

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Пермский государственный аграрно-технологический университет  
имени академика Д.Н. Прянишникова»

З.Ю. Самойлова

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ УДОБРЕНИЙ**

*Лабораторный практикум*

Пермь  
ИИЦ «Прокрость»  
2024

УДК 579.2:581.1  
ББК 42.35:40.40  
С 958

*Рецензенты:*

*В.Ю. Ушаков*, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии растений и экологии почв ФГАОУ ВО ПГНИУ;

*М.И. Пинаева*, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры агрохимии и почвоведения ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ.

**С 958    Самойлова, З.Ю.**

Микробиологические и физиологические основы применения удобрений : лабораторный практикум / З.Ю. Самойлова; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова». – Пермь : ИПЦ «Прокрость», 2024. – 160 с. : ил. ; 21 см. – Библиогр.: с. 157-158. – 30 экз. – ISBN 978-5-94279-632-7. – Текст : непосредственный.

В лабораторном практикуме представлены лабораторные работы по разделам дисциплины «Микробиологические и физиологические основы применения удобрений», краткие теоретические сведения по изучаемым темам, методики выполнения лабораторных работ, темы эссе, вопросы для подготовки к коллоквиумам и для контроля знаний.

Лабораторный практикум предназначен для обучающихся направления подготовки 35.03.03 Агрохимия и агропочвоведение.

**УДК 579.2:581.1**  
**ББК 42.35:40.40**

Утверждено методической комиссией института фундаментальных и прикладных агроэкобиотехнологий и лесного хозяйства ФГБОУ ВО Пермский ГАТУ (протокол № 17 от «12» марта 2024 г.).

**Учебное издание**

**Самойлова Зоя Юрьевна**

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ  
И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ УДОБРЕНИЙ**

*Лабораторный практикум*

Подписано в печать 28.06.2024. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Усл. печ. л. 10,0. Тираж 30 экз. Заказ № 42

*ИПЦ «Прокрость»*

Пермского государственного аграрно-технологического университета  
имени академика Д.Н. Прянишникова  
614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 23  
тел. +7 (342) 217-95-42

**ISBN 978-5-94279-632-7**

© ИПЦ «Прокрость», 2024  
© Самойлова З.Ю., 2024

## Содержание

Введение .....	5
Требования к содержанию и оформлению лабораторных работ .....	7
<b>РАЗДЕЛ 1. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РАСТЕНИЯМИ.....</b>	<b>8</b>
Техника безопасности при работе с микроорганизмами .....	8
Стерилизация посуды и питательных сред .....	11
Выбор питательных сред для культивирования почвенных микроорганизмов .....	15
Лабораторная работа № 1. Биоразнообразие микрофлоры почвы. ....	17
Лабораторная работа № 2. Участие почвенных микроорганизмов в цикле углерода. ....	32
Вопросы для текущего контроля .....	38
Лабораторная работа № 3. Участие почвенных бактерий в цикле азота (процессах аммонификации, нитрификации). ....	39
Лабораторная работа № 4. Моделирование процесса денитрификации .....	44
в лабораторных условиях. ....	44
Лабораторная работа № 5. Изучение процесса фиксации молекулярного азота почвенными бактериями.....	47
Вопросы для текущего контроля .....	50
Лабораторная работа № 6. Изучение процессов превращения соединений фосфора почвенными бактериями.....	51
Лабораторная работа № 7. Изучение роли почвенных бактерий в превращениях железа. ....	53
Лабораторная работа № 8. Роль почвенных бактерий.....	56
в превращениях соединений серы.....	56
Вопросы для текущего контроля .....	60
Лабораторная работа № 9. Эпифитные микроорганизмы зерна. ....	60
Лабораторная работа № 10. Анализ бактериальных препаратов (биоудобрений). ....	63
Лабораторная работа №11. Изучение антагонизма в почвенных экосистемах. ....	65
Лабораторная работа № 12. Изучение процесса трансформации отходов агропромышленного комплекса микроорганизмами и их участие в биоремедиации загрязненных почв. ....	68
Вопросы для текущего контроля .....	72
<b>РАЗДЕЛ 2. АГРОХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ .....</b>	<b>73</b>
Лабораторная работа №1. Разделение фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии. ....	73
Лабораторная работа № 2. Химические свойства пигментов листа. ....	77

Лабораторная работа № 3. Зависимость площади листовой поверхности от типа почвы. ....	81
Лабораторная работа № 4. Определение чистой продуктивности фотосинтеза растений при выращивании на различных типах почв. ....	84
Лабораторная работа № 5. Образование сахара и крахмала в зеленых листьях различных сельскохозяйственных культур на свету. ....	88
Лабораторная работа № 6. Определение первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев $C_3$ - и $C_4$ -растений. ....	91
Вопросы для текущего контроля .....	93
Лабораторная работа № 7. Определение интенсивности дыхания по количеству выделения $CO_2$ . ....	94
Лабораторная работа № 8. Сравнение дыхательного коэффициента в прорастающих семенах различных культурных растений. ....	98
Лабораторная работа № 9. Изучение активности дыхательных ферментов в тканях культурных растений. ....	103
Вопросы для текущего контроля .....	107
Лабораторная работа № 10. Влияние внесения биоудобрений на объем корневой системы, общую и рабочую адсорбирующую поверхность корней. ....	108
Лабораторная работа № 11. Диагностика минерального питания (по Уршпрунгу). ....	114
Лабораторная работа № 12. Диагностика минерального питания культурных растений рефрактометрическим методом. ....	121
Лабораторная работа № 13. Физиологически кислые и щелочные соли. ....	124
Лабораторная работа № 14. Изучение антагонизма ионов калия и кальция в ходе минерального питания растений. ....	127
Лабораторная работа № 15. Тканевая диагностика азотного нитратного питания. ....	130
Лабораторная работа № 16. Тканевая диагностика фосфорного питания культурных растений. ....	134
Лабораторная работа № 17. Тканевая диагностика калийного питания растений. ....	140
Лабораторная работа № 18. Функциональная диагностика питания растений по фотосинтетической активности хлоропластов. ....	145
Лабораторная работа № 19. Моделирование потребности растений в минеральных элементах при гидропонном выращивании. ....	149
Вопросы для текущего контроля .....	153
Заключение .....	156
Библиографический список .....	157
<i>Приложение 1.</i> Показатели, концентрация и осмотическое давление растворов сахарозы. ....	159
<i>Приложение 2.</i> Визуальные признаки голодания растений по элементам питания. ....	160

