду і ковзними рухами розтирають його штрихом знизу догори, направляючи штрих від однієї стінки до іншої.

При посіві у стовпчик середовища голкою з посівним матеріалом проколюють стовпчик у центрі. При посіві петлю чи голку виймають із пробірки, обпалюють горлечко пробірки і пробку у полум'ї пальника і закривають пробірку.

При посіві у рідке поживне середовище петлю занурюють у середовище або матеріал розтирають на стінці пробірки (колби і т.д.), а потім змивають рідким середовищем, струшуючи злегка пробірку (колбу і т.д.). Таким же чином проводять *посів на поверхню середовища у чашках Петрі*. Петлею захоплюють мікробні клітини і невелику кількість їх втирають у поверхню поживного середовища біля краю чашки. Потім петлю пропалюють, щоб знищити залишок клітин. Після цього внесений матеріал розтирають петлею по середовищі штрихами. Для отримання великої кількості мікроорганізмів, проводять *суцільний посів газonom за допомогою шпателя*. Для цього посівний матеріал наносять також за допомогою петлі чи піпетки на поверхню поживного середовища біля краю чашки або у центрі її і потім шпателем розтирають його по всій поверхні середовища.

Посів можна проводити у товщу поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. У цьому випадку у стерильну пусту чашку Петрі спочатку піпеткою вноситься бактеріальна суспензія у кількості 0,1–1 мл, а потім наливається 10–20 мл розплавленого і охолодженого до 50–55 °С середовища. Для перемішування мікробних клітин із середовищем чашку злегка похитують.

Можна спочатку змішати у стерильній пробірці щільне поживне середовище, розплавлене і охолоджене, з невеликою кількістю матеріалу, а потім швидко вилити вміст пробірки у чашку Петрі. Щоб конденсаційна вода, яка утворюється, не заливала посіви, чашки Петрі перевертають догори дном і у такому положенні ставлять у термостат.

Для отримання великої кількості мікробних клітин використовуються спеціальні скляні ємності із плоскими стінками – *матраци*. Поживне середовище розподіляється на одній із широких площин. Засів матеріалу найчастіше проводять у вигляді бактеріальної суспензії, яка приготовлена у фізіологічному розчині або у водопровідній воді. Якщо мікробних клітин у досліджуваному матеріалі мало, то їх концентрують на тонкопористих мембранних *фільтрах*, що виготовлюються із целюлози, ацетата чи інших матеріалів. Засіяні середовища витримують в умовах, що забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів. До таких умов відноситься температурний режим, вологість, аерація, світло та інші специфічні фактори.

Хід роботи:

1. Розлити розплавлене агаризоване середовище Горбенко у стерильні чашки Петрі по 15-20 мл в кожну. Чашки залишити на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне.
2. Підготувати проби води для дослідження.
3. На поверхню середовища стерильною піпеткою нанести точний об'єм (0,1 мл) відповідного розведення і розподілити його стерильним скляним шпателем по поверхні середовища.
5. Для визначення мікробної забрудненості повітря різних приміщеннях седиментаційним методом розплавити на водяній лазні стерильне середовище МПА і розлити у 3 стерильних чашки Петрі (на кожну робочу групу). Чашки ставити у місці відбору проб і відкрити на 5, 10 і 15 хв. Час витримки відмітити на кришці чашки.
6. Закриті чашки Петрі з посівами дном догори помістити в термостат з температурою 28-30 °С.

Контрольні запитання:

1. Які основні способи посіву мікроорганізмів у стерильне середовище?
2. Який механізм проведення посіву у товщу поживного середовища?
3. Який механізм посіву на рідке поживне середовище?

Лабораторна робота № 3.

ОСОБЛИВОСТІ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ РОСЛИН НА КЛІТИННОМУ ТА ОРГАНІЗМОВОМУ РІВНЯХ РОСЛИННА КЛІТИНА ЯК ОСМОТИЧНА СИСТЕМА.

Мета: визначити сутність та умови проходження плазмолізу та деплазмолізу в рослинних клітинах. Прилади та матеріали: скальпелі, препарувальні голки, предметні скельця, накривні скельця, мікроскопи; луски синьозабарвленої цибулі (*Allium* сера) або інші об'єкти; 1 М розчини плазмолітиків (сахароза, NaCl), скляні палички, стаканчики з водою, фільтрувальний папір, пінцети.

Плазмоліз – це відокремлення протопласта від оболонки рослинної клітини. Явище протилежне деплазмолізу.

Причиною плазмолізу є зменшення об'єму внутрішньоклітинного вмісту через втрату води під дією гіпертонічних розчинів. Плазмоліз можливий лише у життєздатній та функціонально цілісній клітині. Процес повернення клітини до нормального стану у гіпотонічному розчині називають *деплазмолізом*

