

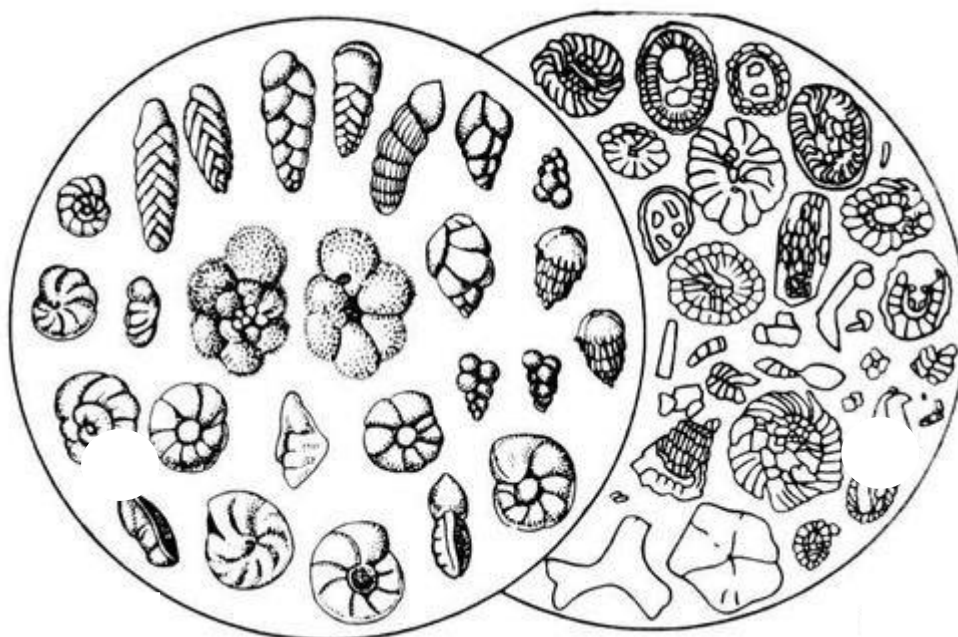
**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА**

**Кафедра біології**

**БІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ДІАГНОСТИКИ ПАТОГЕННИХ  
МІКРООРГАНІЗМІВ**

**Методичні рекомендації до виконання лабораторних занять  
здобувачами другого рівня вищої освіти (магістр)  
спеціальності 091 – «Біологія та біохімія»**



**УМАНЬ – 2024**

**Укладачі:**

В. П. Карпенко – доктор с.-г. наук, професор, проректор з наукової та інноваційної діяльності Уманського національного університету садівництва  
О. І. Заболотний – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри біології Уманського національного університету садівництва

Розглянуто і затверджено на засіданні кафедри біології (протокол від 06 серпня 2024 року № 1).

Схвалено науково-методичною комісією факультету *плодоовочівництва, екології та захисту рослин*

Протокол від 09 серпня 2024 року № 1.

**Рецензент** – доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри технології зберігання і переробки зерна Уманського НУС В. В. Любич

**Карпенко В. П., Заболотний О. І.**

Біологічні основи діагностики патогенних мікроорганізмів. Методичні рекомендації до виконання лабораторних занять здобувачами другого рівня вищої освіти (магістр) спеціальності 091 – «Біологія та біохімія». Умань, 2024. 40 с.

## ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	4
<b>Лабораторне заняття №1.</b>	
Тема: Мікроскопічні методи дослідження фітопатогенних бактерій	5
<b>Лабораторне заняття №2.</b>	
Способи приготування і рецептура середовищ для культивування фітопатогенних бактерій	22
<b>Лабораторне заняття №3.</b>	
Відбір і підготування зразків для фітобактеріологічних досліджень	42
<b>Лабораторне заняття №4.</b>	
Мікробіологічний посів фітопатогенних бактерій на тверді, рідкі та напіврідкі живильні середовища	52
<b>Лабораторне заняття №5.</b>	
Виділення патогенних мікроорганізмів із уражених органів рослин на прикладі фітопатогенних бактерій	64
<b>Лабораторне заняття №6.</b>	
Визначення патогенних властивостей бактерій	68
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	82

## ПЕРЕДМОВА

Швидкий розвиток сучасної мікробіології та її методів вимагає постійного оновлення та модернізації навчальної літератури та матеріальної бази. Методичні рекомендації складено відповідно до програми курсу «Біологічні основи діагностики патогенних мікроорганізмів» і є методичним посібником для здобувачів із спеціальності 091 «Біологія та біохімія» під час проведення лабораторних занять. Методичні рекомендації розраховано на виконання здобувачами загальновідомих методів, які є класичними і не вимагають специфічного та складного обладнання.

При складанні методичних вказівок враховано досягнення мікробіології в напрямках дослідження структури і функцій бактеріальних клітин, фізіології обміну речовин у мікроорганізмів, їх ролі в ґрунтових процесах і житті рослин.

Наведено методи мікроскопічних досліджень, вивчення морфології мікроорганізмів; техніки посівів і виділення чистих культур, їх ідентифікації; методи виділення мікрофлори повітря, ґрунту, води.

Освоєння здобувачами цих навиків дає змогу застосовувати їх як для виконання лабораторних робіт, так і в подальшій науково-дослідній та виробничій роботі.

## **Лабораторне заняття №1** **МІКРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ** **ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ**

**Мета роботи:** Ознайомитися з правилами роботи в мікробіологічній лабораторії та будовою і роботою світлового мікроскопа. Ознайомитися з різними видами мікроскопування. Виготовити препарати живих клітин мікроорганізмів методами «роздавлена» і «висяча» крапля.

**Матеріали та обладнання:** 1) добові культури мікроорганізмів на прикладі *Saccharomyces cerevisiae*; 2) мікроскопи; 3) об'єкт-мікрометри; 4) окуляр-мікрометри; 5) предметні скельця; 6) покривні скельця; 7) предметні скельця з лункою посередині; 8) пробірки з фізіологічним розчином; 9) водні розчини барвників (фуксину нейтрального, метиленового синього, генціан-віолету); 10) препарувальні петлі; 11) спиртівки.

### **Ознайомлення з облаштуванням мікробіологічної лабораторії та правилами роботи в ній.**

Сучасна мікробіологічна лабораторія є комплексом приміщень, устаткування і приладів, що дозволяють використовувати різні прийоми для вирощування бактерій, виділених з чистих культур, вивчення морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних і молекулярно-генетичних властивостей. Лабораторії включають кімнати для мікробіологічних досліджень і підсобні приміщення.

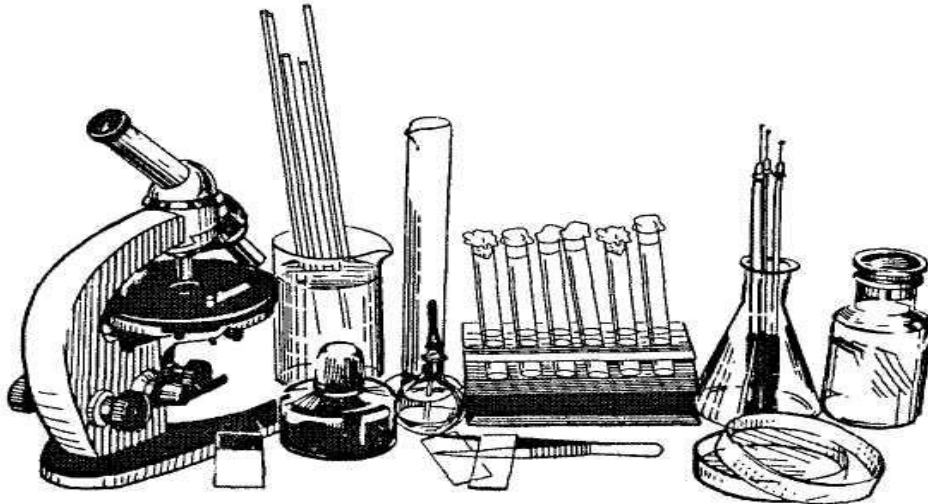
**Під робочі кімнати** відводять світлі, просторі приміщення, стіни яких на висоту до 170 см від підлоги фарбують в світлі тони масляною фарбою або викладають кахляною плиткою, а підлогу покривають лінолеумом. Такого роду обробка дозволяє проводити вологе прибирання із застосуванням дезінфікуючих розчинів (найчастіше для цього використовують 3% розчин соди або ультрафіолетове випромінювання бактерицидних ламп). Лабораторні приміщення обладнуються шафами і полицями для зберігання апаратури, посуду, фарб і реактивів.

**До підсобних приміщень відносяться:** автоклавна або стерилізаційна – для стерилізації середовищ, посуду, знищення відпрацьованого матеріалу; мийна, обладнана для миття посуду; приміщення для виготовлення, розливу і зберігання живильних середовищ; приміщення для зберігання реактивів, посуду, апаратури і господарського інвентарю; віварій для утримання піддослідних тварин.

Для забезпечення стерильності роботу з мікроорганізмами краще проводити в спеціальних скляних або напівскляних **камерах-боксах**, які бувають різних розмірів. У боксах вмонтовані ультрафіолетові лампи-випромінювачі, які знищують мікроорганізми в повітрі і на поверхні предметів. До складу оснащення мікробіологічної лабораторії повинні обов'язково входити газові або спиртні пальники.

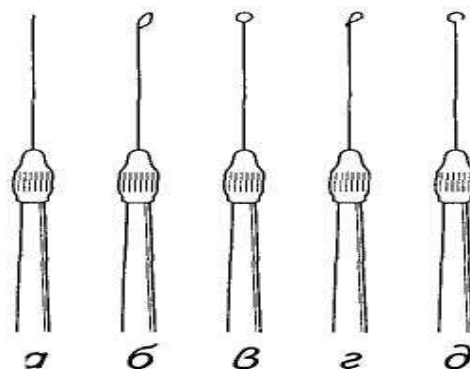
Велике значення для успішної роботи має правильна організація **робочого місця мікробіолога**. Лабораторний стіл повинен бути добре

освітлений сонячним або штучним світлом. За кожним студентом на весь період практикуму закріплюється постійне робоче місце. Залежно від теми заняття робоче місце оснащується необхідними матеріалами і устаткуванням: газовим пальником або спиртівкою, штативом під пробірки, стерильними пробірками, бактеріологічною петлею і голкою, скляними шпателями, піпетками градуйованими і Пастера, ланцетом, ножицями, банкою з ватою, фільтрувальним папером, набором фарб і реактивів для забарвлення препаратів, предметними і покривними стеклами, установкою для забарвлення і промивання препаратів, мікроскопом, флаконом з імерсійним маслом, банкою з дезінфікуючим розчином, олівцями по склу і ін. (рис. 1).



**Рис. 1. Обладнання робочого місця студента.**

Бактеріологічні голки, шпателі і петлі, за допомогою, за допомогою яких робляться посіви мікробів з колоній і суспензій досліджуваних культур, виготовляються з платинового дроту, який закріплюється в спеціальних металічних тримачах або впаюється в скляні палички (рис. 2).



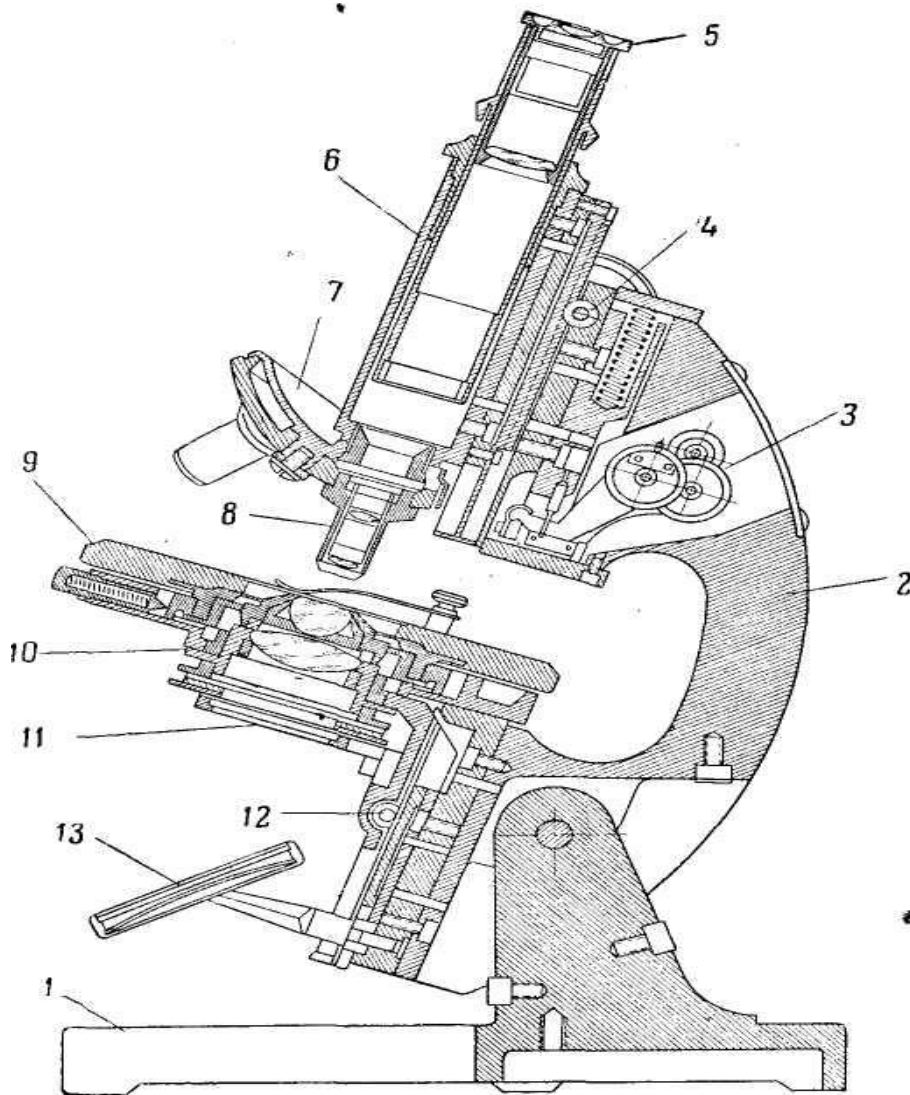
**Рис. 2. Бактеріологічні голка, шпатель і петлі:**

а – голка, б – шпатель, в-д – петлі (в – правильно зроблена; г, д – неправильно зроблені).