## ВВЕДЕНИЕ

Почвенные экосистемы являются наиболее сложными в природе и представляют собой одни из самых богато населенных ареалов обитания на Земле. В почве обитает огромное количество разнообразных организмов, которые взаимодействуют между собой и вносят свой вклад в глобальные геобиохимические циклы [1-3].

В частности, почвенные макро - и микроорганизмы выступают в качестве главных участников круговорота питательных веществ, регулирования динамики органического вещества почвы, связывания углерода в почве и выбросов парниковых газов, изменения физической структуры и водных режимов почвы, повышения объема и эффективности поглощения растениями питательных веществ в процессе вегетации посредством взаимовыгодного симбиоза, и укрепления здоровья растений. В агроэкосистемах почвенная биота регулирует развитие вредителей и возбудителей болезней растений; осуществляет детоксикацию загрязняющих веществ в почве, а также переработку растительных остатков в гумус.

В совокупности, метаболические процессы, происходящие в микробных клетках, оказывают значительное влияние на плодородие почв, их физико-химические свойства. Внесение минеральных/органических удобрений может стимулировать или подавлять рост микроорганизмов с определенной метаболической активностью, что приводит к изменению агрохимических показателей почвы. С другой стороны, консорциумы микроорганизмов могут использоваться для создания биоудобрений, трансформации растительного сырья и отходов агропромышленного комплекса, в борьбе с болезнями и вредителями сельскохозяйственных культур. Соответственно, изучение активности почвенных микроорганизмов представляет интерес не только с фундаментальной точки

зрения, но также играет важную роль в прикладных областях науки. Особенно важными эти аспекты становятся для развития агrobiотехнологий, для которых, в частности, актуально понимание закономерностей обмена веществ почвенных микроорганизмов, а также принципы взаимодействия микробных популяций с сельскохозяйственными культурами растений.

Целью лабораторного практикума является закрепление теоретических знаний по дисциплине «Микробиологические и физиологические основы применения удобрений», а также освоение практических навыков работы с культурами микроорганизмов и растений.

Лабораторные работы описаны по единой схеме. Приводятся название темы лабораторной работы, цель, материалы и оборудование, краткая теоретическая часть, задания и методика их выполнения. В теоретической части сжато излагаются основные вопросы и сведения, необходимые для выполнения работы, наиболее важные вопросы дополняются вспомогательными иллюстрациями. В конце каждой лабораторной работы помещены вопросы для закрепления пройденного материала.

Практикум состоит из двух разделов: «Экология микроорганизмов и их взаимодействие с растениями» и «Агрохимические и физиологические основы питания растений», которые последовательно и наглядно, через практические аспекты демонстрируют обучающимся глобальную роль важнейших химических элементов в питании и поддержке биоты почвенных экосистем, а также раскрывают влияние биоты на геохимические циклы.

Содержание лабораторного практикума соответствует рабочей программе дисциплины «Микробиологические и физиологические основы применения удобрений» и отвечает требованиям подготовки по направлению 35.03.03 Агрохимия и почвоведение.

## **Требования к содержанию и оформлению лабораторных работ**

1. Лабораторные работы оформляются в тетради каждым студентом индивидуально.

2. Лабораторная тетрадь подписывается студентом до начала выполнения первой лабораторной работы.

3. Каждая лабораторная работа должна содержать следующие структурные элементы: а) наименование лабораторной работы; б) цель работы; в) перечень необходимых материалов и оборудования; г) выводы.

4. Выполненная лабораторная работа, оформленная в соответствии с данными требованиями, представляется на подпись преподавателю не позднее, чем на следующем занятии.

## **РАЗДЕЛ 1. ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РАСТЕНИЯМИ**

### **Техника безопасности при работе с микроорганизмами**

Прежде чем начинать освоение практических навыков по микробиологии, студентам следует запомнить несколько простых правил по технике безопасности при работе с микробными культурами.

Во-первых, в учебных заведениях не разрешается работать с живыми патогенными микроорганизмами. При этом, необходимо помнить, что при посеве сапрофитных микроорганизмов из окружающей среды случайно может быть внесена и патогенная микрофлора. Поэтому крайне важно научиться работать правильно и выполнять все требования по технике безопасности.

Во-вторых, работа в микробиологической лаборатории требует постоянного и неукоснительного соблюдения правил безопасности и личной гигиены.

Основные правила работы в микробиологической лаборатории:

1. Работать в чистом халате, шапочке или косынке, а при необходимости – в марлевой повязке. Перед началом работы руки следует вымыть с мылом.