Гіпертонічний

Ізотонічний

Гіпотонічний

Розчин

розчин

розчин

$C_{\text{розчину}} < C_{\text{кліт. соку}}$

$C_{\text{розчину}} = C_{\text{кліт. соку}}$

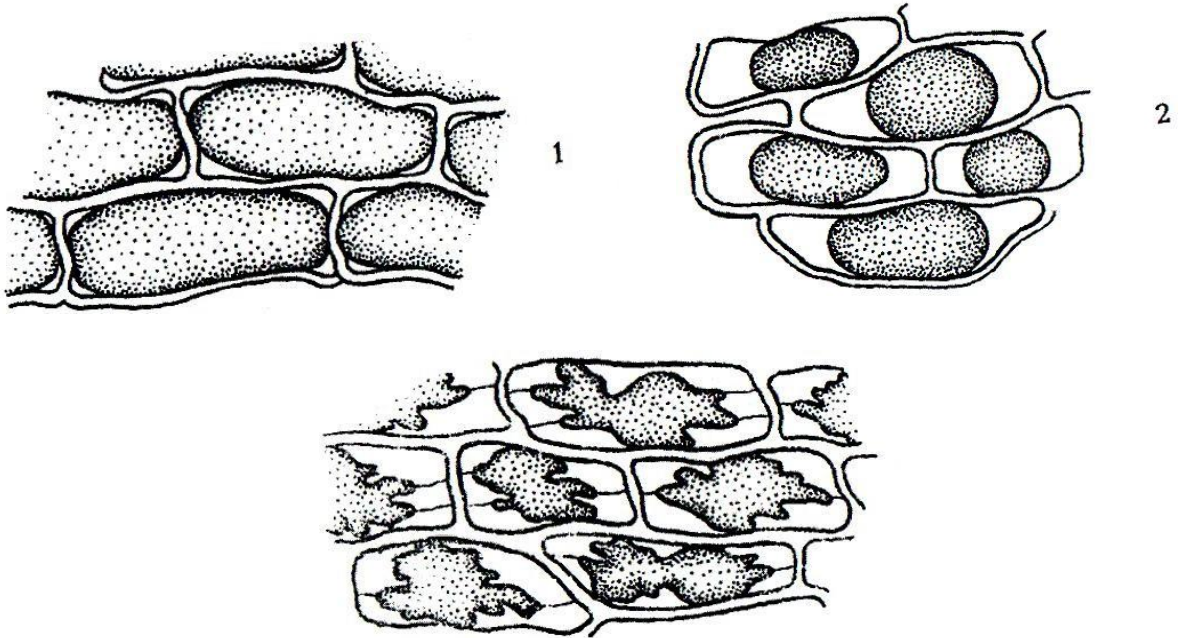
$C_{\text{розчину}} > C_{\text{кліт. соку}}$

У зів'язих рослин плазмоліз не відбувається, але можна спостерігати явище циторизи, коли плазмалема не відокремлюється від оболонки і клітина зморщується.

Хід виконання роботи.

1. Готують препарати епідермісу лусочок цибулі (листоків червоної капусти чи традесканції), що містить антоціани. Поміщають їх у краплину води на предметне скло, накривають накривним скельцем і розглядають під мікроскопом. Знаходять недеформовані, інтенсивно пігментовані клітини. Зарисовують фрагмент поля зору.
2. Міняють воду, в якій знаходиться препарат, на розчин $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Для цього фільтрувальним папером з одного боку накривного скельця відтягують воду, а з протилежного боку скляною паличкою наносять краплю плазмолітичного розчину. Поступово, через 1-4 хв, речовина почне надходити в клітину. Досліджуваний об'єкт на предметному склі розгляньте під мікроскопом. Відшукайте клітини з найінтенсивнішим забарвленням, не деформовані.
3. Замалюйте клітини епідерми цибулі.
4. Фільтрувальним папером відтягніть воду від препарату. З протилежного нанесіть піпеткою краплину 1 М розчину сахарози або NaCl. Поступово (за 1-4 хвилини) плазмолітик почне надходити до клітини.
5. Спостерігайте як цитоплазма починає відставати від оболонки в кутках клітини. Відокремлення збільшується, і протопласт набуває овальної конфігурації посередині клітини. Замалюйте клітини в стані плазмолізу.

6. Піпеткою біля покривного скла нанесіть декілька крапель води і фільтрувальним папером 3-4 рази обережно протягніть воду через препарат, щоб під покривним склом створити розчин з меншою концентрацією, ніж має клітинний сік.
7. Коли клітина насичується водою (в результаті заміни розчину плазмолітика) її вакуоля розтягується і протопласт поступово заповнює всю клітину.



Різні форми плазмолізу в клітинах епідерми цибулі.

1 – кутовий, 2 – опуклий, 3 – спазматичний (драглистий) плазмоліз

Контрольні питання:

1. Дайте визначення поняттям: плазмоліз, деплазмоліз, дифузія, осмос, тургор, циториз; ізотонічна, гіпотонічна та гіпертонічна концентрація розчину.
2. Плазмоліз властивий для клітин (тварин, рослин, грибів?)
3. За яких умов відбувається плазмоліз?
4. Які існують форми плазмолізу?
5. Чи може проходити плазмоліз у неживих клітинах?
6. Пояснити явище циторизу.

Лабораторна робота № 4.

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВОДИ ТА СУХИХ РЕЧОВИН У РІЗНИХ ЧАСТИНАХ РОСЛИНИ.

Мета: визначити вміст та стан води, водного балансу в рослинному організмі. Прилади і матеріали дослідження: ваги, бюкси для зважування або невеликі хімічні стакани (50 мл); тертка; ніж; сушильна шафа; ексикатор, заповнений CaCl_2 ; різні частини рослин, насіння тощо (листя дерев та глиця голонасінних, свіжа та підсушена деревина; насіння злаків та інших рослин; водні рослини).

Вода є необхідним компонентом структури живих клітин. Значення її у житті рослин полягає у створенні внутрішнього середовища, безпосередній участі в фізіолого-біохімічних процесах клітини: фотосинтезі, диханні, гідролітичних реакціях тощо, вона значною мірою визначає структуру білкових молекул протоплазми. Пересуваючись по рослині, вода переносить мінеральні елементи, поглинуті коренями з ґрунту, та органічні сполуки, які синтезуються в кореневій системі; у воді добре розчиняються гази, солі, різні органічні речовини. Завдяки високій теплоємності вода підтримує температурний баланс рослинних організмів. З тургором, який теж виникає завдяки воді, пов'язані такі процеси, як ріст розтягом, відкриття продихів, рухи пелюсток і листкових черешків.

І хоча відомо, що приблизний вміст води у рослинних тканинах становить близько 70-95% для різних рослин і різних органів та частин однієї рослини, цей показник є неоднаковим. Водні рослини містять понад 80% води; соковиті овочі, буряки і бульби – 75-85%; листки листяних порід – 70-80%; глиця голонасінних – 50-70%; деревина (сосна, бук) свіжа – 40-50%; підсушена – 20%; сухе насіння, зерно злаків – 12-20%.