**Будова мікроскопу, правила роботи з мікроскопом. Методи**

## мікроскопіювання.

**Будова оптичного мікроскопу.** Сучасний мікроскоп з'явився в кінці XIX сторіччя. Його виникнення пов'язане з оптичними роботами М. В. Ломоносова, Ейлера і інших, а подальший розвиток визначився винаходом освітлювального апарату (конденсор Аббе), особливих систем об'єтивів (апохромати) та інших важливих пристосувань до мікроскопа. Мікроскопи досягли досконалості і забезпечені не тільки освітлювачем і мікрометричним гвинтом, але і хрестоподібним столиком, що обертається, і рядом інших пристосувань. Головними елементами конструкції сучасного мікроскопа є: механічна і оптична частина (рис. 3).



**Рис. 3. Розріз світлового мікроскопу:**

1 – основа штатива, 2 – тубусотримач, 3 – мікрометричний механізм, 4 – кремальєра, 5 – окуляр, 6 – тубус, 7 – револьвер, 8 – об'єтив, 9 – предметний столик, 10 – конденсор, 11 – світло-фільтр, 12 – кремальєра конденсора, 13 – дзеркало

Штатив складається з двох частин: тримача труби мікроскопа та ніжки

штатива. Тримач труби з'єднаний з ніжкою штатива особливим гвинтом. Він має заокруглену форму. Приблизно на висоті нижньої частини ручки до тримача труби мікроскопа прироблений предметний столик, на який кладуть предметне скло з об'єктом для мікроскопічного дослідження.

**Предметний столик** мікроскопа може бути повністю металевим, покритим спеціальним лаком, або частково зробленим з іншого матеріалу (верхній круг). На предметному столику завжди є пара металевих пружинних затискачів, значення яких полягає в тому, щоб міцно утримувати препарат у певному положенні під час дослідження. При знятті затискачів з предметного скла препарат може вільно переміщатися по столику мікроскопа.

У хороших мікроскопах предметний столик завжди робиться або обертовим або центрованим, що рухається в двох взаємно перпендикулярних напрямках. В останньому випадку він називається хрестоподібним столиком.

**Хрестоподібний столик** призначається для систематичного вивчення препарату, а також для швидкого виявлення певного місця на препараті при повторних спостереженнях. Рухома частина цього столика може рухатися за допомогою двох гвинтів, зазвичай розташованих з правого боку.

**Труба мікроскопа** рухається вгору і вниз за допомогою гвинтів двох систем. Для грубого пересування служить **зубчатка**, або **кремальєра**, що приводиться в рух двома бічними гвинтами. Труба мікроскопа складається з двох частин, що входять одна в одну. Вгорі вона має пристосування для міцного утримування окуляра. При користуванні масляною імерсією найкраще зображення буде при довжині труби від верхнього краю оправы об'єктиву в 160 мм (у наших біологічних мікроскопах, а також мікроскопах Цейсса і Рейхерта; у мікроскопах Лейтца ця довжина відповідає 170 мм).

**Оптична частина мікроскопа** складається з окуляра, що знаходиться на верхньому кінці труби мікроскопа, об'єктиву, що знаходиться на нижньому кінці труби мікроскопа та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач) що розміщується під столиком мікроскопа.

**Імерсійні системи.** Роздільну здатність мікроскопа можна збільшити, використовуючи сильніші джерела освітлення, помістивши між конденсором і наочним столиком, а також між спостережуваним об'єктом і фронтальною лінзою об'єктиву прозора речовина, що має показник заломлення світла, близький до такого для скла. З цією метою використовують оптично прозорі **імерсійні рідини**: кедрове масло ( $n=1,52$ ), гліцерин ( $n=1,4$ ), воду ( $n=1,3$ ) і ін. Якщо краплю кедрового масла нанести між конденсором і наочним склом і між об'єктом, що знаходиться на наочному склі, і об'єктивом, тоді конденсор—кедрове масло—предметне скло—кедрове масло—фронтальна лінза об'єктиву будуть єдиною системою, що не викликає відхилення світлового променя і названу імерсійною.

У разі використання імерсійної системи тубус мікроскопа обережно опускають вниз так, щоб кінчик об'єктиву занурився в кедрове масло. Опустити об'єктив занадто низько і сильно тиснути на покривне скельце не можна, оскільки є небезпека не тільки роздавити покривне скло, але і



передню лінзу об'єктиву. В останньому випадку об'єктив зовсім вибуває з ладу. Після опускання потрібно підняти тубус мікроскопа вгору (обертаючи кремальєру на себе) доти, поки в полі зору не з'являться зображення. Щоб не «пройти» мимо поля зору, необхідно обертати кремальєру дуже повільно і обережно. Ні в якому випадку не слід швидко опускати трубу мікроскопа. За такої системи роботи об'єктив легко ушкоджується і виходить з ладу.

Як тільки буде знайдено поле зору за допомогою кремальєри, підбирають за допомогою освітлювача Аббе і дзеркала освітлення і приступають до установки на найбільшу чіткість і ясність поля зору і об'єкту за допомогою мікрометричного гвинта.

При роботі з імерсійними об'єктивами між об'єктивом і препаратом повинне бути кедрове масло. Це важливо тому, що показник заломлення кедрового масла відповідає показнику заломлення скла, що усуває втрату світла за рахунок розсіяння при переході з одного фізичного середовища в інше з різними показниками заломлення (скло і повітря), а це дуже важливо при роботі з сильними об'єктивами, що мають велику кривизну лінз за малого їх діаметра, що пропускає порівняно мало світла.

#### **Виготовлення препаратів живих клітин мікроорганізмів методами «роздавленої» та «висячої» крапель.**

У мікробіологічній практиці, залежно від мети досліджень, використовують мікроскопію як живих культур мікроорганізмів, так і фіксованих. Використовуючи ці методи, отримують інформацію про розмір клітин, їх форму, будову а також про деякі процеси життєдіяльності мікроорганізмів (спороутворення, ділення, рух та ін.)

Препарати для мікроскопії готують на предметних скельцях, при дослідженні живих культур мікроорганізмів використовують ще й покривні скельця. Предметні та покривні скельця мають бути гарно очищені та знежирені.

**Виготовлення мікроскопічного препарату** здійснюється наступним чином:

1. Приготувати предметні і покривні скельця для мікроскопії. Вони повинні бути чистими і добре знежиреними, щоб нанесена на них крапля рівномірно розтікалася. Досягається це кількома способами:

➤ прокип'ятити скельця 15 хв у 1% розчині соди або в мильній воді, сполоснути водопровідною водою, помістити на 5–10 хв у слабку хлористоводневу кислоту і добре промити дистильованою водою.

➤ витримавши скельця заздалегідь 2 год. у концентрованій сірчаній кислоті або хромовій суміші. Після цього промити їх в проточній воді, прокип'ятити в 2 %-му розчині луку протягом 10 хв, ретельно промити проточною, а потім дистильованою водою.

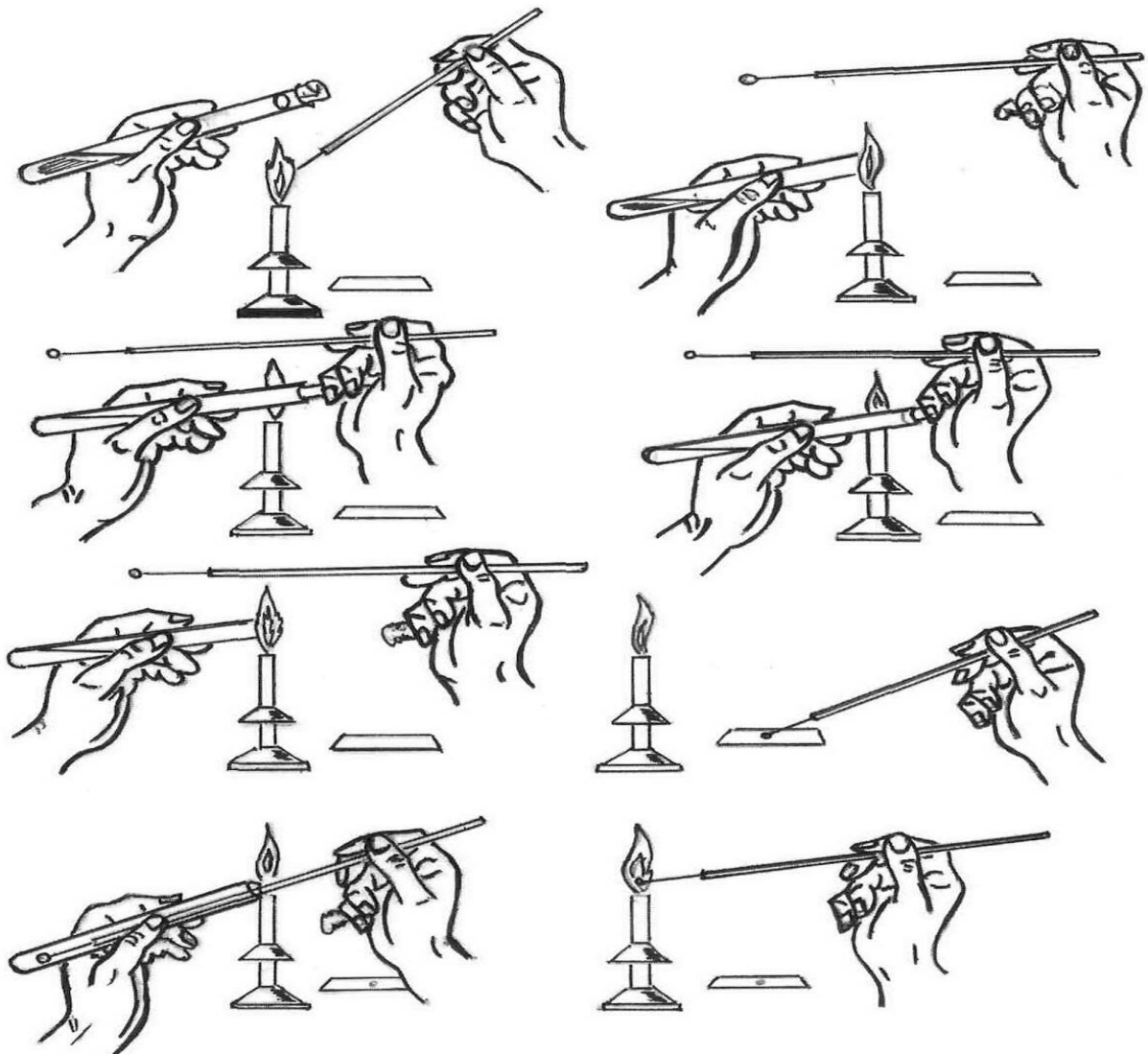
➤ Натерти робочу поверхню скла шматочком мила, а потім ретельно витерти її сухою серветкою.

Чисті скельця зберігати в посудині з притертою пробкою в суміші рівних об'ємів спирту і ефіру або в 96%-му спирті.

Послідовність відбору і нанесення зразка мікроорганізмів на предметне

скло наведено на рис. 4.

В незабарвленому стані мікроорганізми досліджують шляхом виготовлення препаратів методом «роздавлена» та «висяча крапля».



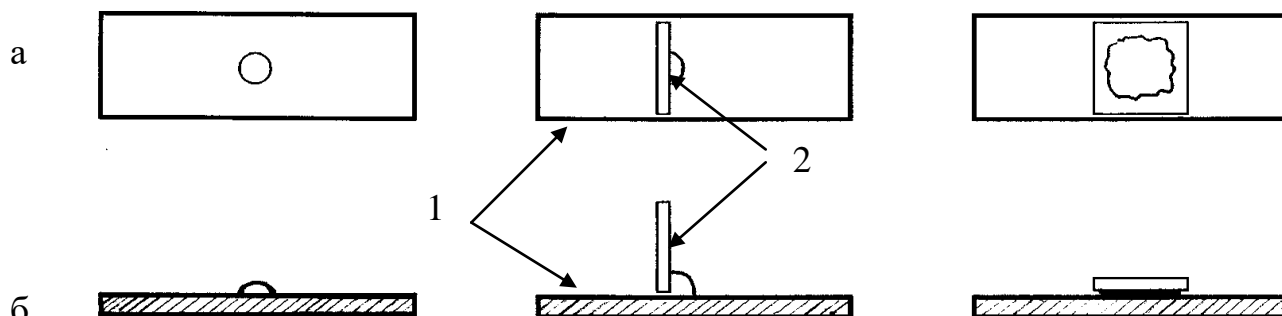
**Рис. 4. Послідовність нанесення зразка мікроорганізмів на предметне скло**

**Виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «роздавлена крапля».**

На чисте і знежирене предметне скло препарувальною петлею нанести досліджувану культуру (культуру дріжджів). Якщо мікроорганізми знаходилися в суспензії (у рідкому живильному середовищі), їх наносять безпосередньо на предметне скло. Якщо ж матеріал узятий з щільного живильного середовища, тоді його внести до нанесеної заздалегідь на предметне скло краплю стерильної водопровідної води, стерильного фізіологічного розчину або бульйону. Можна також з культури, вирощеної на щільному живильному середовищі, заздалегідь приготувати суспензію мікроорганізмів. Для цього в пробірку з мікроорганізмами, що виростили на

косому агарі, внести 4–5 мл стерильного фізіологічного розчину або водопровідної води і, обертаючи пробірку між долонями, змити клітини мікроорганізмів з поверхні середовища.