2. В рабочих помещениях лаборатории запрещается курить, принимать пищу, ходить без надобности между столами и открывать форточки, чтобы не допускать циркуляцию микроорганизмов с током воздуха. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи. Портфели и сумки складывают в специально отведенном месте.

3. На рабочем месте размещают только оборудование, необходимое для выполнения конкретной работы. Обучающиеся приступают к работе только с разрешения преподавателя и всю работу проводят в строгом соответствии с изучаемой методикой.



4. При использовании спиртовок необходимо следить за их герметичностью, не вынимать фитиль из горячей спиртовки, не зажигать одну спиртовку от другой, не пользоваться спиртовкой вблизи легковоспламеняющихся жидкостей. Не оставлять без надобности горящую спиртовку, пламя гасить только колпачком.

5. Включать и пользоваться электрическими приборами можно только с разрешения преподавателя.

6. Во время работы в лаборатории на руках не должно быть колец, перстней и накладных ногтей. Длинные волосы следует убрать в короткую прическу. Болтающиеся рукава халата следует либо подвернуть, либо застегнуть манжеты.

7. Во избежание инфицирования рук работать только бактериологической петлей и пинцетом. Работать нужно сидя, причем наклонять туловище над столом не следует. Положение тела – строго перпендикулярно рабочей поверхности лабораторного стола. Все пробирки с микробными культурами должны стоять в штативах. Не кладите их на стол в горизонтальном положении. Штатив с пробирками должен стоять слева от Вас (и справа, если Вы – левша). Пробирки Вы берете левой рукой, а в правой (активной) руке – находится основной микробиологический инструмент – бактериологическая петля. Использованные инструменты и предметы необходимо прожигать над пламенем горелки или помещать в дезинфицирующий раствор.

8. Если в процессе работы инфицированный материал попал на кожу, слизистую оболочку глаз или в рот, необходимо срочно поставить в известность преподавателя и при его непосредственном участии провести необходимые меры по обеззараживанию.

9. При попадании на поверхность стола капля раствора, содержащих микроорганизмы, необходимо извлечь пинцетом ватный тампон, смочить его в 70% этиловом спирте или в 3% водном растворе хлорамина и обработать инфицированные

места. Лучше всего эту работу провести под контролем преподавателя.

10. Мазки из исследуемых микроорганизмов необходимо фиксировать над пламенем горелки или в фиксирующем растворе.

11. Отсасывание исследуемого материала необходимо производить с помощью стерильных автоматических или полуавтоматических пипеток. При использовании стеклянных мерных пипеток выходное отверстие закрывают ватным тампоном, и отсасывание проводят использованием резиновой груши.

12. Во время работы нельзя класть на стол инструменты, пипетки, ватные пробки, предметные и покровные стекла. Все должно находиться в штативе, фарфоровых стаканчиках, на столиках для предметных стекол и в других, специально отведенных местах.

13. Все засеянные пробирки и чашки помещаются в термостат или сдаются преподавателю.

14. Использованные при лабораторных исследованиях предметные стекла, пипетки, шпатели сразу же погружают на одни сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят. Отработанные чашки Петри и пробирки с посевами микроорганизмов собирают в биксы и передаются преподавателю для автоклавирования. Зараженный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению, желательно в тот же день.

15. Уборку помещений лаборатории проводить влажным способом. Перед работой необходимо включать бактерицидные лампы. Поверхность стола, где проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать путем протирания 3% раствором хлорамина или 70% этиловым спиртом.

16. Не допускается вынос инфицированного материала за пределы помещений лаборатории.

17. В конце работы необходимо привести в порядок рабочее место, вымыть руки.

### **Стерилизация посуды и питательных сред**

В лабораторной работе под стерилизацией понимают методы, применяемые для уничтожения всех форм жизни как на поверхности, так и внутри стерилизуемых объектов.

Различают *термическую* и *холодную* стерилизацию. Способы термической стерилизации: прокаливание в пламени и обжигание, сухожаровая стерилизация (горячим воздухом), стерилизация насыщенным паром под давлением (автоклавирование), дробная стерилизация (тиндализация), кипячение. Методы холодной стерилизации: стерилизация фильтрованием, газообразными средствами, ультрафиолетовыми лучами и другими видами излучений [6, 15].

Возможность и целесообразность применения того или иного способа определяется в первую очередь физико-химическими свойствами материала, подлежащего стерилизации, а иногда и целью исследования.

**Стерилизация питательных сред насыщенным паром под давлением (автоклавирование)** приводит к гибели вегетативных клеток и спор микроорганизмов. Установлено, что споры большинства микроорганизмов не выдерживают и 5-минутную экспозицию в насыщенном паре при 121 °С. Стерилизацию текучим паром под давлением осуществляют в автоклавах. Автоклав представляет собой металлический двустенный резервуар, способный выдерживать высокое давление, в который помещают стерилизуемый материал на специальную подставку. Предметы следует размещать не слишком плотно, так как пар должен проходить между ними, иначе они не нагреваются до нужной температуры и могут остаться нестерильными. По окончании времени стерилизации автоклав открывают, когда давление в нем сравняется с атмосферным. Преждевременное открывание крана автоклава не-

допустимо, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала. К работе с автоклавом допускаются только подготовленные лица!

**Подготовка сред к стерилизации.** При автоклавировании 3-5% жидкости теряются в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию. Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками с бумажными колпачками. Стеклянные, резиновые, корковые и другие пробки завертывают в двойной слой оберточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой.