Хід виконання роботи:

Чистий скляний або металевий бюкс разом з відкритою кришкою кладуть у сушильну шафу та витримують протягом 1 години при температурі 100-105°C. Висушений бюкс виймають тигельними щипцями із сушильної шафи і вміщують в ексикатор на 30 хв. Для контролю бюкс з ексикатора знову ставлять у сушильну камеру на 1 годину і знову зважують. Масу бюкса визначають на аналітичних терезах із точністю до 0,0001 г. Коли маса бюкса буде сталою, в неї вміщують пробу для аналізу.

Якщо досліджують повітряно-сирий матеріал, відбирають середню пробу. Із висушеного при 60°C, розтертого в ступці і просіяного крізь спеціальне сито рослинного матеріалу відбирають середню пробу і відважують із неї потрібну наважку на аналітичних терезах для аналізу.

При роботі із сирим матеріалом треба якнайшвидше брати наважку, щоб запобігти втраті воли на повітрі. Сирий матеріал повинен лежати в бюксі нещільно. Бюкс із наважкою ставлять у нагріту сушильну шафу на 4-6 годин і висушують при температурі 100-105°C. Бюкси в сушильній шафі ставлять якнайдалі від стінок, на ту полицю, на рівні якої знаходиться кінчик термометру.

Після висушування наважки бюкси швидко ставлять в ексикатори відкритими для охолодження. Через 20-30 хв. бюкси закривають і зважують, знову ставлять у сушильну шафу на 2 години. Висушену

наважку знову охолоджують в ексикаторі і зважують. Операцію повторюють доти, поки різниця між двома останніми зважуваннями не дорівнюватиме 0.0002-0.0003 г.

Частка (відсоток) абсолютної сухої речовини обчислюють за такою формулою:

$$A = \frac{б}{в} \cdot 100\%$$

де А – процент абсолютно сухої речовини, б – маса наважки після висушування (г), в – маса наважки до висушування (г), 100 – коефіцієнт перерахунку в проценти.

Дослідивши процент сухої речовини в наважці, обчислюють процент води (100-А) і роблять висновок про вміст сухої речовини в досліджуваних рослинах.

У висновку зазначте в яких тканинах/органах рослин вміст води є максимальним/мінімальним.

Контрольні питання:

1. Гігоморфи рослин (див. лабораторну роботу 7, рис.5).
2. Назвіть по 10 представників різних гігоморф.
3. Анатомо-морфологічні та фізіологічні пристосування рослин до умов зволоження.
4. Ознаки ксероморфності.
5. Типи плодів за консистенцією перикарпію. Обумовленість вмісту води в плодах та типу їх поширення.

Лабораторна робота № 5.
ПРИГОТУВАННЯ ВИТЯЖКИ РОСЛИННИХ ПІГМЕНТІВ
ТАЇХ РОЗПОДІЛ ЗА Г.КРАУСОМ

Мета: опрацювати методику екстракції рослинних пігментів та провести розподіл пігментів за Г. Краусом, що враховує різну розчинність у полярних та неполярних розчинниках.

Обладнання, об'єкти та реактиви: листки аспідистри (*Aspidistra*), китайського гібіскуса (*Hibiscus rosa-sinensis*), сингоніуму (*Syngonium*), пеларгонії (*Pelargonium*), інших кімнатних рослин з темно-зеленими листками, або проростки пшениці (*Triticum*), кукурудзи (*Zea mays*), коренеплід моркви (*Daucus carota*). Етиловий спирт, бензин, дистильована вода, фарфорові ступки з товчачиками, набір пробірок в штативі, скляні воронки, фільтрувальний папір (для фільтрації витяжки), ножиці, скляні палички, сухий карбонат кальцію CaCO_3 , пісок.

Метод заснований на різній розчинності окремих рослинних пігментів у спирті та бензині. Ці розчинники не змішуються і складають дві фази - верхню бензинову, нижню - спиртову, завдяки чому і проходить розподіл хлорофілів і ксантофілів.

Пігменти зелених листків, як ліпофільні сполуки, найкраще розчиняються у полярних розчинниках (спирт, ацетон), або суміші полярних і неполярних (бензин, петролейний ефір) розчинників.

Пігментна система хлоропластів складається з зелених (хлорофіли) та жовтих (каротини і ксантофіли) пігментів. За хімічною природою хлорофіли „а” і „в” – складні ефіри дикарбонової кислоти хлорофіліну і двох спиртів – метилового і фітолу

Каротини являють собою ненасичені вуглеводні ($\text{C}_{40} \text{H}_{56}$), ксантофіли – це киснепохідні каротинів ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$, $\text{C}_{40} \text{H}_{56}\text{O}_4$ та ін.).

Хід виконання роботи:

2-3 листки кімнатних рослин (без черешка і середньої жилки) розрізають ножицями на невеликі шматочки, кладуть у фарфорову ступку, додають трохи CaCO_3 (для нейтралізації кислот клітинного соку), близько 0,5 мл етилового спирту і розтирають до отримання однорідної кашеподібної маси. Для кращого подрібнення можна додавати кристалічний пісок.

Додають в ступку 5-10 мл етилового спирту, перемішують скляною паличкою. Після цього змащують носик фарфорової ступки вазеліном і обережно, по скляній паличці, масу переносять на лійку з фільтром. Залишок ступці змивають невеликою порцією спирту і також переносять на фільтр.

Розглядають отримані витяжки у проникаючому світлі, відзначаючи їх колір. Замальовують пробірки з витяжками.

Для відділення ксантофілів від хлорофілів у пробірку наливають 2-

3 мл спиртової витяжки і додають 3-4 мл бензину та 2- 3 краплі води. Закривають пробірку корком, збовтують 1-2 хвилини та дають відстоятися.

По мірі розшарування емульсії бензиновий шар (верхній) буде фарбуватися у зелений колір (завдяки кращій розчинності ньому хлорофілу), спиртовий (нижній) шар набуває золотисто-жовтого забарвлення завдяки присутності ксантофілу.

У бензиновому шарі знаходяться хлорофіли (переважають) та каротини (замасковані). Ксантофіл залишається у спиртовому шарі і зафарбовує його у золотисто-жовтий колір.