На предметне скло на край краплі опустити ребром під кутом  $45^{\circ}$  покривне скло і, обережно нахилиючи, покласти його на краплю так, щоб під ним не утворилися бульбашки повітря (рис. 5).

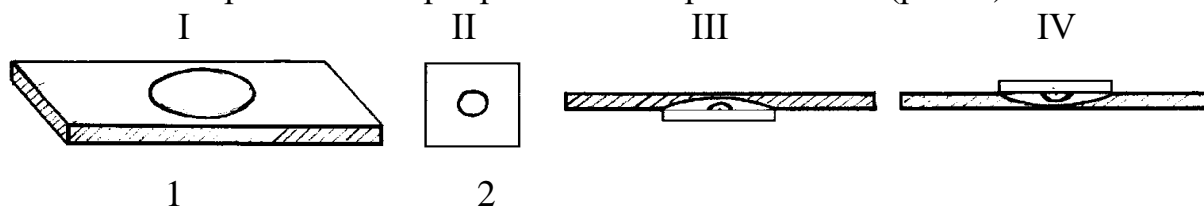


**Рис. 5. Схема виготовлення препарату «роздавлена крапля».**  
**а – вигляд зверху; б – вигляд збоку; 1 – предметне скло;**  
**2 – покривне скло.**

Краплю потрібно брати такої величини, щоб вона заповнювала весь простір між покривним і предметним склом і не виступала за краї покривного скла. Якщо рідина буде нанесена в надлишку, її необхідно видалити за допомогою смужок фільтрувального паперу.

Препарат живих клітин мікроорганізмів розглянути при малому і великому збільшенні мікроскопа, замалювати та підписати.

**Виготовлення препарату живих клітин мікроорганізмів методом «висяча крапля».** Для виготовлення препарату «висяча крапля» взяти скло з шліфованою лункою. Краї лунки змастити вазеліновим маслом, гліцерином або просто водою. На покривне скло стерильно в центр нанести краплю досліджуваного матеріалу (культуру дріжджів). Потім предметне скло перевернути лункою вниз і помістити на покривне так, щоб крапля знаходилася в центрі лунки, не стикаючись з її краями. Предметне скло легенько притиснути до покривного і перевернути. У герметичній камері, що утворилася, крапля не висихає, що дозволяє спостерігати за мікроорганізмами тривалий час (рис. 6).



**Рис. 6. Схема виготовлення препарату «висяча крапля».**  
**I-IV – етапи виготовлення препарату; 1 – предметне скло з лункою;**  
**2 – покривне скло з краплею.**

Препарат живих клітин мікроорганізмів розглянути при малому і

великому збільшенні мікроскопа, замалювати та підписати.

#### **4. Прижиттєве забарвлення клітин мікроорганізмів.**

Препарат з прижиттєвим забарвленням мікроорганізмів готується подібно до препарату методом „роздавлена крапля”.

На чисте і знежирене предметне скло препарувальною петлею нанести досліджувану культуру (культуру дріжджів). Якщо мікроорганізми знаходилися в суспензії (у рідкому живильному середовищі), їх наносять безпосередньо на предметне скло. Якщо ж матеріал узятий з щільного живильного середовища, тоді його внести до нанесеної заздалегідь на предметне скло краплю стерильної водопровідної води, стерильного фізіологічного розчину або бульйону.

На предметне скло на край краплі опустити ребром під кутом 45° покривне скло і, обережно нахилиючи, покласти його на краплю так, щоб під ним не утворилися бульбашки повітря. Краплю потрібно брати такої величини, щоб вона заповнювала весь простір між покривним і предметним склом і не виступала за краї покривного скла. Якщо рідина буде нанесена в надлишку, її необхідно видалити за допомогою смужок фільтрувального паперу.

Поряд з покривним склом на предметне скло нанести краплину барвника, а з іншої сторони покривного скла покласти смужку фільтрувального паперу, щоб він відтягував рідину з-під покривного скла, а під покривне скло потрапляв водний розчин барвника.

#### **Порядок дослідження виготовлених препаратів живих клітин під мікроскопом.**

1. Заздалегідь виконати налаштування освітлення мікроскопа. З цією метою з тубуса вийняти окуляр і, спостерігаючи прямо в об'єктив, встановити дзеркало так, щоб джерело світла було в центрі об'єктиву.

2. Після попереднього налаштування освітлення на предметний столик мікроскопа покласти препарат і закріпити його клемами.

3. Дослідити препарат, користуючись сухим об'єктивом (40<sup>x</sup>). За допомогою макрометричного гвинта опустити об'єктив до препарату, не допускаючи дотику його з покривним склом (або предметним). Після цього, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта поволі підняти об'єктив вгору до появи контурів об'єкту у полі зору мікроскопа. На цьому етапі за допомогою конденсора шляхом переміщення його вгору або вниз додатково відрегулювати інтенсивність освітлення. Потім обертанням мікрометричного гвинта добитися якнайкращої чіткості зображення.

4. При переході від малого збільшення до великого об'єкт встановити строго по центру поля зору і лише після цього за допомогою револьвера поміняти об'єктив. В цьому випадку препарат (об'єкт) залишається у фокусі, що полегшує подальше його дослідження.

5. При переході на імерсійний об'єктив після того, як препарат встановлений в центрі поля зору, за допомогою макрометричного гвинта підняти об'єктив на 2–3 см від предметного скла і нанести на мазок скляною паличкою краплю імерсійного масла. За допомогою револьвера встановити в

робоче положення об'єктів  $90^{\times}$  і, обертаючи макрометричний гвинт за годинниковою стрілкою, занурити його в імерсійну рідину, уникаючи при цьому дотику до поверхні предметного або покривного скла. Цей етап слід контролювати, дивлячись на об'єктив збоку. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрометричного гвинта поволі піднімати об'єктив до появи у полі зору контурів зображення об'єкту або забарвленої плями. Після цього чіткість зображення коректувати за допомогою мікрометричного гвинта.

6. При зміні препарату або після закінчення мікроскопіювання тубус мікроскопа підняти, препарат зняти з предметного столика і, якщо дослідження проводилося з імерсійною системою, фронтальну лінзу об'єктиву ретельно очистити від масла, протерши серветкою, змоченою у бензині.

Виготовлені препарати «роздавлена крапля» і «висяча крапля» переглянути спочатку з об'єктивами  $20^{\times}$  або  $40^{\times}$ , а потім з імерсійним об'єктивом.

Фіксовані забарвлені препарати мікроскопіювати спочатку з об'єктивом  $40^{\times}$ , потім – з об'єктивом  $80^{\times}$ . У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається світлим і чистим, а забарвленими виявляються клітки мікроорганізмів.

7. Всі проглянуті під мікроскопом препарати замальовати. Під кожним малюнком вказати назву об'єкту і збільшення мікроскопа, при якому розглядався препарат.

## Лабораторне заняття №2 СПОСОБИ ПРИГОТУВАННЯ І РЕЦЕПТУРА СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

**Мета роботи:** Ознайомитися з способами виготовлення та рецептурою найбільш поширених середовищ що використовуються для культивування патогенних мікроорганізмів на прикладі фітопатогенних бактерій.

Елективні середовища (табл. 1) застосовують для виділення специфічних видів фітопатогенних бактерій з місць їхнього природного мешкання, де багато інших мікроорганізмів

Таблиця 1

### Елективні середовища

Поживне середовище	Склад компонентів на 1 л води, г	Призначення середовища
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Середовище	Гліцерин (20), $KNO_3$ (5), $KH_2PO_4$ , $MgSO_4$	Для виділення

Ліске	(1)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Середовище Іванова	Гліцерин (30), подвійна сіль лимонно-кислого заліза (10), таурохолевий натрій (3), хлорид натрію (15), сульфат натрію (2,5), фосфорнокислий натрій двозаміщений (2,5), хлорид кальцію (1), сульфат магнію (0,1), агар-агар (17)	Для виділення <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>
Середовище Пателя	Натрій таурохолевий (3), який затримує ріст грампозитивних бактерій, пептон (10), глюкоза (20), кристалвіолет 1:1000 (1). Стерилізують 15 хв за 1 атм	Для виділення <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Середовище Келмана	Пептон (10), гідролізат казеїну (1), глюкоза (5), агар-агар (17), 2, 3, 5 - трифенілтетразолій хлорид (0,05), який є інгібітором росту грампозитивних бактерій, додають до розплавленого агару у вигляді 1% водного розчину, щоб кінцева концентрація ТТХ в середовищі була 0,005%	Для виділення <i>Ralstonia solanacearum</i>
Середовище Ендо	До МПА додають лактозу (10) та індикатор (1 мл насиченого спиртового розчину фуксину основного, знебарвленого 10% свіжоприготованим розчином сульфату натрію). Середовище знебарвлене	Для ізолювання бактерій роду <i>Ervinia</i>
Середовище Ейкмана	Пептон (10), $\text{NaCl}$ (5), глюкоза (10). Розчин фільтрують крізь паперовий фільтр, додають індикатор бромтимолблау і стерилізують дробно поточним паром за 100°C три доби поспіль по 30 хв щодня.	Для диференціації фітопатогенних бактерій роду <i>Ervinia</i> від бактерій роду <i>Escherichia</i>
Середовище Ліча і Ліля	Гідролізат казеїну (2), фумарова кислота (1,3), $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1), $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0.5) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1,1) $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0,2 мг) $\text{ZnSO}_4$ (0,2 мг) $\text{MnSO}_4$ (0,1 мг) глюкоза (15), агао-агар (20) рН 6,0	Для виділення і культивування бактерій роду <i>Xanthomonas</i>
Пектатне середовище Догана (в модифікації І.В. Воронкевич та	$\text{NaCl}$ (5), сульфат магнію (0,2), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1), $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1), $\text{CaCl}_2$ (3), цитрату натрію (3), 3 мл 0,1% розчину генціан - віолету, 3 мл 1,5 % розчину бромтимолблау, агар-агару (20). Середовище стерилізують 20 хв за 0,5 атм і розливають в чашки Петрі.	Для виділення з ґрунту і ризосфери рослин збудників м'яких гнилей

ін., 1972)	Поверхню підсушують впродовж доби, потім на неї розміщують 4 мл розчину поліпектату натрію, який застигає за кімнатної температури через добу. Пектатний шар – 2 г поліпектата натрію розчиняють у 6 мл етанолу. 0,1г ЕДТА, розчиняють в 100 мл дистильованої води і додають до розчину пектата (рН 7,4). Розчин автоклавують (5 хв за 1 атм) і після охолодження до 40–50°C розливають на холодний основний шар	роду <i>Ervinia</i>
Середовище Буркгольдера	Очищену і нарізану шматочками картоплю (300) кип'ятять, фільтрують, доводять до попереднього обсягу, додають пептон (5), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2), №С1 (5), лимоннокислий натрій (1), аспарагін (6), глюкозу (6), агар-агар (20) і стерилізують 30 хв за 1 атм	Для виділення і культивування фітопатогенних бактерій <i>Clavibacter sepedonicum</i>
Пептонно-дріжджевий агар	Дріжджі (3), пептон (5), агар-агар (15), рН 7,2	Для виділення <i>P. syringae</i> і <i>E. amylovora</i>
Середовище для <i>E. amylovora</i>	Натрій виннокислий (10), натрій диактилсульфофукцинат (0,1), NaNO <sub>3</sub> (2), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1), MnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (0,5), KCl (0,5), FeSO <sub>4</sub> (сліди), рН 5,5	Для виділення <i>E. amylovora</i>

МПА з додаванням малахіт - грюна або генціан - віолету (кристал - віолету). Фарби малахіт-грюн або генціан-віолет, додані до МПА в концентрації 1:100 000, пригнічують ріст спорових і грампозитивних бактерій, майже не завдаючи впливу грамнегативним фітопатогенним бактеріям.

*Середовище Мальмана.* Іноді, виділяючи з рослин грампозитивні збудники бактеріальних хвороб, необхідно затримати ріст грамнегативних бактерій. Для цього готують середовище з додаванням біхромату калію (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Стерильний розчин біхромату калію, попередньо приготований в концентрації 1:1000, додають до розплавленого і охолодженого до 50°C твердого середовища Буркгольдера (табл. 1) з розрахунку 1:10 000. Ліпше агар і розчин біхромату калію змішувати в чашці Петрі, наливаючи 1 мл розчину солі і 10 мл розплавленого агару.