**Выбор режима автоклавирования.** В микробиологической практике стерилизацию в автоклавах осуществляют при температуре в пределах 111-138°C, т.е. от 0,5 до 2,5 атм. Температура ниже 111°C не может считаться надежной; а выше 138°C, как правило, не является необходимой, к тому же, чем выше давление пара, тем сложнее условия эксплуатации автоклава. Микробиологи чаще всего стерилизуют среды при 0,5 и 1 атм. Температура и длительность автоклавирования питательных сред определяются, прежде всего, их составом, термоустойчивостью или термолабильностью компонентов. Такие легко разрушающиеся субстраты, как молоко или желатиновые среды, а также субстраты, содержащие сахара, витамины (пивное сусло, соки, дрожжевой автолизат и др.) обычно стерилизуют при 0,5 атм в течение 15-30 мин. Мясопептонные среды можно стерилизовать при 1,0 атм 20 мин.

С трудом поддаются стерилизации в автоклаве различные порошки (например, тальк) и вязкие жидкости (глицерин, вазелиновое масло), поэтому их лучше стерилизовать в сушильных шкафах при 160°C в течение 2 или 1 ч при 170°C. В этом случае слой масла или порошка в сосуде не должен превышать 1,5 см. После автоклавирования среды для проверки стерильности выдерживают 2-3 суток в термостате при 30°C. Если в средах обнаруживается рост микроорганизмов, их готовят заново.

Для сред, портящихся под действием температур выше 100°C, применяют **дробную стерилизацию (тиндализацию)**, которую осуществляют текучим паром в автоклаве с незавинченной крышкой или в аппарате Коха. Среды прогревают несколько раз по 10-15 мин. Между прогреваниями среды ставят в термостат при температуре 30°C на 8-12 ч для прорастания жизнеспособных спор. Среды, не выдерживающие нагревания при 100°C, прогревают более осторожно при 60-80°C через каждые 8-12 ч 4-5 дней подряд.

Однократный прогрев материала при температуре ниже 100°C известен под названием **пастеризация**. Этот метод предназначен для уничтожения только бесспорных форм микроорганизмов. Следовательно, в подавляющем большинстве случаев он не обеспечивает стерильности. Пастеризацию проводят при 60-80°C 10-30 мин. Этот процесс используют в пищевой промышленности для обработки молока, фруктовых соков, вина, пива и др. **Фильтрованием** стерилизуют синтетические среды строго определенного состава, которые содержат легкоразрушающиеся или летучие компоненты – витамины, аминокислоты (цистеин и цистин), белки, углеводы, антибиотики и др. Фильтрование жидкостей осуществляют через мелкопористые материалы, легко адсорбирующие клетки микроорганизмов: асбест, целлюлозу, фарфор, каолин и др. Стерилизующими фильтрами теоретически считают такие, размер пор которых не превышает 0,20 мкм.

Основным способом **стерилизации стеклянной посуды** является обработка ее сухим горячим воздухом при температуре не выше 180°C в течение 1-3 ч. При этом погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Стерилизацию осуществляют в специальных суховоздушных (сухожаровых) стерилизаторах и сушильных шкафах, приспособленных для стерилизации и обеспечивающих автоматическое поддержание необходимой температуры.

Посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и завернута в бумагу для сохранения стерильности после прогрева. После этого ее загружают в стерилизатор (или в сушильный шкаф) не слишком плотно, чтобы обеспечить циркуляцию воздуха и равномерный надежный прогрев стерилизуемого материала. По окончании стерилизации шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не упадет до 80°C, так как при резком охлаждении иногда нарушается стерильность материала, а сильно нагретое стекло может растрескаться.

**Стерилизация инструментов и приборов.** Мелкие металлические инструменты – петли, иглы, пинцеты, ножницы, шпатели – стерилизуют прокаливанием в пламени (т.е. нагреванием докрасна) непосредственно перед использованием. На пламени кратковременно обжигают предметные и покровные стекла, стеклянные шпатели и палочки, фарфоровые ступки и пестики, горлышки колб, пробирок, бутылок, а также ватные пробки при посевах культур и разливе сред. В пламени погибают и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов.

Для **стерилизации помещений, оборудования, некоторых медицинских принадлежностей, пищевых продуктов** используют ультрафиолетовое облучение. Мощность ультрафиолета измеряется в бактах. Доза УФ-излучения, губительная для различных видов микроорганизмов (кроме спор), составляет 5 мкб/см<sup>2</sup>.

## **Выбор питательных сред для культивирования почвенных микроорганизмов**

Почвенные микроорганизмы отличаются разнообразной метаболической активностью, поэтому для выявления разных групп микроорганизмов используют питательные среды различного состава [15, 20].

*Микроорганизмы, использующие органические формы азота*, выявляются на мясопептонном агаре (МПА): 2% агара, 3% пептона.

Для учета *спорообразующих бактерий* (по Мишустину) рекомендуют применять смешанный агар МПА + сусло в соотношении 1:1 (рН 7,0, 2% агара). Сусло и МПА стерилизуются отдельно, смешиваются непосредственно перед посевом.

*Микроорганизмы, в том числе актиномицеты, способные использовать минеральные формы азота*, чаще выявляют на крахмально-казеиновом агаре (КАА), содержащем (г/л дистиллированной воды): крахмал (растворимый) – 10,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{CaCO}_3$  – 3,0; агар – 20,0. Крахмал приливают к среде, предварительно растворив его в небольшом количестве воды. Также можно использовать и среду Чапека (г/л дистиллированной воды): сахароза или глюкоза – 20,0;  $\text{NaNO}_3$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{CaCO}_3$  – 3,0; агар – 20,0.