Замалювати пробірку на початку та по закінченні досліду. Зробити висновки.

Контрольні питання:

1. Поясніть суть та значення фотосинтезу.
2. Написати загальне рівняння фотосинтезу.
3. Розповісти про структурну будову молекул хлорофілу
4. Як можна виділити пігменти з зеленого листа?
5. Які пігменти містяться в спиртовій витяжці хлорофілу?
6. На якому принципі ґрунтується розподіл пігментів за Г. Краусом?
7. Як омилюється хлорофіл? Чим відрізняються продукти омилення хлорофілу від звичайного хлорофілу?
8. Чим зумовлене забарвлення хлорофілу?

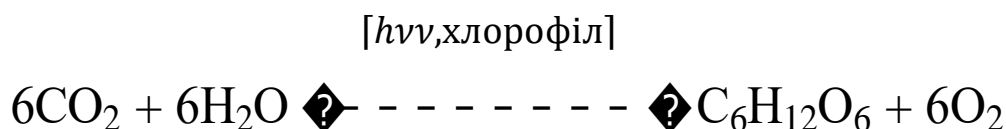
Лабораторна робота № 6.
ФОТОСИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У РОСЛИННОМУ ОРГАНІЗМІ.
ВИДІЛЕННЯ КИСНЮ ЗЕЛЕНОЮ РОСЛИНОЮ НА СВІТЛІ.

Мета: опрацювати методики демонстрації виділення кисню зеленими рослинами в результаті фотосинтезу, виявити та показати залежність його виділення від спектрального складу світла.

Обладнання, об'єкти та реактиви: гілочки елодеї (*Elodea*) або інших рослин; 0,01 %-й розчин індигокарміну, 10%-й розчин дитіоніту натрію, слабкий розчин пірогалолу, концентрований розчин гідроксиду калію; склянки, лійки, пробірки, сірники, лампа (200÷300 Вт), круглодонні колби місткістю 300÷500 мл.

Під час асиміляції вуглекислого газу зеленими рослинами в процесі фотосинтезу виділяється кисень, який можна виявити простими методами.

Фотосинтез є складним процесом, що включає світлову та темнову фази, загальне рівняння фотосинтезу має такий вигляд:



Хід виконання роботи:

Завдання 1.

1. Велику колбу заповнити 0,01% синім розчином індигокарміну, до якого, безперервно перемішуючи, доливати 10 %-й розчин дитіоніту натрію до появи жовтого забарвлення.

2. В розчин занурити гілочку елодеї, колбу герметично закрити (щоб усунути попадання в неї повітря) виставити під лампу. Спостерігають, як внаслідок виділеного під час фотосинтезу кисню за кілька хвилин навколо зелених частин рослини з'являється блакитна зона.

Завдання 2.

1. Підрізані під водою гілочки елодеї однакового розміру або іншої водяної рослини розмістити на дні трьох склянок, пофарбованих ззовні нітролаками – червоним, зеленим і синім.

Можна також обгорнути склянки відповідно забарвленими целофановими плівками. Склянки заповнюють водою, збагаченою вуглекислим газом.

2. Накрити рослини скляними лійками. Стежать, щоб зрізані кінчики їх були спрямовані до вузької частини лійок.

3. Заповнені водою пробірки закрити великим пальцем руки так, щоб туди не потрапили пухирці повітря, потім повернути їх отвором униз і обережно одягнути на трубки лійок, які розміщені нижче рівня води в склянках.

4. Склянки експонувати на світлі. Відмітити швидкість заповнення пробірок газом залежно від спектрального складу світла.

5. Заповнену газом пробірку обережно зняти з трубки лійки, попередньо закривши отвір пальцем.

6. У пробірку внести тліючу скалку, яка спалахує за наявності в ній кисню.

Завдання 3.

1. У дві колби налити 1 %-й розчин бікарбонату калію, виготовленого на прокип'яченій воді (без CO_2).

2. Помістити в колби однакові за розміром гілочки елодеї.

3. Одну колбу (контрольну) обгорнути темним папером, а іншу (дослідну) – виставити на яскраве світло.

4. За 1 год. у колби внести по 1 мл розчину КОН і пірогалолу.

Внаслідок окиснення пірогалолу виділеним під час фотосинтезу киснем розчин набуває коричневого забарвлення. У контрольній колбі розчин залишається безбарвним.

Контрольні питання:

1. Наведіть загальне рівняння фотосинтезу (підпишіть назви речовин та умовиперебігу).
2. Порівняйте водне та наземно-повітряне середовище життя рослин.
3. Поясніть, яким чином перевірити, що газ, що виділяється, є саме киснем
4. Залежність фотосинтезу від зовнішніх факторів (наведіть приклади).

Лабораторна робота № 7.
ТЕРМОРЕГОЛЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ РОСЛИНИ.
ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ ПРОДИХОВИХ КОМПЛЕКСІВ ЛИСТКІВ
МЕТОДОМ ВІДБИТКІВ.

Мета роботи: дослідити вплив ярусності та умов освітлення на кількість і ступінь відкритості продихів листків різних рослин.

Прилади і матеріали дослідження: мікроскоп; пінцет; тонка скляна паличка; предметні скельця; колодій (аптечний), розчинений в суміші спирту з ефіром (1:7) до консистенції сиропу, або безколірний манікюрний лак, розчинений в ацетоні; кімнатні рослини (деякі рослини або окремі листки за 2-3 год до досліду помістити в темряву).

Газообмін з навколишнім середовищем та транспірації (випаровування) води рослиною забезпечують продихи, які звичайно розташовані на нижньому боці листкової пластинки.