*Середовище Пателя* слугує для виділення *Agrobacterium tumefaciens* (табл. 1). Містить сіль таурохолевої кислоти, яка затримує ріст грампозитивних бактерій.

*Середовище Келмана* з вмістом 2, 3, 5 - трифенілтетразолію хлориду використовують для виділення штамів *Ralstonia solanacearum*. На цьому

середовищі патогенні штами *R. solanacearum* ростуть білими колоніями з рожевим центром, непатогенні – у червоними колоніями з вузькими синіми краями.

*Пектатне середовище Погана* (в модифікації І. В. Воронкевич та ін., 1972) використовують для виділення з ґрунту і ризосфери рослин збудників м'яких гнилей роду *Pectobacterium* (*Ervinia*). За висівання ґрунтової суспензії на це середовище збудники м'яких гнилей роду *Pectobacterium* (*Ervinia*) утворюють блакитні колонії в поглибленнях. Цей метод дає змогу виявити збудників м'яких гнилей у ґрунті за чисельності не менше  $2 \times 10^2$  бактеріальних клітин в 1 г ґрунту.

*Картопляний агар з 2, 3, 5 - трифенілтетразолієм хлоридом* також може бути використано для виявлення збудників м'яких гнилей у ґрунті. На картопляному агарі з 0,005% ТТС збудники м'яких гнилей рослин роду *Pectobacterium* (*Ervinia*) утворюють темно-червоні, іноді фіолетові колонії з опуклим центром темнішого забарвлення; краї колоній білі.

*Середовище Ейкмана* застосовується для диференціації фітопатогенних бактерій з роду *Pectobacterium* (*Ervinia*) від кишкової палички та її різновидів, що належать до роду *Escherichia*.

*Середовище Кларка*. Використовується для визначення фітопатогенних бактерій роду *Ervinia* при пробі Фогес-Проскауера і пробі з метилротом.

Наступні діагностичні поживні середовища використовують за вивчення біохімічних властивостей бактерій, що необхідно для визначення їх видової приналежності.

*МПА з крохмалем*. До 1 л гарячого розплавленого МПА додають 5 г розчинного крохмалю, попередньо розведеного у невеликій кількості холодної води і доливають до агару помішуючи. Потім середовище розливають (не фільтруючи) у пробірки (по 10 мл) або колби і стерилізують за 1 атм 30 хв.

*МПБ з селітрою*. До 1 л МПБ додають 2 г хімічно чистого нітрату калію. Після розчинення селітри середовище розливають у пробірки і стерилізують за 1 атм 30 хв.

*Молоко*. Свіже знежирене (сепароване або зібране) молоко розливають у стерильні пробірки і стерилізують впродовж 10 хв. за 0,5 атм. Після стерилізування молоко витримують три доби в термостаті за температури 20–30°C, щоб надати можливість прорости споровим та іншим стійким до нагрівання формам бактерій. За три доби всі пробірки переглядають і видаляють ті, на яких вирости мікроорганізми.

*Лакмусове молоко*. До знежиреного молока додають настоянку лакмусу (близько 5 мл на 100 мл молока) до слабо синього забарвлення середовища. Потім молоко розливають у стерильні пробірки і стерилізують так само, як і просте молоко з подальшою 3-добовим витриманням в термостаті.

Розчин лакмусу (азолітину) готують розчиненням 10 г лакмоїду в 150 мл спирту та наступним фільтруванням. Приготовану лакмусову настоянку стерилізують текучою парою або за 0,5 атм 20–30 хв.

*Синтетична лакмусова настоянка*. До 1 л дистильованої води додають



20 г лактози, 0,4 г глюкози, 1г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2г натрію лимоннокислого, 5 г  $\text{NaCl}$ , 0,05г пептону та розчин азолітину (лакмоїду) до набуття синього кольору.

Для визначення цукролітичних властивостей використовують спеціальні поживні середовища, беручи за основу середовище Омелянського, Гіса та ін.

*Середовище Гіса.* Його використовують для визначення використання цукрів та інших сполук вуглецю. Спочатку готують пептонну воду: до 1 л дистильованої води додають 10 г сухого пептону і 5 г кухонної солі. Після розчинення встановлюють рН 7–7,4; додають 0,5 % відповідного цукру і 1% лакмусової настоянки (іноді дещо більше) до слабо синього забарвлення середовища, розливають у пробірки і стерилізують в автоклаві за 0,75 атм 20–30 хв. Після стерилізування пробірки з середовищем витримують три доби в термостаті за температури 28 - 30°C, потім розглядають кожну пробірку і помутнілі або із зміненним забарвленням середовища вибраковують.

Значно зручніше для визначення зброджування вуглеводів використовувати готові поживні середовища Гіса з різними вуглеводами і індикатором ВР, що виготовляються промисловістю у вигляді порошків. Порошок (2 г) висипають у холодну дистильовану воду (100 мл), підігривають до розчинення, розливають у стерильні пробірки і стерилізують 20 хв. за 0,75 атм. Після стерилізування та охолодження середовище має напіврідку консистенцію, оскільки містить 0,5 % агар-агару. Забарвлення середовища жовтуваторожеве або блідо-рожеве з опалесценцією. Індикатор ВР являє собою суміш розолової кислоти і блакитної водяної. У кислому середовищі він набуває інтенсивного синього кольору, у лужному – від слабо-рожевого до червоного. Якщо бактерії зброджують цукор з утворенням кислоти, то середовище синіє; газоутворення встановлюють за розривами застиглого поживного середовища в місцях скупчення бульбашок газу.

*Середовище Андреде.* Також використовують для визначення зброджування вуглеводів. Відрізняється від середовища Гіса тим, що до лептонної води з 0,5% відповідного цукру додають замість лакмусу 1% розчин індикатора Андреде. Середовище розливають і стерилізують так само, як і середовище Гіса. Для приготування індикатора Андреде 0,5 г кислого фуксину розчиняють в 100 мл дистильованої води з додаванням 16,4 мл нормального розчину їдкого натрію. Розчин настоюють упродовж двох годин, а потім фільтрують. Розчин стерилізують 5 хв. за температури 100°C. Індикатор має солом'яно-жовтий колір. За підкислення середовища він набуває яскравомалинового забарвлення.

Вирощуючи бактерії на середовищах з цукрами або спиртами, як індикатори можна застосовувати також розчин бромтимолблау або бромкрезолпурпурового, додаючи 1–2% на 1 л середовища напередодні стерилізування. Використовують 1,6% розчини індикаторів на 96% етанолі. Обидва індикатори за підкислення середовища забезпечують жовте забарвлення.

У лабораторній практиці часто визначають зброджування вуглеводів не на середовищах Гіса і Андреде, а на синтетичних поживних середовищах з мінеральним джерелом азоту. Пояснюється це тим, що деякі бактерії не зброджують вуглеводи, тому що використовують як джерело енергії вуглецевий ланцюг білків або пептонів, за відсутності останніх (у разі вирощування на синтетичних середовищах) бактерії можуть зброджувати і відповідні вуглеводи.

### Лабораторне заняття №3

## ВІДБІР І ПІДГОТУВАННЯ ЗРАЗКІВ ДЛЯ ФІТОБАКТЕРІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Мета роботи:** Ознайомитися з методикою та провести відбір зразків для фітопатогенних досліджень.

Відомо, що бактеріальні хвороби уражують всі органи рослин, спричиняючи на них різні типи бактеріозів. Бактеріальні хвороби рослин характеризуються різноманітністю зовнішніх ознак свого прояву на рослинах. Основні типи бактеріальних хвороб:

1. Паренхіматозні ураження – некрози, плямистості (пігментована, наріжна, округла, розпливчаста тощо), опіки, які характеризуються почорнінням і відмиранням окремих органів чи тканин рослин та гнилі.

2. Судинні та судинно-паренхіматозні хвороби, що призводять до в'янення всієї рослини або відокремлених її частин.

3. Пухлини чи новоутворення, які можуть бути на наземних і підземних органах рослин.

4. Змішані типи ураження, коли на одній рослині є декілька ознак хвороби, наприклад, в'янення, розтріскування стебел і плямистість плодів.

За деяких бактеріозів зовнішні симптоми бувають настільки характерні, що на підставі них можна визначити хворобу і назвати збудника. Проте такі випадки нечисленні. Симптоми бактеріальних хвороб різноманітні, але лише за симптомами встановити збудника практично неможливо. Тим більше, що в останніми роками розвиток класичних симптомів розвитку патологічного процесу часто супроводжується появою нетипових плямистостей або некрозів на рослинах. До того ж, часто ми спостерігаємо комплексну інфекцію. Для діагностування бактеріального захворювання необхідно здійснити бактеріологічний аналіз уражених тканин, ізолювати бактерії, визначити їхні патогенні властивості та ідентифікувати збудника. Тому, добір зразків уражених бактеріями органів рослин для бактеріологічного аналізування потрібно виконувати дуже ретельно.

**Відбір зразків рослин.** Для виділення збудників бактеріозів рослин використовують гербарні і фіксовані зразки. Але свіжі, уражені бактеріозами рослини, є найкращим матеріалом для дослідження, особливо для ізолювання збудника хвороби. Виявлено, що деякі види фітопатогенних бактерій може бути виділено лише з щойно отриманих з живої рослини зразків. Але цей метод поширюється і на інші збудники бактеріозів. Оскільки із свіжозібраних зразків рослин збудники виділяти простіше і скоріше. Виділення із зразків, які зберігають впродовж деякого часу, проходить гірше, а ще гірше – із гербарних зразків. Але фітопатогенні бактерії – збудники бактеріозів квасолі, сої, тютюну прекрасно зберігаються тривалий час в гербарних зразках. Тому, ці факти необхідно враховувати, добираючи уражений рослинний матеріал для бактеріологічного аналізування

Добір зразків ураження рослин здійснюють особливо ретельно. Добирають рослини з найтипівішими симптомами ураження. Повторимося, що вкрай важливо мати свіжий матеріал, пам'ятаючи, що деякі фітопатогенні бактерії швидко гинуть у зрізаних гілках та інших частинах рослин, а інші виділяються з сухого матеріалу з великими труднощами. Виділення збудника в чисту культуру здійснюють із зразків з початковою стадією хвороби, оскільки у відмерлій тканині розвивається різноманітна неспецифічна мікробіота.

За добору рослинного матеріалу необхідно дотримуватись наступних правил:

1. Рослинний матеріал повинен відбиратися, по можливості, стерильно та завжди у стерильний папір (обгортковий, фільтрувальний, газетний) або посуд. Категорично заборонено використовувати целофан, поліетиленову плівку, пергамент, клейонку та інші подібні матеріали.

2. Зібраний рослинний матеріал якомога швидше має бути доставлено у лабораторію, оскільки деякі фітопатогенні бактерії швидко гинуть.

3. Доставлений у лабораторію рослинний матеріал аналізують і висівають на відповідні поживні середовища.

Кожен дібраний рослинний зразок нумерують і детально описують симптоми ураження. Для кожного типу бактеріального ураження необхідно відібрати декілька зразків (п'ять-десять). Якщо бактеріологічний аналіз дібраного матеріалу здійснюють не відразу, а згодом, його потрібно обробити, щоб він не зіпсувався. Так, із зразків з різноманітними плямистостями готують гербарій. За наявності стеблових гнилей, особливо мокрих, стебла необхідно злегка підсушити. За добору окремих органів рослин, уражених в'яненням, кореневі шийки і корені також потрібно підсушувати. Бульби картоплі, коренеплоди, цибулини сільськогосподарських культур та інші забруднені ґрунтом органи рослин очищають від землі і обсушують у затінку.

Візуально оглядаючи уражені листки, необхідно описувати форму плям (наріжна, округла, розпливчата тощо), розмір, розташування, колір, краї, наявність маслянистості, хлорозного ореола, забарвлення і характер облямівки, яка відокремлює пляму від здорової тканини, наявність

бактеріального ексудату. За добору зразків, уражених бактеріальною гниллю, вказують характер ураження (загальна мокра або локальна місцева гниль), забарвлення ураженої тканини (бура, чорна, кремова, безбарвна), її консистенцію, запах.

**Відбір зразків ґрунту.** У лабораторній практиці найпоширенішим є застосування класичних методів мікробіології. Щодо мікробіологічного аналізуваннн ґрунтів, дослідження ґрунтуються на методі обліку чисельності мікроорганізмів висіванням ґрунту (ґрунтової суспензії) на тверді (метод Коха) і в рідкі поживні середовища та прямому підрахунку клітин]. Залежно від мети, об'єктами для мікробіологічних досліджень можуть бути орні ґрунти, цілина тощо. Вивчають мікробні угруповання різних ґрунтових горизонтів, паруючих ґрунтах, у ризосфері, ризоплані та гітосфері рослин. Зауважимо, що ґрунти мають високу гетерогенність, тому для мікробіологічного аналізуваннн використовують середній зразок (змішану пробу) з досліджуваної ділянки. Зразки відбирають, запобігаючи пошкодженню кореневої системи. Не слід відбирати зразки за високої вологості ґрунту. Щодо швидкості – мікробіологічні дослідження зразків мають здійснюватися негайно, або не пізніше 12–24 год після відбирання, оскільки при зберіганні склад мікробіоти ґрунту змінюється. У разі, відсутності змоги негайно проаналізувати зразки, допускається їхнє висушування, проте кількість мікроорганізмів зменшується і співвідношення окремих груп порушується. Водночас, слід враховувати, що більшість лабораторій розташовано на значній відстані від дослідних ділянок. Проміжок часу від початку відбирання зразків до початку аналізуваннн інколи сягає 36 год, тому висушування ґрунту за цих умов є необхідним заходом, але за тривалих (моніторингових) досліджень цей час має бути однаковим.