При изучении *актиномицетов* используют среды с добавлением глюкозы. Например, такого состава (г/л дистиллированной воды): глюкоза – 14;  $\text{CaCO}_3$  – 0,7;  $\text{KNO}_3$  – 0,7;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,35;  $\text{NaCl}$  – 0,35;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,35;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – следы; агар – 20,0.

*Аммонифицирующие бактерии* культивируют на средах, содержащих 3% пептона.

Жидкие среды для наблюдения за *первой фазой нитрификации* имеют следующий состав (%):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{NaCl}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,04;  $\text{CaCO}_3$  или  $\text{MgCO}_3$  – 0,5.

*Вторую фазу нитрификации* наблюдают на среде (%):  $\text{NaNO}_2$  – 0,1;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (безводный) – 0,1;  $\text{NaCl}$  – 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,04.

*Денитрифицирующие бактерии* растут на среде Гильята упрощенного состава (г/л дистиллированной воды): сегнетова соль (натриевокалиевая соль винной кислоты) или цитрат натрия – 20;  $\text{KNO}_3$  – 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – следы.

Наблюдать за ростом *бактерий, мобилизирующих фосфор из органических соединений*, можно на среде Менкиной: мясопептонный бульон – 1000 мл; нуклеиновая кислота или лецитин – 5 г;  $\text{CaCO}_3$  – 20,0 г; агар – 30,0 г.

*Фотосинтезирующие серобактерии* культивируют на среде Ван-Ниля (%):  $\text{NaHCO}_3$  – 0,5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,1;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{NaCl}$  – 0,5.

*Сульфатредукторов* выращивают на среде Ван-Дельдена (г/л): натрий молочнокислый (можно заменить виннокислым, яблочнокислым или янтарнокислым натрием) – 5,0; аспарагин – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5. К среде добавляют 0,1-0,5 г лимоннокислого железа.

Накопительные культуры *углеводородокисляющих бактерий* получают на среде следующего состава (%):  $\text{KNO}_3$  – 0,4;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,06;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0,14;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,08; водопроводная вода, pH 7,2-7,3. В качестве источника углерода добавляют керосин или вазелиновое масло.



## Лабораторная работа № 1

### Биоразнообразие микрофлоры почвы

**Цель работы:** ознакомление с оборудованием рабочего места в лаборатории, методами качественного и количественного определения состава микрофлоры почвы; получение чистых и накопительных культур, освоение метода предельных (лимитирующих) разведений, а также методов приготовления микробиологических препаратов и их микроскопирования.

#### **Задачи:**

1. Ознакомиться с оборудованием рабочего места и техникой безопасности при работе с микроорганизмами.
2. Ознакомиться с методами стерилизации микробиологической посуды и питательных сред.
3. Изучить разнообразие микрофлоры образца почвы путем приготовления лимитирующих разведений и высева их на твердые питательные среды.
4. Освоить методы приготовления микробиологических препаратов и приемы микроскопирования.

**Оборудование и реактивы:** инструкция по технике безопасности при работе с культурами микроорганизмов, журнал по технике безопасности, чашки Петри, твердая агаризованная питательная среда, физиологический раствор, пробирки, спички, спиртовка, шпатель Дригальского, пипетка Пастера, пипетка стеклянная градуированная, иммерсионное масло, микроскоп, микробиологическая петля с петледержателем, предметные стекла, покровные стекла, полоски фильтровальной бумаги, реактивы для окраски микробиологических препаратов.

**Задание 1. Ознакомление с оборудованием рабочего места в микробиологической лаборатории.**

В микробиологической лаборатории используются следующие виды оборудования.

**Микроскоп.** Для изучения морфологии микроорганизмов используют микроскопы. Биологический микроскоп (рис. 1) представляет собой оптический прибор, увеличивающий предметы в 1000-15000 раз и состоящий из механической, оптической и осветительной систем [16].

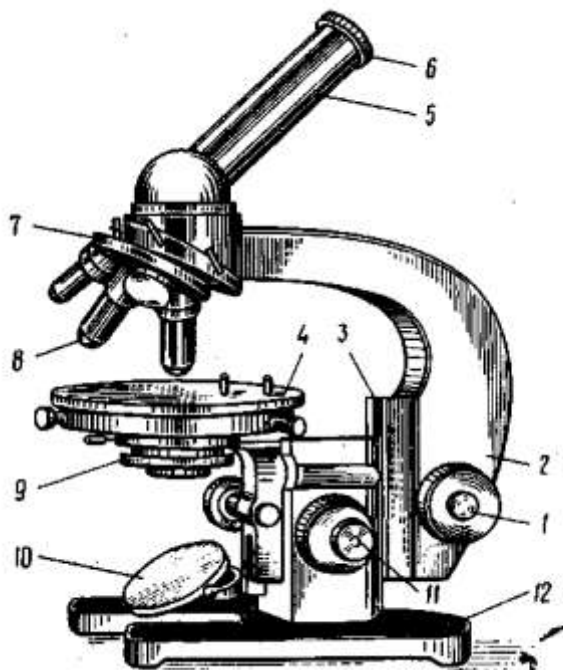


Рис.1. Устройство светового микроскопа: 1 – макровинт, 2 – тубусодержатель, 3 – шарнирное соединение, 4 – предметный столик, 5 – тубус, 6 – окуляр, 7 – револьвер, 8 – объективы, 9 – конденсор, 10 – зеркало, 11 – микровинт, 12 – основание.