Продихи – щілини, що утворені двома замикаючими, або продиховими клітинами. Продихові клітини дрібні, зелені, парні і мають підковоподібну форму. Оболонки цих клітин потовщені нерівномірно: внутрішня, звернена до щілини, товща, ніж протилежна. Зміни тургору (напруження) продихових клітин змінюють їхню форму, завдяки чому продихова щілина буває відкритою, звуженою або повністю закритою від умов навколишнього середовища. Так, вдень продихи відкриті, а вночі і в жарку суху погоду – закриті. Завдяки випаровуванню навколо рослини створюється особливий мікроклімат, необхідний для її нормальної життєдіяльності рослин. Транспірація захищає листки від перегрівання. До того ж випаровування сприяє надходженню нової кількості води в корінь і підняття її по стеблу до листків, підтримуючи тим самим постійний рух води по рослині.

Продихи розташовуються звичайно на нижньому боці листка (щоб не засмічуватися та щоб не випаровувалася на сонці зайва волога) але бувають і на верхньому, іноді вони розподілені більш-менш рівномірно по обидва боки (кукурудза), у водних рослин – лише на верхній поверхні листка. Кількість продихів на одиницю площі листка залежить від виду рослин, умов зростання. В середньому їх 100 – 300 на 1 мм² поверхні, але може бути значно більше.

Процес фотосинтезу значно залежить від інтенсивності газообміну рослини, який здійснюється за участю продихового апарату. Продихи головно розміщені на нижній поверхні листка, їхня кількість залежить від багатьох факторів. Метод відбитків дає змогу встановити кількість, розмір продихів, ступінь відкритості, а також виміряти ширину продихових щілин. Для цього на поверхню листка наносять тонкий мазок розчину колодію чи манікюрного лаку. Після випаровування розчинника на листку утворюється плівка, на якій відбивається епідерміс з продихами. Цей метод можна застосовувати не тільки в лабораторних, але й у польових умовах (у цьому випадку відбитки зберігають у пробірках з водою аж до часу визначення). Проте цей метод непридатний для дослідження листків, продихи яких

заглиблені в епідерміс, як, наприклад, алое, оскільки відбиток із таких листків отримати неможливо.

Хід виконання роботи:

1. На нижню поверхню листка наносять краплю розчину колодію чи манікюрного лаку та за допомогою скляної палички швидко розмащують її тонким шаром. Після повного висихання плівку знімають пінцетом, поміщають на предметне скло і розглядають при великому збільшенні мікроскопа без накривного скла.
2. При однаковому збільшенні мікроскопа вираховують кількість продихів у полі зору в листках різних ярусів однієї рослини, а також у листках рослин, що ростуть в умовах доброго та поганого освітлення.
3. Зарисовують типову будову продихів.
4. Результати дослідження заносять у таблицю:

Рослина	Листок	Умови	Кількість продихів			Загальна кількість продихів у полі зору мікроскопа
			відкриті	напіввідкриті	закриті	
	нижній	світло темрява				
	верхній	світло темрява				

5. Роблять висновок про вплив ярусності та умов освітлення на кількість і ступінь відкритості продихів, їхнє значення для процесів газообміну рослин.

Контрольні питання:

1. Взаємозв'язок процесів фотосинтезу та газообміну рослин.
2. Роль продихів у процесі транспірації.
3. Локалізація продихової системи рослини.

Лабораторна робота № 8. АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ СИСТЕМИ ДИХАННЯ РОСЛИННИХ ОБ'ЄКТІВ.

Мета: дослідити активність ферментів, що каналізують процеси дихання рослин.

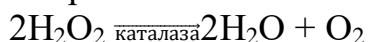
Прилади і матеріали дослідження: водяна баня, газовий пальник або спиртівка чашки Петрі, пінцет, здорові бульби картоплі, яблуко, цвітна капуста, 3% і 0,1% розчини H_2O_2 , 0,5% водний розчин трифенілтетразолію хлориду (ТТХ).

Реакції дихання за своєю природою є ензиматичними. Ферменти або ензими, що залучені в окисно-відновні реакції дихання можна розділити на три основні групи: I дегідрогенази (дегідроаскорбатоксидаза); II оксидази (цитохромоксидаза, поліфенолоксидаза, ксантинооксидаза); III ензими – проміжні переносники електронів (цитохроми). Дегідрогенази – двокомпонентні ферменти, які здійснюють дегідрування дихального субстрату, бувають аеробного і анаеробного типу. Акцептором водню від анаеробних дегідрогеназ є ферменти проміжного перенесення електронів (водню) дихальним ланцюгом і аеробні дегідрогенази. Акцептором водню від аеробних дегідрогеназ є кисень, хінони і термінальні цитохроми дихального ланцюга.

Хід виконання роботи:

Шкірку картоплини розрізають на тоненькі смужки з вічками; для кожного варіанта готують по дві смужки – дослід і контроль. Контрольну смужку за допомогою пінцета занурюють на 5 хвилин у киплячу воду (щоб інактивувати ензими), після чого обидві смужки поміщають у чашки Петрі.

1. Оксидази. Смужки заливають свіжо приготованим 2%-ним спиртовим розчином гваяколу і через 15 хвилин на дослідному фрагменті виявляють блакитне забарвлення, зумовлене окисненням гваяколу.
2. Пероксидази. Як і у попередньому досліді, на смужки шкірки картоплини спершу наливають розчин гваяколу, який згодом заміщують на 0,1%-ний H_2O_2 . Якщо блакитне забарвлення з'являється швидше, ніж у випадку виявлення оксидаз, то це свідчить про наявність пероксидази.
3. Каталаза. Шкірки картоплини заливають 3%-ним розчином H_2O_2 , якщо над дослідною смужкою з'являється піна (внаслідок виділення кисню), то це свідчить про активність каталази.