Висушують ґрунт безпосередньо після відбирання за 2–4 год за температури не вище 30°C. Сухі зразки зберігають у пергаментних пакетах, розміщених у полотняні торбинки у холодильнику за температури 5–8°C.

Враховуючи зазначене раніше, для мікробіологічного аналізуваннн необхідно точно відібрати й отримати середню пробу ґрунту (окрім різних горизонтів ґрунтового профілю, які досліджують індивідуально), від відбирання до аналізуваннн зменшити час зберіганнн зразків. Залежно від об'єкта досліджень, для відбираннн використовують лопати, ножі та бури, які мають бути чистими, а за необхідності стерильними, що досягається фламбуванням їх у полум'ї.

Для якісного аналізуваннн необхідно отримати суспензію, в якій мікроорганізми знаходяться як поодинокі клітини. Для виконання цієї умови необхідно здійснити: диспергування ґрунтових агрегатів; десорбцію клітин мікроорганізмів з ґрунтових частинок; розділення мікроколоній на окремі клітини, що досягається механічною дією на зразки ґрунту.

Отже, щоб ґрунтова проба була репрезентативною, важливо дотримуватись вимог щодо відбираннн зразків ґрунту і готування їх до мікробіологічного аналізуваннн, що дасть змогу найповніше

охарактеризувати різноманіття ґрунтових мікроорганізмів та отримати достовірні дані.

**Методика відбирання зразків ґрунту.** Територію, яка досліджується, розбивають на елементарні ділянки і визначають відстань між точковими пробами. Останні відбирають стерильним ґрунтовим буром. На ущільнених ґрунтах допускається відбирання точкових проб стерильною лопатою (перед відбиранням проби ґрунту бур та лопату обтирають змоченим у спирті тампоном з вати, який потім запалюють, для стерилізування бура та лопати у полум'ї).

Точкові проби не допустимо відбирати поблизу доріг, скупчення органічних та мінеральних добрив, меліорантів, на ділянках, що значно різняться за станом рослин. У межах кожної елементарної ділянки точкові проби відбирають рівномірно, маршрутною ходою за рівними інтервалами. З точкових проб, відібраних з елементарної ділянки, готують змішану пробу. Якщо в межах елементарної ділянки розташовано декілька ґрунтових контурів, змішані проби відбирають з контуру, що переважає. За відбирання проб необхідно враховувати макро-, мезо- і мікрогетерогенність ґрунтів за всіма властивостями.

На полях із сіянцями та саджанцями точкові проби відбирають у міжряддях. На орних ґрунтах точкові проби відбирають на глибину орного шару, на сінокосах та пасовищах – на глибину верхнього горизонту, але не глибше 10 см.

Вивчаючи орні ґрунти, видаляють лише невеликий верхній шар ґрунту (від 2 до 2,5 см), який може бути забруднено сторонньою мікробіотою. З шару ґрунту, вийнятого лопатою, стерильним ножом відбирають ґрунтові проби.

Характеризуючи кількісний та якісний склад мікробіоти ґрунту, аналізують ретельно відібрану ґрунтову пробу, яку отримують змішуванням від 3 до 7 точкових проб. Якщо необхідно охарактеризувати мікробіоту ділянки площею в 1 га, на ній обирають 5 повздовжніх смуг по 100 м. На кожній із них відбирають 5 зразків ґрунту. Якщо ділянка менше ніж 100 м<sup>2</sup>, відбирають 3 проби за діагоналлю. Маса змішаної проби ґрунту має становити 400–500 г.

За вивчення розподілу мікроорганізмів по ґрунтовому профілю, проби відбирають за генетичними горизонтами із ґрунтового розрізу, починаючи від материнської породи. Розріз має викопуватися безпосередньо перед відбиранням зразків. Зразки беруть із тієї частини горизонту, в якій найбільше виражено його морфологічні ознаки.

Змішану пробу ґрунту масою 400–500 г переносять у стерильну колбу ємністю 1 дм<sup>3</sup> і закривають ватно-марлевою пробкою. Для кожної проби простим олівцем пишуть етикетку, в якій зазначають дату відбирання проби, точну назву поля, горизонт, з якого відібрано пробу.

У вегетаційних дослідях ґрунтові проби відбирають з кожної посудини окремо з двох боків стерильним буром на всю глибину ґрунту.

Повторимось, що мікробіологічні дослідження бажано здійснювати у

день відбирання проб ґрунту, оскільки за тривалого зберігання зразків змінюється кількісний та якісний склад ґрунтової мікробіоти.

Для точного обрахування чисельності мікроорганізмів у ґрунті потрібно визначити його вологість. Для цього алюмінієвий бюкс зважують на лабораторних вагах з точністю до 0,01 г. Зі змішаної проби 10 г ґрунту фарфоровим шпателем переносять у бюкс. Відкритий бюкс ставлять у сушильну шафу за температури 100–105°C, витримуючи до сталої маси близько 3 год.

Після просушування бюкс закривають кришкою, охолоджують не менше 45 хв і зважують на лабораторних вагах. Просушування повторюють впродовж 2 год. Якщо маса бюкса після другого просушування не змінилася, просушування припиняють. Різниця між двома останніми зважуваннями не має перевищувати 0,01 г.

Масову частку вологи у ґрунті  $G$  у відсотках обраховують за формулою:

$$G = (m \times 100) / m_1,$$

де  $m$  - маса вологи, г;  $m_1$  - маса сухого ґрунту, г; 100 - коефіцієнт для перерахунку у відсотки, %.

$m = m_2 - m_3$ , де  $m_2$  - маса бюкса з пробєю до висушування, г;  $m_3$  - маса бюкса з пробєю після висушування, г.

Коефіцієнт вологості ґрунту  $K$  для перерахунку чисельності мікроорганізмів у пробі на суху речовину обчислюють за формулою:

$$K = 100 / (100 - G),$$

де  $G$  - вологість ґрунту, %.

Як зазначено раніше, за здійснення кількісного обліку ґрунтових мікроорганізмів необхідно:

- 1) диспергування ґрунтових агрегатів;
- 2) десорбцію клітин мікроорганізмів із ґрунтових часток;
- 3) поділ мікроколоній на окремі клітини. Процедуру здійснюють розтираючи ґрунт, зволожений до пастоподібного стану, обробленням проби на мікроподрібнювачі тканин або ультразвуком низької частоти та потужності.

Особливо ретельне проведення попереднього готування ґрунтів до мікробіологічного аналізування необхідне за порівняння чисельності мікроорганізмів у ґрунтах різних типів, що різняться за структурою, у ґрунтових зразках з різних горизонтів та ґрунтах із різним ступенем вологості.

Наважку зі змішаної проби ґрунту масою 10 г переносять у колбу ємністю 250 см<sup>3</sup> з 90 см<sup>3</sup> стерильної води. Ґрунтову суспензію обробляють на ультразвуковому пристрої впродовж 3 хв (сила струму 0,40 А, частота 15 кГц). Ультразвукове оброблення сприяє десорбції мікроорганізмів з часточок ґрунту і використовується за готування ґрунтової суспензії для вивчення кількісного та якісного складу мікробіоти за світлового, люмінесцентного та електронного мікроскопіювання.

За відсутності в лабораторії ультразвукового пристрою для готування

грунтової суспензії (1:10 - 10г ґрунту на 90 см<sup>3</sup> стерильної води) 10 г ґрунту розміщують у фарфорову ступку, зволожують стерильною водою з колби ємністю 250 см<sup>3</sup> і розтирають стерильним товчачиком або пальцем у стерильній гумовій рукавичці до пастоподібного стану впродовж 5 хв.

Для ефективного оброблення ґрунту перед проведенням мікробіологічних аналізів та для визначення довжини гіф грибів використовують мікроподрібнювачі тканин. У стерильну склянку розміщують 10 г ґрунту і додають 90 см<sup>3</sup> стерильної води з колби ємністю 250 см<sup>3</sup>. Ґрунтову суспензію диспергують впродовж 5 хв за 5000 об./хв. Готують потрібне для висівання розведення. Стержень і пропелер мікроподрібнювача ретельно очищають від ґрунтових часток, механічно видаляючи їх водогінною водою і чистою серветкою. Потім стержень протирають спиртом, якому дають випаруватися, й роблять оброблення нової проби ґрунту. Для готування кожного зразка ґрунту до аналізування використовують порізнений стерильний скляний посуд.

#### **Практичне заняття № 4**

### **МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ ПОСІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ НА ТВЕРДІ, РІДКІ ТА НАПІВРІДКІ ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА**

**Мета роботи:** Ознайомитися з методикою посіву мікроорганізмів з різних за гранулометричним складом ґрунтів та зерна різних культур методом граничних розведень та провести посів мікроорганізмів.

**Матеріали та обладнання:** 1) стерильні запаковані комплекти чашок Петрі; 2) пробірки, що містять 9 мл стерильної води; 3) колби, що містять 99 мл стерильної води; 4) стерильні запаковані піпетки на 1 мл; 5) ґрунт різного гранулометричного складу; 6) зерно різних культур; 7) штативи паперові етикетки; 8) клей ПВА; 9) живильні середовища; 10) пакувальний папір; 11) апарат для збовтування рідини; 12) електронні ваги.

**Посів бактерій із різних ґрунтів для визначення їх кількості методом розведення.**

Цей метод за своєю точністю дає тільки орієнтовні дані, переважно про кількість аеробних мікробів у ґрунті. Проте внаслідок простоти і доступності його дуже часто застосовують у навчальних мікробіологічних лабораторіях. Згідно з цим методом ґрунтову суспензію висівають на тверді поживні середовища, вирощують на них колонії, підраховують та аналізують вирощені мікроорганізми.

**Проведення роботи.** Із зразка досліджуваного ґрунту або зерна відважують 1 г і роблять серію розведень у стерильній воді для одержання витяжки. Розведення готують так: у стерильну мірну колбу об'ємом 100 мл

вносять 1 г ґрунту або зерна, додають 99 мл стерильної води і збовтують впродовж 3 хв. Потім відстоюють 1,5 хв. і роблять наступне розведення (рис. 7).



**Рис. 7. Схема виготовлення розведень та посіву суспензії в чашки Петрі**

Для виготовлення кожного наступного розведення беруть окрему стерильну піпетку. У три стерильні чашки Петрі стерильною піпеткою вносять 1 мл ґрунтової суспензії (наприклад, 1:100 000) і розподіляють рівномірно по дні. Розплавлене стерильне середовище (МПА, БПА, КАА, ґрунтовий агар) із пробірки виливають у чашку і обережно перемішують поживне середовище з ґрунтовою суспензією плавними коливаннями. Після застигання середовища для видалення крапель води з кришок чашки Петрі підсушують, позначають і ставлять у термостат при температурі 28–30°C на 3–5 діб.

Потім підраховують (без відкривання кришки чашки) кількість колоній, що вирости на агарових пластинках. Найкращі результати одержуються при утворенні на чашках 20–50 колоній бактерій і 20–30 колоній грибів. Для підрахунку кількості колоній зручно користуватися спеціальними приладами дня підрахунку колоній. Якщо на площі чашки Петрі виростало дуже багато колоній, то для полегшення підрахунку її ділять на сектори, підраховують кількість пророслих колоній в одному секторі та перемножують отримане число на кількість секторів.

По закінченні підрахунків колоній визначають середнє з 3-х чашок і множать на розведення, взяте для аналізу. У такий спосіб одержують кількість аеробних мікробів у 1 г наважки. Для точного визначення кількості мікроорганізмів у 1 г ґрунту їх чисельність визначається в 1 г повітряно-сухого, а найточніших – абсолютно сухого ґрунту. Для таких розрахунків треба водночас визначати вологість ґрунтової проби.



**Деякі види мікроорганізмів** погано або зовсім не розвиваються на щільних поживних середовищах, тому для визначення їхньої чисельності у ґрунті знайшов широке застосування метод граничних розведень з посівом у рідкі та напіврідкі середовища. Цей метод також застосовують за визначення чисельності бактерій, які належать до окремих фізіологічних груп. Суть методу полягає у наступному. У пробірки з рідким або з напіврідким середовищем вносять точно вимірний об'єм суспензії з різних розведень досліджуваного субстрату (рис. 7). Після інкубування, з огляду на кількість пробірок, у яких спостерігався або був відсутній ріст, розраховують за допомогою таблиці Мак-Креді найімовірніше число клітин у  $1 \text{ см}^3$  вихідного субстрату.

*Посів на рідкі і напіврідкі середовища та реєстрація результатів.* Готують поживні середовища для розвитку певної фізіологічної групи мікроорганізмів, чисельність яких хочуть визначити. Розливають однаковий об'єм середовищ у пробірки (колби) і стерилізують. Готують граничні розведення досліджуваного субстрату так само, як і за висівання на тверді середовища. Висівання здійснюють з кожного розведення або із чотирьох-п'яти останніх. Один кубічний сантиметр кожного розведення стерильною піпеткою переносять у 3–5 паралельних пробірок. Засіяні пробірки розміщують у термостат. Час інкубування коливається від 3 до 10 діб і залежить від швидкості росту мікроорганізмів, чисельність яких визначають. Після інкубування реєструють ріст мікроорганізмів, використовуючи різні показники: помутніння середовища, утворення плівки, осаду, газу або нагромадження у середовищі певних продуктів метаболізму.