Механическая система микроскопа – это подковообразная ножка, тубусодержатель, тубус, предметный столик, винты. Оптическая система включает объективы и окуляр. Осветительная система состоит из конденсора с диафрагмой и зеркала.

Тубусодержатель и подковообразное основание соединены между собой подвижно шарниром. Тубус – зрительная труба микроскопа. В верхнюю часть тубуса вставлен окуляр, в нижнюю – вращающийся вокруг своей оси револьвер, в который ввинчены объективы. Тубус передвигается вверх и вниз при помощи макрометрического и микрометрического винтов. Один оборот микрометрического винта передвигает

тубус на 0,1 мм. Поэтому микровинтом пользуются для более точной наводки, а для предварительной – макровинтом.

Предметный столик предназначен для размещения исследуемого материала. Столик можно передвигать в различных направлениях с помощью винтов.

Конденсор состоит из линз, собирающих отраженные от зеркала лучи в сильный световой пучок, и направляет его через отверстие предметного столика на препарат. При определении подвижности неокрашенных препаратов конденсор должен быть несколько опущен. Диафрагма находится между зеркалом и конденсором и служит для регулирования количества света, поступающего в конденсор. 10

Объектив состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя линза служит для увеличения предмета, остальные – для коррекции изображения. Современные биологические микроскопы имеют не менее трех объективов. Сухие объективы увеличивают в 8 и 40 раз (между объективами и препаратом находится слой воздуха), иммерсионные – в 90 раз. На оправу каждого объектива нанесена цифра, указывающая увеличение. При микроскопии окрашенных препаратов пользуются иммерсионным объективом, погружая переднюю линзу в каплю иммерсионного масла, нанесенного на предметное стекло с окрашенными бактериями. Благодаря этому все лучи от осветителя, не изменяя своего направления, попадают в объектив, и получается четкое изображение. Окуляр состоит из верхней (глазной) и нижней собирающей линз. На верхней части окуляра имеется цифра, указывающая увеличение (7х, 10х, 15х). Окуляр увеличивает только изображение. Общее увеличение микроскопа складывается из произведения увеличения объектива на увеличение окуляра.

Рабочий стол для микроскопирования препаратов желательно размещать у окна. Микроскоп устанавливают на ра-

бочий стол тубусодержателем к себе примерно на 7-10 см от края. Вначале проводят настройку освещения, для чего зеркалом направляют пучок света от источника освещения в объектив с увеличением в 8 раз. При правильной настройке освещения поле зрения микроскопа должно быть в виде равномерно освещенного круга. После этого на предметный столик помещают исследуемый препарат, который закрепляют клеммами и рассматривают под микроскопом, пользуясь объективами с увеличением в 8, 40 или 90 раз. При работе с объективами 8x и 40x тубус микроскопа осторожно опускают с помощью макрометрического винта, приближают объектив почти приподнимая тубус тем же винтом до получения изображения. С помощью микрометрического винта проводят точную установку объектива до получения четкого изображения предмета. При работе с иммерсионным объективом (увеличение в 90 раз) на препарат предварительно наносят каплю иммерсионного масла, а затем под контролем глаза макрометрическим винтом опускают объектив в каплю масла. Точную установку препарата в фокус объектива проводят с помощью микрометрического винта, который вращают в обратном направлении до получения четкого изображения. При нанесении капли иммерсионного масла не происходит рассеивания луча света, а значит хорошо освещается поле зрения (рис. 2).

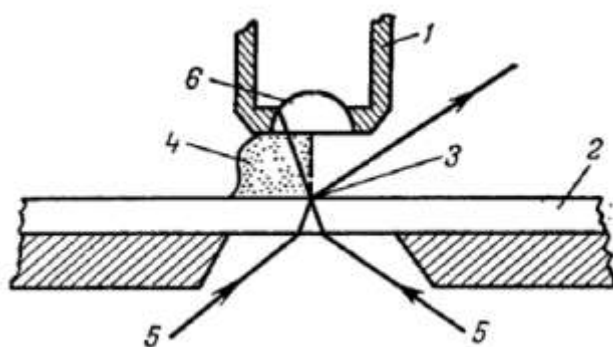


Рис. 2. Схема лучей в иммерсионной системе:

1 – объектив микроскопа, 2 – предметное стекло, 3 – объект исследования, 4 – иммерсионное масло, 5 – лучи света, 6 – фронтальная линза объектива.

По окончании работы исследуемый материал снимают с предметного столика. Мягкой тканью, смоченной в очищенном бензине или эфире, удаляют иммерсионное масло с объектива, на предметный столик помещают квадрат из фланели, опускают конденсор и убирают микроскоп в место, предохраняющее его от пыли и сырости.

Принцип действия **люминесцентного микроскопа** основан на способности отдельных объектов и красителей светиться при освещении их ультрафиолетовыми лучами. Люминесцентные микроскопы снабжены источником ультрафиолетового света и набором светофильтров. У бактерий очень слабо выражена собственная флюоресценция. Поэтому необходимо их обработать флюоресцирующими красками (флюорохромами), которые окрашивают структурные элементы клетки в различные цвета. Принцип действия электронного микроскопа основан на использовании вместо световых лучей потока электронов, получаемых из электронной пушки. Все оптические линзы заменены электромагнитными катушками, создающими электромагнитное поле, которое управляет движением электронов.