4. Дегідрогенази. Дослідну смужку, обробляють 0,5%-ним ТТХ. За наявності дегідрогеназ шкірка протягом 15-ти хвилин забарвлюється у червоний колір: ензими відновлюють тетразол до червоного формазану.
5. “Дихальні хромогени”. Дослідна смужка (жива) стає брунатною на повітрі внаслідок окиснення ароматичних амінокислот (наприклад, тирозину). Реакція відбувається за участю Cu-вмісної тирозинази; темне забарвлення зумовлене утворенням попередників меланіну.
6. Поліфенолоксидази. Свіжозрізаний шматок цвітної капусти у кількох місцях дотикають до гарячого предмета, намащують розвареною масою з

яблука і додають кілька крапель H_2O_2 . На не нагрітих ділянках через кілька хвилин з'являється брунатне забарвлення. Внаслідок варіння в тканині яблука руйнуються поліфенолоксидази, тоді як тирозин і поліфеноли зберігаються. Водночас, тканина капусти містить поліфенолоксидази, але не має відповідного субстрату. Після нагрівання відбувається локальне знищення ензиму, на інших ділянках внаслідок реакції субстрату яблука і ензиму із капусти з'являється забарвлення.

Контрольні питання:

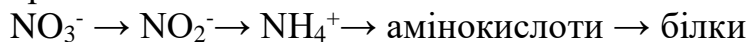
1. Класифікація ферментів, що приймають участь у процесі дихання рослин.
2. Порівняльна характеристика процесів дихання та фотосинтезу.

Лабораторна робота № 9. ВИЯВЛЕННЯ НІТРАТІВ У РОСЛИННИХ ЗРАЗКАХ ПОЛЬОВИХ КУЛЬТУР.

Мета роботи: ознайомитися з експрес-методом виявлення нітратів у рослинному матеріалі, порівняти вміст нітратів у різних органах рослин.

Прилади і матеріали дослідження: ножиці; біла фарфорова чашка (16 шт.); скляна паличка (4 шт.); склянка з водою; фільтрувальний папір; 1%-ний розчин дифеніламіну в концентрованій сірчаній кислоті в крапельниці; рослини, вирощені на поживному розчині чи ґрунті.

Нітрати, що поглинаються коренями з ґрунту, відновлюються у рослині до аміаку через низку послідовних етапів, кожен з яких каталізується певним ензимом (нітратредуктаза, нітритредуктаза). Аміак зв'язується з кетокислотами (α -КТГ, ЩОК та ПВК), і в процесі відновного амінування утворюються первинні амінокислоти – *глу*, *асп*, *ала*. Інші амінокислоти утворюються шляхом трансамінування або ензиматичного перетворення первинних АК.



Проте частина нітрат-йонів транспортується безпосередньо у вакуолю і формує запасний пул, з якого при потребі легко переходить у цитоплазматичний (активний) фонд. Співвідношення фондів варіює в широких межах і змінюється залежно від комплексу факторів (мінеральне живлення, видові особливості рослин, екологічні умови росту і розвитку). При азотному голодуванні синтез амінокислот відбувається за рахунок нітратів запасного пулу. Нагромадження нітратів різними культурами має видову і сортову специфіку, що показано для численних овочевих і баштанних культур. Кількість нітратів у різних органах рослини залежить також від етапу онтогенезу: молоді органи зазвичай містять підвищену кількість нітратів унаслідок більш активного їхнього надходження порівняно із асиміляцією.

Для виявлення нітратів у лабораторних умовах використовують реакцію з дифеніламіном, який за наявності йона NO_3^- дає синє анілінове забарвлення. Кількість нітратів у досліджуваному об'єкті оцінюють приблизно за інтенсивністю посиніння. Визначення вмісту нітратів у різних частинах рослини дає змогу судити про активність процесу відновлення нітратів: чим менше NO_3^- у стеблі та листку, тим повніше відбувається цей процес у клітинах кореня. Порівняння вмісту нітратів у черешках та листовій пластинці дає уявлення про нітратредуктазну активність клітин мезофілу.

Хід виконання роботи:

1. На білу фарфорову чашку помістити шматки кореня, стебла, черешка та листової пластинки будь-якої рослини. Розім'яти рослинний матеріал скляною паличкою (паличку кожен раз споліскувати чистою водою та витирати фільтрувальним папером) і додати 2-3 краплі розчину дифеніламіну в сірчаній кислоті.

2. Оцінити інтенсивність синього забарвлення через 1,5-2 хв (з часом забарвлення може змінитися). Дослідити 3-4 рослини одного виду, які росли на сонці та в тіні, та різних видів.

3. Результати заносять у таблицю, оцінюючи інтенсивність забарвлення за п'ятибальною шкалою:

Рослина	Умови вирощування	Кількість нітратів			
		корінь	стебло	черешок	листова пластинка

Контрольні запитання:

1. Механізм поглинання нітратів рослинами.
2. Залежність між нагромадженням нітратів та етапом онтогенезу рослини.

Лабораторна робота № 10.
ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО АЗОТУ В НАСІННІ ТА
ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН

Мета роботи. Визначення вмісту загального азоту у насінні та різних частинах рослин. Органічні речовини спалюються сірчаною кислотою у присутності каталізатора (сульфату міді або молібдату натрію) до діоксиду вуглецю та води. Органічні азотисті речовини перетворюються на аміак, який зв'язується сірчаною кислотою. Надлишок сірчаної кислоти нейтралізується 80 гідроксидом натрію, і амонійний азот окислюється хлораміном. Надлишок хлораміну визначається йодометричним методом. Йод, який утворюється, титрується тіосульфатом натрію.

Прилади та матеріали. 1) колби К'ельдаля з пробками; 2) електрична плита; 3) мірчі колби об'ємом 50 мл; 4) бюретки для титрування; 5) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 6) циліндри мірчі; 7) колби для титрування об'ємом 250 мл; 8) сушильна шафа; 9) металеві бюкси. Реактиви 1) хлорамін 0,12 N розчин; 2) фосфатний буфер з рН 6,7; 3) молібдат натрію (Na_2MoO_4) 10 % розчин; 4) пероксид водню (H_2O_2); 5) сульфат калію (K_2SO_4) безаміачний; 6) сірчана кислота (H_2SO_4) концентрований розчин; 7) гідроксид натрію (NaOH) 2 N розчин; 8) метилоранж 0,1 % розчин; 9) щавлева кислота ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 8 % розчин; 10) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,02 N розчин (готується з фіксаналу); 11) йодид калію (KI) 20 % розчин; 12) крохмаль 0,5 % розчин.