**Найімовірнішу кількість клітин в одиниці об'єму розраховують за таблицею Мак-Креді (табл. 5.6), розробленою на підставі методів варіаційної статистики. Для цього спочатку складають числову характеристику, яка включає три цифри.**

Перша цифра зліва показує число пробірок у тому останньому розведенні, за висівання суспензії з якого у всіх засіяних пробірках було відзначено ріст. Дві наступні цифри - число пробірок, у яких відмічено ріст мікроорганізмів за висівання із двох наступних розведень. За таблицею знаходять найімовірніше число мікроорганізмів, що відповідає даній числовій характеристиці. Кількість мікроорганізмів у  $1 \text{ см}^3$  ( $1 \text{ г}$ ) вихідного субстрату відповідає даному числу, помноженому на те розведення, яке було взято для одержання першої цифри числової характеристики.

Після проведення мікробіологічного аналізування та статистичного оброблення одержаних результатів, можна визначити спрямованість певних біологічних процесів у досліджуваних зразках. Досить зручно це досягають

розрахуванням: деяких відносних величин – коефіцієнтів та індексів (визначенням числових співвідношень двох контрастних за певними шляхами метаболізму популяцій бактерій), які відображають; співвідношення кількості мікроорганізмів, що визначені різними методами, на різних середовищах. У ґрунтовій мікробіології широко використовують відносні величини: індекси інертності та педотрофності, коефіцієнти оліготрофності та мінералізації в іммобілізації азоту.

**Індекс інертності** – це відношення числа мікроорганізмів, що обраховані під мікроскопом, до числа мікроорганізмів, які вирости на ґрунтовому агарі.

**Індекс педотрофності** – відношення кількості мікроорганізмів, що ростуть на ґрунтовому агарі, до кількості мікроорганізмів на органічно багатих середовищах (наприклад МПА). Він показує функціональність структури мікробного ценозу ґрунту.

**Коефіцієнт оліготрофності** – відношення кількості мікроорганізмів, що виявлено на «бідних» середовищах, до їхньої кількості, що вирости на «багатих» поживних середовищах (ГА/МПА). Демонструє забезпечення ґрунту легкозасвоюваними поживними речовинами.

**Коефіцієнт мінералізації й іммобілізації азоту** – показник інтенсивності процесів мінералізації та засвоєння азотних сполук у ґрунті, виражений відношенням кількості мікроорганізмів, що ростуть на поживному середовищі з амонійним азотом (крохмалеаміачний агар), до кількості мікроорганізмів, що виявлено на поживному середовищі з органічним азотом (МПА).

Отже, частина цих коефіцієнтів та індексів відображають елементи морфо-функціональної структури мікробних ценозів, а інші розкривають перебіг процесів у певних середовищах існування. Так, наприклад, високий коефіцієнт мінералізації свідчить про те, що у даному ґрунті активно відбуваються процеси мінералізації та іммобілізації азоту. Порівняно з контролем (наприклад, цілинним ґрунтом) це може бути одним із об'єктивних показників спрямованості процесів розкладання-синтезування органічної речовини. Чіткі уявлення особливостей функціонування мікробних ценозів дають статистичні коефіцієнти - коефіцієнти кореляції і детермінації.

## Лабораторне заняття №5

### ВИДІЛЕННЯ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ІЗ УРАЖЕНИХ ОРГАНІВ РОСЛИН НА ПРИКЛАДІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

**Мета роботи:** Ознайомитися з методикою та виконати виділення патогенних мікроорганізмів на прикладі фітопатогенних бактерій з уражених рослин та насіння.

**Виділення бактерій з уражених рослин.** Попередньо про бактеріальну природу ураження тканин рослини можуть свідчити приготовані різноманітними способами і забарвлені препарати. Зазвичай скальпелем вирізають не великі уражені шматочки тканини (5–7 мм). Зрізи розміщують в краплю води на чисте знежирене предметне скло і забарвлюють прижиттєво або готують фіксовані препарати (прижиттєве забарвлення і приготування мазка, фарбування за Грамом).

З сухих уражених тканин готують препарати - зіскрібки. Зіскоблену тканину скальпелем переносять в краплю води на знежирене предметне скло і рівномірно розподіляють тонким шаром по його поверхні. Препарат висушують на повітрі, фіксують, проводячи два-три рази над полум'ям пальника, і забарвлюють.

З уражених тканин соковитих стебел, плодів, бульб, коренеплодів готують препарати - відбитки. Скальпелем зрізають зовнішню тканину і до поверхні зрізу прикладають чисте знежирене предметне скло. Препарат висушують на повітрі, фіксують полум'ям пальника і забарвлюють. Присутність численних однорідних, коротких паличок (бактерій), може вказувати на бактеріальну природу хвороби, що потребує виділення бактерій - збудників, визначення їх патогенних властивостей та їх ідентифікування.

Бактеріологічний аналіз рослини здійснюють різними методами, залежно від ураженого органу, типу ураження, стану зразка, що аналізується (свіжий або гербарний матеріал) і низки інших умов. Приступаючи до виділення бактерій з рослин, у зоні полум'я пальника розливають розплавлені і охолоджені до 50–60°C поживні середовища (картопляний агар, м'ясопептонний агар тощо) в заздалегідь підготовлені стерильні чашки Петрі. Це найкраще робити в спеціальному лабораторному боксі на столі, вкритому пластиком або склом, попередньо протертим етиловим спиртом.

Для аналізування з досліджуваного зразка на межі ураженої і здорової тканини попередньо фламінованим (проведеним крізь полум'я пальника) і охолодженим скальпелем вирізають невеликі шматочки, які промивають впродовж 15–20 хв проточною водогінною водою в спеціальних ситечках або лійках. Потім декілька разів ретельно промивають стерильною водогінною водою і переносять в стерильну чашку Петрі.

Якщо використовують антисептики для поверхневої дезінфекції рослинного матеріалу, то зразки промивають ще ретельніше не менш як в

п'яти пробірках із стерильною водою. Адже таке ретельне відмивання дає змогу не застосовувати антисептики для поверхневої дезінфекції матеріалу. Дезінфікують лише за аналізування дерев'янистих частин рослин (покритих корковою тканиною гілок, пухлин рослин тощо), а також насіння за діагностування у них внутрішньої інфекції.

У цьому разі дезінфікують зануренням матеріалу в 96% спирт на 1–2 хв, в розчин сулеми (0,1%) впродовж 1–2 хв, або в 0,5–1% розчинмарганцевокислого калію з експозицією 5–20 хв (для насіння з товстою оболонкою експозиція може бути збільшена) з подальшим промиванням стерильною водою. Для усунення поверхневої мікробіоти зернові культури промивають водогінною водою, витримують впродовж 5 хв у 70% етанолі і 20 хв у 16,5% розчині перекису водню. Потім насіння занурюють в етанол і обпалюють (двічі).

Ретельно промиті шматочки ураженої тканини аналізують. Існує декілька методів виділення збудників, основними з яких є:

**Посів з розтертого матеріалу.** Добре промитий шматочок рослинної тканини переносять в стерильну ступку, розміщену в безпосередній близькості до полум'я пальника, і розтирають товкачиком з додаванням декількох крапель стерильної водогінної води до отримання однорідної маси. Заздалегідь обпаленою на полум'ї пальника і охолодженою петлею беруть одну краплю суспензії, що утворилася і переносять в чашку Петрі на поверхню твердого поживного середовища. Висівання здійснюють двома методами. Внесений матеріал рівномірно розтирають шпателем по всій поверхні середовища; цим самим шпателем здійснюють висівання у другій і третій чашках Петрі для отримання більшої кількості ізольованих колоній. Другий метод - краплю суспензії петлею висівають густими штрихами від одного краю чашки Петрі до другого. За ретельного заштрихування вдається отримати достатню кількість ізольованих колоній, що звільняє від засівання додаткових чашок Петрі.

**Метод накопичення.** Ретельно промитий матеріал стерильно переносять у пробірку з рідким поживним середовищем (картопляний бульйон, м'ясо-пептонний бульйон, середовище Омелянського тощо) і витримують у термостаті до появи ознак росту (зазвичай 1–3 доби). Потім попередньо обпаленою полум'ям пальника петлею беруть одну краплю помутнілого поживного середовища і переносять на поверхню твердого поживного середовища в чашку Петрі, де висівають густими штрихами або розтирають шпателем. З соковитих органів рослин (плодів, коренеплодів, цибулин, стебла тощо) з ознаками розм'якшення тканини, фламірованим і охолодженим скальпелем стерильно зрізають зовнішню тканину. На межі ураженої і здорової тканини попередньо обпаленою петлею беруть одну краплю слизу, виступаючого за натискання, і переносять в чашку Петрі на поверхню твердого поживного середовища, де його розподіляють петлею чи шпателем. Цим самим шпателем інфекційний матеріал розтирають ще у двох чашках Петрі.

Після висівання чашки Петрі в перегорнутому (дном вгору) вигляді розміщують в термостат з температурою 26–28°C. За появи бактеріальних колоній (здебільшого 3–4 доби після висівання), чашки виймають з термостата, а колонії, що вирости, досліджують, переносять в пробірки на скошене тверде поживне середовище і приступають до визначення їхніх патогенних властивостей. Виділення фітопатогенних бактерій з уражених рослин ускладнюється тим, що в них поряд зі збудниками бактеріозів знаходиться багато сторонніх мікроорганізмів. Особливо багато спорових та інших грампозитивних бактерій зустрічається за аналізування забруднених ґрунтом органів рослин. Для пригнічення росту цих мікроорганізмів в щільні поживні середовища додають різні анілінові фарби, такі, як малахітова зелень, генціан-віолет або кристал-віолет. Ці фарби пригнічують ріст спорових і грампозитивних мікроорганізмів, їх додають у середовища в концентрації 1:100 000. Кращі результати забезпечують додаванням малахітової зелені (розчиняють 1 г малахіт-ґрюна в 100 мл спирту і залишають на добу). Розчин фільтрують і до 1 л МПА додають 1 мл малахітової зелені (1:100 000); стерилізація звичайна.

Оскільки в уражених органах рослин розвивається багато спорових і грампозитивних форм бактерій, крім висівання на МПА рекомендується одночасно висівати на МПА з малахіт-ґрюном. Чашки з додаванням зеленої фарби необхідно позначати, оскільки за розвитку мікроорганізмів фарба може відновлюватися. Слід пам'ятати, що агар з малахіт-ґрюном не можна застосовувати за виділення грампозитивних фітопатогенних бактерій — збудників бактеріального раку томатів, кільцевої гнилі картоплі, в'янення люцерни, фасціації суниці тощо.

У цьому разі елективність середовища досягається додаванням солей таурохолевої кислоти, яка пригнічує ріст грампозитивних бактерій. Для виділення грампозитивних збудників бактеріозів до живильних середовищ додають біхромат калію, який пригнічує ріст грамнегативних бактерій.

**Виділення бактерій з насіння.** Аналізування насіння на ураженість бактеріями розпочинають з зовнішнього огляду і визначають наявність характерних симптомів бактеріозів. За зовнішнім виглядом в ураженого насіння відзначають ознаки, за якими воно відрізняється від здорового насіння - плюсклість, недорозвиненість, потускніння шкірки, плями і язви різноманітного кольору на поверхні. За огляду сухого насіння за допомогою лупи всі ці зміни легко виявити. Так, наприклад, за бактеріозу квасолі на насінні утворюються жовто-бурі або жовті розпливчасті плями; за ураження насіння пшениці збудником базального бактеріозу спостерігають почорніння прилеглої до зародку частини зерна тощо. Проте цей метод обмежено застосовують, оскільки здебільшого лише за симптомами встановити збудника бактеріозу неможливо.

**Метод промивання насіння з подальшим центрифугуванням** використаної води та її мікроскопіювання використовують для визначення поверхневого ураження насіння бактеріями з характерними морфологічними ознаками, які можуть бути основою для визначення їх приналежності до

конкретного виду. До таких бактерій належать грампозитивні роду *Staphylococcus* і спорові бактерії. Однак цей метод ще потребує бактеріологічного підтвердження.

**Метод вологої камери.** Для створення вологої камери використовують чашки Петрі, Коха або порцелянові кювети. На їхнє дно кладуть шар стерильної гігроскопічної вати, яку покривають двома шарами фільтрувального паперу. Підготовлені чашки стерилізують у сушильній шафі за 130°C впродовж 2 год або в автоклаві за 2 атм 30–40 хв. Порцелянові кювети дезінфікують спиртом. Перед розкладанням насіння вату і фільтрувальний папір зволожують стерильною водою. Розкладання насіння здійснюють дотримуючись стерильності. Металеві інструменти (ланцети, пінцети, голки), що використовують, фламінують.

Для аналізування великого насіння: квасолі, сої, гороху та ін. використовують чашки Коха, порцелянові кювети з річковим піском, попередньо просіяним крізь сито з отворами 1 мм, промитим водою, прожареним і зволженим стерильною водою. Пісок зволожують на 80 % від повної вологоємності.

Підготувавши посуд, розкладають насіння з дотриманням всіх правил стерильності, щоб на нього не потрапила стороння мікробіота з повітря та навколишніх предметів.