**Электронный микроскоп** увеличивает предмет в 50-200 тыс. раз. Препараты для исследования готовят на тонких пленках коллодия. На пути потока электронов ставят исследуемый объект, который отражается на люминесцирующем экране. Изображение объекта можно сфотографировать аппаратом, смонтированным в микроскоп. С помощью электронной микроскопии можно детально изучать строение бактерий, вирусов, бактериофагов.

**Предметные стекла.** Служат для приготовления микробиологических препаратов. Предметные стекла имеют размеры 26×76 мм. Толщина стекла 1 мм. Существуют модификации предметных стекол (рис. 3).



Рис. 3. Предметные стекла различного назначения:

- стекло предметное с заточенным краем для растяжки мазков;
- стекло предметное с лункой для микроскопии препаратов «висячая капля»;
- стекло предметное с полосой для записи

**Покровные стекла.** Покровное стекло предназначено для защиты объектива микроскопа, а в случае получения препарата «висячая капля» на него наносится исследуемая культура микроорганизмов. Толщина стекла 0,2 мм. Размеры покровных стекол 18×18, 24×24, 24×48 мм (рис. 4, В).

**Микробиологическая петля** состоит из петледержателя и собственно петли, изготовленной из нихромовой нити различного диаметра (рис. 4, Д).

**Чашка Петри** (изобретена в 1877 г. немецким бактериологом Юлиусом Рихардом Петри, ассистентом Роберта Коха) обычно изготавливается из прозрачного стекла или пластмассы (прозрачный полистирол) и может иметь самые различные размеры. Наиболее часто используемые варианты имеют диаметр порядка 50-100 мм и высоту около 15 мм. Чашка широко используется в микробиологии для культивирования колоний микроорганизмов. Для этой цели она запол-

няется слоем питательной среды, на который производят посев культуры микроорганизмов. Стекло Petri – многоразовое, но требует стерилизации перед повторным посевом. Чашки из пластиковых материалов поставляются стерильными, в герметичной упаковке (рис. 4, А).



Рис. 4. Микробиологическая посуда: А – чашка Петри, Б – стекло предметное, В – стекло покровное, Г – игла микробиологическая, Д – петля микробиологическая, Е – шпатель Дригальского

**Шпатель Дригальского** предназначен для засеивания материала на плотные питательные среды. Выпускаются шпатели L- и T-формы. Гладкая поверхность рабочей части шпателя позволяет избегать повреждения агара (рис. 4, Е).

**Задание 2. Определение качественного и количественного состава микрофлоры почвы методом лимитирующих разведений.**

*Ход работы:*

1. На технических весах берут навеску почвенного образца – 1 г. В боксе помещают навеску почвы в стерильную фарфоровую чашку.

2. Из колбы со стерильной водой отбирают 0,4 – 0,8 мл и увлажняют ею навеску почвы до пастообразного состояния стерильным пестиком.

3. Стерильной водой из первой колбы переносят почвенную массу в пустую колбу, используя весь объем воды. Колбу встряхивают в течение 5 минут и дают около 30 секунд отстояться. Исходная навеска разведена, таким образом, в 100 раз. Полученную почвенную вытяжку сразу же используют для разведений

4. Разведения готовят согласно рис. 5.

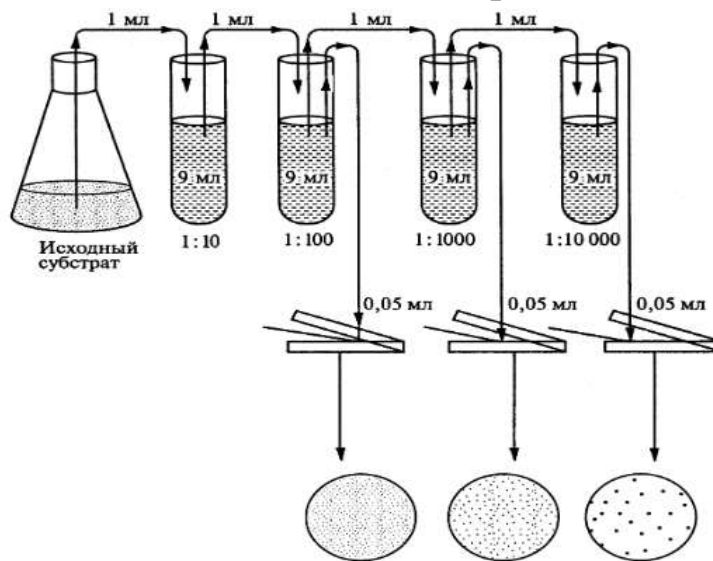


Рис. 5. Алгоритм приготовления разведений

5. Расплавленный МПА с добавлением глюкозы стерильно разливается в чашки Петри. Из трех последних разведений в чашки стерильной пипеткой помещают аликвоту анализируемого раствора. С помощью шпателя равномерно распределяют (аккуратно «втирают») раствор по застывшему агару.

6. Чашки переворачивают, подписывают, помещают в термостат с указанием темы и даты.

### **Задание 3. Количественный учет микроорганизмов почвенной экосистемы.**

*Ход работы:*

1. Подсчитать общее количество колоний микроорганизмов в каждой засеянной чашке;

2. Вычислить общее число колониеобразующих единиц (КОЕ) в исходном образце 1 г почвы:



$$A = B \times V \times C,$$

где А – КОЕ/г почвы;

В – среднее количество колоний на чашке;

В – разведение почвенной суспензии, из которого произведен посев;

С – количество капель в 1 мл суспензии (количество капель в пипетке на 1 мл, с помощью которой проводили посев).