Хід виконання роботи.

Зважують 0,2 г повітряно-сухого або 1 г сирого подрібненого рослинного матеріалу та висипають його у колбу К'ельдаля об'ємом 30–50 мл. У колбу додають 0,3 мл 10 % розчину молібдату натрію, 4 краплі 30 % пероксиду водню, 0,4 г сульфату калію, 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, ретельно перемішують і залишають на 2–3 год. Далі колбу ставлять на електричну плитку і нагрівають, регулюючи нагрів так, щоб піна не підіймалася вище припустимого рівня. Коли утворення піни послабне, і в колбі з'являться білі пари сірчаної кислоти, її накривають скляною пробкою або лійкою і продовжують нагрівати до прояснення розчину (розчин повинен бути безбарвним та прозорим і не змінювати кольору після охолодження). Для прискорення спалювання органічних речовин у колбу кожні 15–20 хв додають декілька крапель 30 % пероксиду водню. Після прояснення розчину та додавання останньої порції пероксиду водню рідину кип'ятять ще 10 хв для повного його розкладення. Після закінчення спалювання колбу охолоджують, і до розчину, який містить концентровану сірчану кислоту, обережно додають 10 мл дистильованої води. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм водою до мітки і ретельно перемішують. У розчині, отриманому після спалювання органічних речовин, визначають азот хлорамінним методом. Для цього з дослідного розчину відбирають піпеткою 20 мл під час аналізу коренів, стебел, і 10 мл під час аналізу листя або зерна, переносять у конічну колбу для титрування. Додають 1 краплю 0,1 % розчину метилоранжу і нейтралізують 2 N розчином NaOH до зміни кольору індикатору. Додають 10 мл фосфатного буферного розчину з рН

6,7, який містить бромід калію, перемішують, і по стінці колби вливають 5 мл 0,12 N розчину хлораміну. Колбу закривають пробкою, розчин перемішують круговими рухами і залишають на 25 хв. Після цього додають 2 мл 20 % розчину йодистого калію, 10 мл 8 % розчину щавлевої кислоти і йод, який утворився, титрують 0,02 N розчином тіосульфату натрію у присутності індикатора (0,5 % розчин крохмалю), який додається наприкінці титрування. 1 мл 0,02 N розчину тіосульфату натрію відповідає 0,09338 мг азоту.

Вміст азоту обчислюють за формулою:

$$X = 0,4699 \times K \times (a - b) / V_2 \times n,$$

де: X – вміст азоту у перерахунку на абсолютно суху речовину, мг/г;
 V_1 – об'єм розчину, в якому розчинена наважка після спалення, мл;
 V_2 – об'єм дослідного розчину, який взято для окислення азоту хлораміном, мл; K – нормальність розчину тіосульфату;
 a – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;
 b – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;
 n – абсолютно суха наважка (для перерахунку на абсолютно суху речовину необхідно визначити вологість дослідного матеріалу з допомогою висушування за температури 105 °С до постійної ваги), г;
0,4699 – нормальний титр азоту, помножений на 100 для перерахунку у відсотки. Примітка:
Різниця ($a - b$) не повинна перевищувати 22 мл.

Контрольні запитання.

1. До яких речовин входить азот, що визначається цим методом? Що таке «загальний азот»?
2. Яких умов треба дотримуватися втрат азоту?
3. Які реакції відбуваються під час спалення органічної речовини? У якій формі фіксується азот органічних речовин?
4. Дайте характеристику хлорамінного методу визначення азоту у рослинах.
5. Яка залежність існує між вмістом азоту в рослинному

Лабораторна робота № 11.
ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АМІЛАЗИ
ЗА СМІТОМ, РОЄМ

Мета роботи: Метод Сміта, Роя ґрунтується на колориметричному визначенні нерозкладеного ферментом крохмалю після його обробки розчином йоду.

Прилади та матеріали: 1) холодильник; 2) термостат; 3) фотоелектроколориметр; 4) конічні колби об'ємом 200 мл; 5) пробірки; 6) мірчі колби на 1 л; 7) мірчі колби об'ємом 50 мл. Реактиви 1) фосфатний буфер (рН 7,4); 2) 0,1 М ацетатний буфер рН 5 (для приготування змішують 33 мл 0,1 N розчину оцтової кислоти і 76 мл 0,1 N розчину ацетату натрію); 3) 3 % розчин крохмалю в ацетатному буфері; 4) 1,0 N розчин НСІ; 5) 0,5 М розчин СаСІ₂; 6) 3 % розчин КІ; 7) 0,3 % розчин І₂ у 3 % розчині йодиду калію. Приготування реактивів Реактив № 1 (фосфатний буфер (рН 7,4)). 0,2 М розчин Na₂HPO₄ (31 г Na₂HPO₄·2H₂O у 1 л води) і 0,2 М розчин KН₂PO₄ (33,61 г KН₂PO₄·2H₂O чи 71,7 г KН₂PO₄·12H₂O у 1 л води). Змішують 81 мл розчину Na₂HPO₄ і 19 мл розчину KН₂PO₄ і розбавляють суміш до 200 мл. Одержують 0,1 М фосфатний буфер з рН 7,4. Далі буферну суміш розводять у 20 разів і на рН-метрі перевіряють рН. Зсув значень рН після розведення водою компенсують за допомогою додавання 0,2 М розчинів солей. Реактив № 2 (0,1 М ацетатний буфер рН 5). Для приготування змішують 33 мл 0,1 N розчину оцтової кислоти і 76 мл 0,1 N розчину ацетату натрію.

Хід роботи.

Для приготування ферментної витяжки (за температури 4°С) наважку рослинного матеріалу 5 г приміщують в охоложену фарфорову ступку і доливають 50 мл 0,005 М фосфатного буфера (рН 7,4). Рослинну масу розтирають і залишають стояти за температури 0–4 °С протягом 30 хв, періодично перемішуючи.