Чашки Петрі, Коха або порцелянові кювети з розкладеним на них насінням чисельністю не менше 100 штук, розміщують в термостат з температурою, оптимальною для проростання насіння досліджуваної культури (20-30°C). Облік результатів здійснюють згідно ДСТУ 4138–2002 для кожного виду насіння сільськогосподарських культур. Водночас спостерігають прояв бактеріального ураження насіння і ростків. Згідно ДСТУ ураження насіння хворобами визначають після установленого строку їхнього проростання, з урахуванням кількості насінин уражених окремими видами хвороб і загальну кількість ураженого насіння в кожному повторенні. За результатами аналізування обраховують середній відсоток всіх повторень.

Починаючи з другого-третього дня, систематично ведуть спостереження за проявом ознак бактеріального ураження насіння і проростків. Водночас звертають увагу на появу крапель помутнілої рідини (ексудату) різноманітного забарвлення, а також на загнивання, ослизнення і непроросле насіння, що може бути спричинене сильним ураженням його бактеріями.

Іноді на поверхні насіння відсутні зовнішні ознаки прояву бактеріозу, але внаслідок наявності внутрішньої інфекції з нього виростають проростки з плямами або виразками на колеоптилях, ростках чи сім'ядолях, ознаками мокрої гнилі на стеблі і корінцях тощо. Все це враховують за фітопатологічної експертизи насіння.

Наявність ексудату на насінні не завжди буває наслідком ураження його збудниками бактеріозів. Тому, для підтвердження бактеріальної природи ураження, крапельки слизу, що виступили на насінні висівають на

тверде поживне середовище в чашки Петрі. Колонії, що вирости, аналізують, висівають в пробірки, і надалі досліджують з метою їхнього ідентифікування.

**Пророщування насіння в пробірках.** Для цього не менше 100 насінин висівають у простерилізовані пробірки або ванночки зі зволженим піском. Добре промитий зволжений пісок насипають в широкі пробірки на 1/4 їх висоти, закривають ватними пробками і стерилізують в автоклаві за 2 атм 40 хв. У кожен пробірку розміщують одну насінину. Потім пробірки з насінням ставлять у термостат зі спеціальним світловим і температурним режимом і три рази впродовж двох-трьох тижнів (залежно від виду рослини) підраховують проростки, у яких на сім'ядолях виявлено ознаки хвороби. Наприкінці досліду визначають загальний відсоток ураженості кожної партії насіння. Враховуючи трудомісткість методу висівання у пробірки, насіння можна висівати у кювети або ванночки. Для виявлення внутрішнього ураження насіння його попередньо поверхнево дезінфікують.

У спеціалізованих лабораторіях для визначення ураженості насіння збудниками бактеріозів застосовують люмінесцентний, серологічний та ін. методи, що вимагають наявності необхідного обладнання або спеціальних імунних сироваток.

**Бактеріологічний аналіз.** За визначення ураженості насіння найраціональнішим є бактеріологічний аналіз з використанням методу висівання з розтертого матеріалу. Після ретельного промивання стерильною водою насіння або його шматочки (у разі аналізування великого насіння) розтирають у стерильній ступці з невеликою кількістю стерильної води і отриману суспензію висівають на тверде поживне середовище в чашки Петрі, розміщують у термостат за температури 28°C на 4–5 діб. Потім чашки виймають із термостата, лупою оглядають колонії, які вирости, описують їхню морфологію та відсівають для подальших досліджень.

**Виділення епіфітних бактерій.** Ізолювання епіфітних бактерій здійснюють за описаними методами. Для аналізування епіфітної мікрофлори рослин пшениці експериментально встановили оптимальні параметри. Для виявлення епіфітної колонізації рослин бактеріями необхідно здійснити змивання їх з поверхні зовні здорових рослин. Для аналізування епіфітної мікробіоти рослин пшениці беруть 5 г рослинного матеріалу, додають 200 мл стерильної водогінної води і струшують качалкою (240 об/хв) 20 хв. Висівають 0,1 мл нерозведеної суспензії змиву і серію десятикратних розведень на картопляний агар (КА) в чашки Петрі. Після 3–4 діб інкубування в термостаті (28°C) аналізують і відсівають колонії бактерій для подальшого дослідження їхніх властивостей.

Для виявлення епіфітної колонізації фітопатогенних бактерій на різних фазах росту рослин зрізують 2–3 листки, занурюють в 10 мл стерильної водогінної води і ставлять на качалку за 240 об/хв на дві години. Отриману суспензію змиву по 0,1 мл з різних розведень висівають в чашки Петрі з КА. Після 4 діб інкубування в термостаті (28°C) аналізують і відсівають колонії для подальшого дослідження їх властивостей.

**Виділення ендофітних бактерій.** Ізолювання бактерій із внутрішніх тканин ззовні здорових рослин передбачає поверхневу стерилізацію рослинного органу, з якого планують виділення ендофітів. Для стерилізування рослинного матеріалу використовують різноманітні речовини або їхні композиції. Для кожного виду рослин або відокремленого їх органу (корені, стебла, листки чи насіння) необхідно добирати дезінфікуючі речовини, оптимальні для конкретного зразку, які б забезпечували усунення поверхневих мікроорганізмів.

Спочатку промивають насіння водогінною водою – 15 хв, потім стерильною водогінною водою – 1 хв. Промите насіння впродовж 5 хв витримують в 70% етанолі та 20 хв у 16,5 % перексиді водню. Потім насіння двічі змочують в етанолі і фламінують. Продезінфіковане насіння (після перевірки поверхневої стерильності розкладанням зерна пшениці на КА) розтирають асептично в ступці з наступним висіванням розтертої маси на КА в чашки Петрі. Відбирають бактерії, які вирости після 4–5 діб культивування в термостаті (26–28°C) для подальших досліджень. Особливу увагу звертають колонії бактерій з більшою частотою трапляння. Поверхнево простерилізоване насіння також пророщують у стерильних умовах вологої камери в чашках Петрі та відсівають екsudати, які утворюються на коренях чи проростках пшениці.

## Лабораторне заняття №6

### ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ

---

**Мета роботи:** Ознайомитися з методикою штучного зараження рослин фітопатогенними бактеріями, визначення патогенних властивостей бактерій.

---

За декілька днів після висівання гомогенізованої маси рослин на щільні поживні середовища в чашки Петрі, утворюються видимі неозброєним оком колонії бактерій. Зовнішній вигляд колоній має значення для визначення виду фітопатогенних бактерій. Колонії, подібні до колоній фітопатогенних бактерій за зовнішніми ознаками, відзначають кружком маркера або воскового олівця (по дні чашки), нумерують близько обведені круги і відповідні цифри на пробірках з агаризованим поживним середовищем та приступають до відсівання культури.

Для посіву в пробірку обирають однорідну за зовнішнім виглядом колонію, розташовану ізолювано стосовно інших. Пробірку з косим агаром затискають середнім пальцем лівої руки (скошена сторона агару має бути звернена вгору), обпалюють мікробіологічну петлю полум'ям, відкривають чашку Петрі, беруть петлею матеріал з колонії і закривають кришку чашки. Потім відкривають пробірку з середовищем, затискаючи ватну пробку долонею і мізинцем правої руки, обпалюють край пробірки, вводять петлю в



пробірку і здійснюють висівання штрихом, проводячи петлею зигзагоподібну лінію по поверхні скошеного агаризованого середовища. Далі обпалюють край пробірки і закривають, не виймаючи з полум'я, пробкою. Потім прожарюють мікробіологічну петлю. Пробірки розміщують у термостат.

За виконання бактеріологічних робіт (посів, виділення, пересівання) слідкують за тим, щоб не було руху повітря в приміщенні. Вікна і двері мають бути зачинені, ходіння припинено. Зручніше всі бактеріологічні заходи виконувати в спеціальному лабораторному боксі.

Якщо ізольовані культури виростуть на твердому поживному середовищі в пробірках, приступають до визначення їхніх патогенних властивостей щодо рослин.

### **Штучне зараження рослин фітопатогенними бактеріями**

Встановлення патогенних властивостей виділених бактерій потребує особливої уваги, оскільки морфолого-культуральні властивості значної кількості фітопатогенних бактерій інколи повністю співпадають з властивостями сапрофітів і розрізнити їх лише за цими ознаками неможливо. Тому спочатку потрібно довести, що бактерії патогенні, а вже потім приступати до детального вивчення їхніх культуральних, фізіологічних і біохімічних властивостей, необхідних для визначення видової приналежності.

В своїй роботі необхідно дотримуватись загальновідомої тріади Коха, тобто трьох положень, на основі яких, будь-яке інфекційне захворювання можна пов'язати з певною хворобою:

- 1) мікроорганізм виявляють за кожного прояву хвороби, за відповідних патологічних змін і симптомів ураження рослин;
- 2) мікроорганізм не виділяють при інших хворобах як випадковий або не патогенний паразит, ні зі здорових рослин;
- 3) після ізолювання з ураженої рослини чистої культури, патогенний мікроорганізм має спричинювати аналогічне захворювання у рослини-живителя.

Патогенні властивості ізольованих бактерій встановлюють штучним зараженням певного виду рослин, з якого дану бактерію було виділено. Для інокулювання, за можливості, обирають молоді рослини, до яких прикріплюють етикетки, написані простим олівцем, зазначивши номер ізоляту бактерій і дату інокулювання.

Для штучного зараження використовують свіжозібрані (одно-дводобові) культури бактерій, вирощені на твердому поживному середовищі, з яких готують суспензії. Використовують бактеріальну суспензію щільністю за стандартом помутніння 500 млн. або 1 млрд. КУО в 1 мл стерильної водогінної води. Маленькі краплини суспензії наносять на нижню поверхню листової пластинки або інші частини рослин стерильною пастерівською піпеткою, потім крізь краплю роблять легкі уколи тонкою стерильною голкою, оскільки більшість фітопатогенних бактерій проникають в рослини через поранення. К.Г. Бельтюкова із співавторами рекомендує робити легкий укол трьома голочками, скріпленими на стержні у вигляді правильного

трикутника, що дає можливість уніфікувати проведення штучного зараження і порівнювати отримані результати. У разі інокулювання рослин з тонкими листочками, уколи мають бути особливо легкими, щоб не допустити наскрізного проколу листових пластинок. Для цього краще використовувати тонкі ентомологічні булавки, попередньо простерилізовані. Для з'ясування можливості збудника уражати судинну систему і викликати в'янення рослин краплю бактеріальної суспензії наносять на центральну жилку листової пластинки, черешок листка або стебло, а потім роблять укол через нанесену краплю. На товстих стеблах краще робити надрізи лезом бритви. Місця ураження обмотують вологою стерильною ватою з метою запобігання висихання культури.

Інокулювати соковиті стебла, плоди, цибулини, бульби, коренеплоди тощо можна за допомогою шприца, вводячи у місце ураження однакову кількість суспензії бактерій. Перед зараженням плоди ретельно промивають стерильною водою; забруднені ґрунтом бульби, цибулини, коренеплоди і інші органи рослин попередньо звільняють від ґрунтових часток, а потім промивають водогінною і стерильною водою.

Приступаючи до визначення патогенних властивостей бактерій, спочатку інокулюють стебла і листки контрольних рослин, замінюючи чисту культуру збудника стерильною водою. Контрольні рослини розміщують на деякій відстані від дослідних, щоб запобігти передачі інфекції при зіткненні з зараженими рослинами, з бризками води при поливі, дощі або за переносу бактерій комахами.

Якщо спочатку інокулюють рослину бактеріальною суспензією, то руки та інструменти ретельно дезінфікують, а потім роблять уколи в листки і стебла контрольних рослин. Руки миють у воді, протирають 96% етиловим спиртом, а голки чи ентомологічні булавки занурюють у спирт і обпалюють. Якщо для зараження використовують пастерівські піпетки, то для кожного одного ізоляту до іншого, співробітник має ретельно дезінфікувати руки й інструменти.

За встановлення патогенних властивостей виділеної культури здійснюють зараження листків різних ярусів на 5–10 рослинах. Кожним ізолятом інокулюють по декілька дослідних рослин або їх частин. Для порівняння патогенних властивостей бактерій велике значення має добір об'єктів. Вони повинні бути здоровими і знаходитися в одній і тій самій фазі росту і розвитку. Поливати потрібно спочатку контрольні, а потім дослідні рослини. Інокульовані рослини або їх відокремлені органи впродовж декількох діб-витримують за підвищеної вологості. Якщо зараження здійснюють в лабораторних умовах, то рослини розміщують під ковпак або у вологе приміщення, а плоди, цибулини, бульби тощо - в кристалізатори або ексикатори, де підтримують підвищену вологість. При зараженні відокремлених органів рослин в польових умовах їх кладуть до зволоженого пергаментного мішечка для створення вищої вологості. Температуру слід підтримувати на рівні, що сприяє прояву хвороби.

Спостерігаючи за розвитком інфекції, відзначають час появи перших

ознак хвороби (плями на листках, стеблах або плодах, симптоми в'янення, початок розростання тканини тощо), характеризують особливості її розвитку і записують дату відмирання окремих органів або загибелі рослини. За остаточного визначення результатів штучного зараження, у разі судинних бактеріозів, готують поздовжні і поперечні зрізи стебел рослин, щоб стверджувати про наявність бактерій в судинах та інтенсивність розвитку патологічного процесу. З потемнілих ділянок, розташованих вище і нижче місць ураження, готують мазки або відбитки і фарбують їх за Грамом та здійснюють реізоляцію бактерій.

Здебільшого, за штучного зараження розвиток хвороби супроводжується появою характерних симптомів, що дає можливість стверджувати про патогенність культури. Якщо зовнішні ознаки прояву хвороби не характерні, то необхідно знову виділити культуру бактерій з інокульованої ураженої рослини. Бактерії виділяють з ділянок, що перебувають на деякій відстані від місць уколів.

Для визначення здатності бактерій уражати зернові культури рослини інокують бактеріальною суспензією клітин щільністю  $10^3$ – $10^9$  КУО/мл шприцом у стебло у фазі виходу в трубку, коли колосся в 3–4 міжвузлі. Результати штучного зараження обраховують після 10–14 діб за 4-х бальною шкалою, з урахуванням ступеня і характеру прояву симптомів хвороби на листках, стеблі, лусочках і остюках колоса і визначають середній бал прояву захворювання десяти інокульованих рослин. Враховують також пригнічення росту і розвитку рослин, розмір плям на листку, стеблі і деформацію колоса.

### **Шкала визначення агресивності бактерій**

Шкала обліку штучного зараження зернових культур:

1 бал – у місці інокульовання утворюється облямівка 1–2 мм бежевого або коричневого кольору. На колоскових лусочках видимих ознак ураження немає.

2 бали – на стеблі утворюється бура, білувата або бежева поздовжня пляма, яка розтікається (до 1 см довжиною). Часто на колоскових лусочках і остюках з'являються бежеві плями-штрихи, іноді остюки повністю білуваті.

3 бали – на стеблі розвивається бура, білувата або бежева поздовжня пляма завдовжки понад 1,5 см. На листі утворюються поодинокі коричневі плями-смуги. На колоскових лусочках - дрібні коричневі плями-смуги. Іноді розвивається деформований колос.

4 бали – розвиваються поздовжні коричневі чи бурі плями на стеблі у місці інокульовання, які сягають декількох сантиметрів і більше. На листках утворюються білуваті водянисті, бурі або бежеві плями, які згодом зливаються в одну. Колос деформується, багато квіток стерильні, на колоскових лусочках з'являються бурі і коричневі плями. Іноді рослини не виколошуються, відстають у рості. Якщо колос розвивається, то в ньому утворюється плюскле, недорозвинене зерно з темним кінчиком.

Облік штучного зараження бур'янів здійснюють за розробленою 6-бальною шкалою через 7–14 днів. Ступінь ураження рослин (від нуля до п'яти балів) оцінюють за розмірами некрозів, що утворилися.

- 0 – відсутність ознак ураження;  
 1 – облямівка навколо місця уколу;  
 2 – розвиток плям невеликого розміру (5 мм);  
 3 – ураження 1/2 частини листка чи міжвузля;  
 4 – ураження 2/3 частини листка, всього міжвузля, ураження зерна, стебла, та листя;  
 5 – в'янення всього листка, почорніння 2-х чи 3-х міжвузлів, сильне ураження, стебла та листя, листя скручується і всихає, зерно плюскле або взагалі не утворюється.

Повторність дослідів 5 разова. Агресивність розраховували як середнє арифметичне отриманих результатів з п'яти повторень зараження.

Визначення патогенних властивостей ізолятів, виділених із зернобобових культур вивчають штучним зараженням дорослих рослин. В стебло, листя та боби (якщо, такі наявні на даній фазі розвитку рослини) кожної рослини шприцом вводять по 0,1 мл (у трьох повтореннях) суспензію щільністю  $1 \times 10^9$  КУО/мл. На кожній рослині трьома уколами інокулюють три яруси листків у чотирьох повтореннях, а також стебла та боби. За контроль приймають слугують 5 рослин сої, які інокульовано стерильною водогінною водою. Облік штучного зараження здійснюють через 10–14 діб за 5-ти бальною шкалою.

Вірулентність оцінюють за 5-ти бальною шкалою для основних збудників сої (табл. 2-5).

Таблиця 2

**Шкала визначення вірулентних властивостей збудника**

Агресивність, бали	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycinea</i>		
	листки	стебла	боби
0	Сліди від ін'єкцій у вигляді світлих цяток	Сліди від ін'єкцій	Сліди від ін'єкцій
1	Червоно-коричневі плями	Дрібні, чорні плями	Зеленувато-коричневі плями
2	Плями темнішають, стають непрозорими, інколи з хлорозом	Видовжені плями	Чорно-коричневі мокрі плями
3	Чорні плями з хлорозом, часто з'являються пустули	Сухі, коричневі смуги	Збільшені плями, сірий ексудат
4	Пустули розтріскуються і плями зливаються у великі некротичні ділянки	Перелом стебла в місці ураження	Загнивання, чорний ексудат

Таблиця 3

**Шкала визначення вірулентних властивостей збудника смугастості стебла сої за штучного інокулювання**

Агресивність, бали	<i>Pantoea agglomerans</i>
0	Відсутність ураження або сліди від ін'єкцій
1	Коричневі або чорні продовгуваті плями чи смуги
2	Початок поширення чорних плям на стеблі 5-10 мм
3	Повздовжні чорно-коричневі некрози вздовж стебла
4	Поширення некротичних смуг та переломи

Таблиця 4

**Шкала визначення вірулентних властивостей збудника кутастої плямистості сої за штучного інокулювання**

Агресивність, бали	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>		
	листки	стебла	боби
0	Сліди від ін'єкцій у вигляді світлих цяток	Сліди від ін'єкцій	Сухі, безкольорові цятки
1	Іржаво-коричневі або чорні плями (1-3 мм) кутасті, неправильної форми, можливо з жовтим ореолом	Чорні плями на місці уколу	Чорні плями на місці уколу
2	Червоно-коричневі або чорні плями кутасті, неправильної форми, можливо з жовтим ореолом або маслянистими розводами до 6 мм	Плями подовжуються	Початок некротизації плям або розтікання
3	Червоно-коричневі або чорні плями кутасті, неправильної форми, можливо з жовтим ореолом або маслянистими розводами до 8 мм	Плями некротизуються і подовжуються	Плями до 8 мм, поява перетяжки боба, ексудат
4	Червоно-бурі, маслянисті з переходом у сухі некротичні плями, можливо дірчастість і опадання листя	Чорно-коричневі смуги 10–15мм	Чорні мокрі плями та ексудат, плями до 10-15 мм, розтріскування боба

Для вивчення патогенних властивостей збудників бактеріальних хвороб люпину розроблена 10-бальна шкала:

- 0 балів – відсутність ураження;
- 1 бал – некроз діаметром 1мм навколо уколу;
- 2 бали – некроз діаметром 2 мм навколо уколу (плями в місці трьох уколів зливаються);
- 3 бали – некроз діаметром 4 мм;
- 4 бали – некроз діаметром 6 мм;
- 5 балів – некроз, який охоплює близько 25% поверхні листка чи боба, або завдовжки до 0,7 см зі слабким проникненням у середину стебла;

6 балів – некроз, який охоплює майже 35% поверхні листка чи боба, або завдовжки 1 см з явним проникненням у середину стебла;

7 балів – некроз, який охоплює близько 50% поверхні листка чи боба, або завдовжки 1,5 см з проникненням у середину стебла;

8 балів – некроз, який охоплює майже 75% поверхні листка чи боба, або завдовжки 2 см з проникненням у середину стебла;

9 балів – вся тканина листка або боба відмирає, некротизується і перегинається середина стебла, відбувається в'янення рослини.

Таблиця 5

**Шкала визначення агресивності збудника бактеріального опіку сої за штучного інокулювання**

Агресивність, бали	<i>Pseudomonas siringae</i>		
	листки	стебла	боби
0	Сліди від ін'єкцій у вигляді світлих цяток	Сліди від ін'єкцій	Чорні плями на місці уколу з жовтою облямівкою
1	Поява хлорозного ореолу навколо бежевих плям	Коричневі плями на місці уколу	Чорні вдавлені плями на місці уколу
2	Ореол і плями збільшуються	Плями подовжуються	Початок всихання
3	Плями поступово зливаються і некротизуються	Плями некротизуються і подовжуються	Всихання та поширення плям
4	Ураження поширюється на більшу частину листка	Стебло переломлюється у місці ураження	Боби повністю всихають або скручуються

**Низькоагресивними** вважали ті штами патогена, що спричиняли захворювання, яке оцінювалось в 1–4 бали, **середньоагресивними** – від 5 до 6, **високоагресивними** – від 7 до 9. Для штучного зараження використовували водну суспензію щільністю  $1 \times 10^7$  кл/мл однодобових клітин бактерій, вирощених на картопляному агарі. Контролем була стерильна водогінна вода. Рослини інокулювали потрійним уколом тканин з нанесенням бактеріальної суспензії. Облік вірулентності штамів здійснювали на сьомий день після штучного зараження.

**Реакція надчутливості (РНЧ).** Реакція надчутливості рослин широко використовується для визначення патогенності ізолятів бактерій та виявлення закономірностей розвитку патологічного процесу. Більшість бактеріальних хвороб рослин спричинюють бактерії роду *Pseudomonas*. На поверхні рослин зустрічається багато і сапрофітних бактерій цього роду, тому ізолювання та ідентифікування фітопатогенних бактерій

ускладнюється. За морфологією колоній та деякими біохімічними властивостями патогенні і сапрофітні бактерії роду *Pseudomonas* подібні, і тому їх важко розрізнити. Для їх визначення необхідно вивчити патогенні властивості, для чого потрібна рослина-живитель відповідної фази росту. Для швидкого визначення патогенних властивостей бактерій 3. Клементом запропонована реакція надчутливості в листках тютюну. Здатність фітопатогенних бактерій спричиняти РНЧ за введення їх в неспецифічні рослини дає змогу відокремити патогенні бактерії від сапрофітних роду *Pseudomonas*. РНЧ також використовують для виявлення фітопатогенних бактерій на насінні сільськогосподарських культур, без виділення їх в чисту культуру. У добре розвинене листя рослин тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сортів Гавана або Самсун вводять бактеріальну суспензію в стерильній воді, що містить  $1 \times 10^7$  КУО в 1 мл. Інокулюють шприцом з тонкою голкою під шкірку з нижньої сторони листка в міжклітинний простір. Укол слід робити поблизу бічних жилок листка в найщільніше місце, тому старі листки для цього придатніші, ніж молоді. На одному листку можна перевірити патогенність декількох культур, вводячи кожен з них в окремі проміжки між жилками. За 1–2 доби після інокулювання патогенними культурами бактерій роду *Pseudomonas* тканина починає відмирати і стає некротизованою.

Ця реакція рослин отримала назву «реакція надчутливості». Сапрофітні бактерії таких некрозів на листках не спричиняють, навіть за інокулювання бактеріальною суспензією високої щільності (їх  $10^9$  КУО в 1 мл). Реакцію надчутливості для скринінгу фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, ізольованих з різних рослин-живителів. Якщо тестують фітопатогенні ізоляти, то на листках уже через 8–10 год після інокулювання спостерігають перші ознаки прояву реакції надчутливості.

Розроблено наступну 10-бальну шкалу для обліку РНЧ рослин за впливу досліджуваних бактерій:

- 0 – реакція надчутливості відсутня;
- 1 – слабка зміна кольору листка в місці інфільтрації;
- 2 – на світло-зеленому тлі розріджені світло-коричневі смуги;
- 3 – на зеленому тлі світло-коричневі дрібні некротичні плями, слабо окреслені;
- 4 – коричневі нечіткі штрихи;
- 5 – 25% коричневих некрозів на інфільтрованій площі;
- 6 – 50% коричневих некрозів на інфільтрованій площі;
- 7 – 75% коричневих некрозів на інфільтрованій площі;
- 8 – чітка некротична тканина на всій поверхні інфільтрованої площі листка;
- 9 – чіткі коричнево-іржаві некротичні плями, тканина тонша по всій інфільтрованій поверхні.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

---

1. Климнюк С. І., Копча В. С., Дейнека С. Є. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в таблицях і схемах в 4-х частинах: Укрмедкнига. 2021. 912 с.
2. Широбоков В. П. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. Нова книга. 2021. 920 с.
3. Морозюк С., Яковлева Л., Гвоздяк Р., Пасічник Л., Литвинчук О. [Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин. Том 1.](#) К.: Інтерсервіс. 2011. 444 с.
4. Горяїнова В. В., Станкевич С. В., Батова О. М., Жукова Л. В. Загальна фітопатологія: навч. посібник. Житомир: ПП «Рута». 2023. 326 с.
5. Ястремська Л.С., Малиновська І.М. Загальна мікробіологія і вірусологія. К. НАУ. 2017. 232 с.
6. Патица В.П., Пасічник Л. А, Гвоздяк Р. І., Петриченко В.Ф., Корнійчук О. В., Калініченко А. В., Буценко Л. М., Житкевич Н.В. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. ТОВ Віндрук, 2017. – 432 с
7. Ястремська Л.С., Малиновська І.М. Загальна мікробіологія і вірусологія. К. НАУ. 2017. 232 с.
8. Морозюк С., Гвоздяк Р., Пасічник Л., Литвинчук О., Патица В. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. Том 2. К.: Інтерсервіс. 2017. 432 с.
9. Буценко Л.М., Пирог Т.П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник К.: Видавництво Ліра-К. 2018. 346 с.