Далі осад відокремлюють шляхом центрифугування за 900 обертів на хвилину або фільтрують через щільний складчастий фільтр. У дослідні і контрольні пробірки доливають по 1 мл 3 % розчину свіжо приготованого крохмалю. У третю серію пробірок (стандартна проба) наливають 1 мл суміші такого складу: 50 мл дистильованої води + 0,5 мл 0,1 N НСІ + 0,1 мл 0,3 % І₂

У кожную пробірку додають 3 мл ацетатного буфера (рН 5,0), 1 мл 0,5 М СаСІ₂ і інкубують за температури 40° С протягом 10–15 хв. Далі у дослідні пробірки додають по 1 мл ферментного препарату і всі пробірки інкубують ще 10 хв за такої самої температури.

Після цього в кожную пробірку додають 0,5 мл 0,1 N НСІ для інактивації ферменту. У контрольні і стандартні пробірки додають по 1 мл ферментного розчину і переносять у мірчі колби на 50 мл, що містять 0,5 мл 0,1 N НСІ та 40 мл дистильованої води. У кожную колбу додають по 0,1 мл йодного розчину (3 % КІ + 0,3 % І₂). Об'єм рідини у мірчих колбах доводять до мітки дистильованою водою.

‘Оптичну густину розчинів вимірюють на фотоелектроколориметрі із оранжевим світлофільтром (610 нм), використовуючи кювету з оптичним шляхом 10 мм. Активність ферменту розраховують за формулою:

$$P = \frac{A - B}{C} \times 100,$$

де: P – активність ферменту (за одиницю активності приймають кількість білка, що гідролізує 10 мг крохмалю у хв за певних умов);

A – оптична густина контрольного розчину;

B – оптична густина аналізованого розчину;

C – кількість крохмалю, який містився у вихідному розчині.

Контрольні запитання.

1. До якого класу ферментів належить амілаза? Наведіть класифікацію ферментів.
2. У перетворенні яких речовин бере участь амілаза? Чим відрізняються α та β -амілази?
3. Охарактеризуйте принцип методу.
4. Порівняйте наведені вище методи визначення активності амілази.

Література

Основна:

1. Власенко М.Ю., Вельямінова-Зернова Л.Д., Мацкевич В.В. Фізіологія рослин з основами біотехнології: *Підручник*. Біла Церква: БДАУ, 2006. 504 с.
2. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин: *Підручник*. 2-е вид., вип. та доп. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. 392 с.
3. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин: Підручник. К.: Либідь, 2005. 808 с.
4. Макрушин М.М., Макрушина Є. М., Петерсон Н.В., Мельников М.М. Фізіологія рослин. Вінниця: Нова Книга, 2006. 416 с.
5. Злобіц Ю.А. Курс фізіології і біохімії рослин. Суми: Університетська книга, 2004. 463 с.
6. Скляр В.Г. Екологічна фізіологія рослин: Підручник. За ред. Ю.Л. Злобіна. Суми: Університетська книга, 2015. 271 с.
7. Тарнопільська О.М. Фізіологія рослин: *Конспект лекцій*. Харків: Харківський національний університет міського господарства імені О.М. Бекетова. (ХНУМГ ім. О. М. Бекетова), 2018. 159 с.
8. Бондарева Л.М., Тихонова О.М. Фізіологія рослин: Методичне видання. Робочий зошит для виконання лабораторних занять для студентів денної та заочної форм навчання за спеціальностями: «агрономія», «захист рослин», «садово-паркове господарство». Суми, 2013 69 с.
9. Войтович О.М., Левчук Г.М., Лях В.О. Фізіологія та біохімія рослин: *Методичні рекомендації до лабораторних робіт*. Запоріжжя: ЗНУ, 2016. 57 с.
10. Мацкевич В.В., Олешко О.Г., Роговський С.В. Методичні вказівки для забезпечення самостійного вивчення теоретичної частини курсу Фізіологія рослин. Біла Церква: БНАУ, 2008. 116 с.
11. Приседський Ю.Г. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт із спецкурсу Фізіологія стійкості рослин. Донецьк: Норд-Комп'ютер, 2005. 35 с.
12. Перерва В.В. (уклад.) Лабораторний практикум з фізіології та захисту рослин для студентів спеціальності 101 Екологія. Частина перша. Кривий Ріг: КДПУ, 2021. 50 с.

Додаткова:

13. Campbell A.M., Paradise C.J. Plant Physiology. New York: Momentum Press, LLC, 2016. 57 p.
14. Fitter A.H., Hay R.K.M. Environmental Physiology of Plants. Third Edition. Academic Press, 2002. 367 p.
15. Fitzpatrick B. Plant Cells. Chelsea House, 2012. 119 p.
16. Kochhar S., Gujral S. Plant Physiology: Theory and Applications. 2nd Edition. Cambridge University Press, 2020. 880 p.

17. Nobel P.S. Physicochemical and Environmental Plant Physiology. 4th Edition. Elsevier, 2009. 604 p..
18. Tripathi D. et al. (Eds.) Plant Life under Changing Environment: Responses and Management. Academic Press, 2020. 994 p.

Інтернет-ресурси

1. Photosynthesis. URL:
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/phoc.html>
2. Plant physiology. URL: <https://academic.oup.com/plphys>
3. Екологічна фізіологія рослин.
URL:
https://pidru4niki.com/86580/ekologiya/ekologichna_fiziologiya_roslin_kras.ru/files/1839_Konspekt_lekcii_Fiziologiya_rastanii.pdf
4. Фізіологія солестійкості. URL:
https://www.youtube.com/watch?v=qUnE-3dD_FU&ab_channel=НМЦвищоїтафаховоїпередвищоїосвіти
5. Морфогенез рослин. URL:
https://www.youtube.com/watch?v=RI_SoHc7lOI&ab_channel=НМЦвищоїтафаховоїпередвищоїосвіти
6. Ознаки нестачі елементів живлення рослин. URL:
https://www.youtube.com/watch?v=ScIpW6IDOQ&ab_channel=НМЦвищоїтафаховоїпередвищоїосвіти