3. Результаты вычислений оформляются в виде таблицы 1.

4. Выросшие на чашках колонии следует охарактеризовать по внешним признакам. Результаты записать в тетради.

Таблица 1

Определение КОЕ в исходном образце почвы

Номер разведения				
Количество колоний				
Число КОЕ в исходном образце почвы (среднее из нескольких разведений)				

В ходе анализа колоний нужно обратить внимание на следующие характеристики некоторых почвенных микроорганизмов [16, 20]:

*Pseudomonas fluorescens* – колонии круглой и неправильной формы, средние, крупные, выпуклые и плоские, слизистые, пастообразные, просвечивающиеся, пигментированные (сине-зеленое или желто-зеленое свечение колоний с элементами окрашивания среды). Клетки – прямые или слабо изогнутые, часто с заостренными концами, располагаются одиночно, парами или короткими цепочками, подвижны.

*Micrococcus* – колонии мелкие и средние, матовые, влажные, блестящие (маслянистые), плоские или выпуклые, гладкие, зернистые, мелкокладчатые, радиально исчерченные, пастообразной консистенции, иногда слизистые, белоснежные, серые, буроватые, розовые, красные. Кокки, одиночные, парные, неподвижные.

*Sarcina* – выпуклые, плоские, образуют пакеты правильной формы, гладкие, зернистые, бугристые или складчатые, матовые, влажные, жирноблестящие, пастообразной консистенции или слизистые, желтые, лимонно-желтые, иногда розовые и красные, кокки, неподвижные.

*Bacillus* – плоские, мелкобугристые, слегка вогнутые, матовые колонии. Край волнистый. Клетки крупные палочковидной формы, подвижны, обладают жгутиками.

*Actinomyces* – актиномицеты – ветвящиеся бактерии, лучистые грибки. Прокариоты, играют большую роль в почвообразовании, в оздоровлении почв, трансформируют и разрушают сложные органические соединения (целлюлозу, гумус, хитин, лигнин, образуют антибиотические продукты), имеют хорошо развитый мицелий, нити не септированы. На плотных агаризованных средах образуют плотные кожистые колонии различной структуры: гладкие, бугристые, складчатые, бородавчатые, плоские, пленчато-морщинистые. Колонии срастаются с субстратом при помощи субстратного мицелия – нитей, отходящих от нижней поверхности колонии и развивающихся в толще среды. На поверхности колоний вырастает воздушный мицелий, на концах которого образуются спораносцы со спорами. Культуры актиномицетов пигментированы (синие, фиолетовые, красно-оранжевые, желтые, зеленые, бурые, черные) или бесцветны. Воздушный мицелий – серый, белый, розоватый, голубовато-зеленый, коричневый, оливковый.

*Дрожжи* – одноклеточные, бесхлорофильные растительные немиецелиальные грибы. Бывают круглые, овальные, цилиндрические, яйцевидные, колбовидные, треугольные, стреловидные и серповидные.

**Задание 4. Приготовление и микроскопирование препаратов (мазков).** Препараты (мазки) готовят из бактериальных культур. Бактериальная **чистая культура** – это

культура, состоящая из микробных клеток одного вида. По способу получения представляет собой потомство (**клон**) одной клетки. В лаборатории микроорганизмы выращивают в питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы и чашки Петри. Внесение микроорганизмов в стерильную среду называется **посевом**, или **инокуляцией**. Перед посевом следует тщательно надписать на пробирке (колбе или чашке Петри) название микроорганизма и дату посева. Надпись делают маркером на стекле или на наклеенной этикетке.

Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов берут бактериологической петлей, если микроорганизмы выращены на плотной среде. В том случае, если пересевают культуры микроорганизмов, выросших в жидкой питательной среде, пользуются стерильной пипеткой. Использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор (3-5 %-ный водный раствор фенола или 2 %-ный раствор хлорамина), не касаясь ею окружающих предметов. При приготовлении препаратов из культуры бактерий, выросших на питательных средах, необходимо соблюдать правила асептики. Приготовление мазка из культуры, выращенной на скошенном агаре – «косяке» (рис. 6):

1. Предметное стекло аккуратно берут за ребро и наносят номер или наименование бактериальной культуры.

2. Зажигают спиртовку.

3. Фламбируют поверхность стекла, где будет располагаться мазок.

4. Стекло помещают вблизи спиртовки на чашку Петри.

5. На предметное стекло наносят каплю дистиллированной воды.

6. В левую руку берут пробирку с культурой и помещают между 1 и 2 пальцами таким образом, что ладонь находится под пробиркой и горлышко пробирки направлено в зону спиртовки.

7. В правую берут бактериальную петлю, как карандаш.

8. Петлю фламбируют до покраснения сначала горизонтально, затем вертикально (1).

9. Не выпуская петли, мизинцем правой руки прижимают пробку пробирки к ладони (2) и осторожно вынимают ее из пробирки. Движения должны быть плавными.

10. Горло пробирки обжигают (3).

11. Вводят в пробирку петлю, охлаждая ее о стенки пробирки (4).

12. Осторожно закрывают и захватывают петлей культуру, не повреждая агара, и вынимают петлю, не касаясь ею стенок пробирки (5).

13. Прожигают горло пробирки и пробку в пламени, одновременно. Закрывают пробирку (6).

14. Петлю с культурой вносят в каплю дистиллированной воды и осторожно эмульгируют, не заходя за границы мазка (7).

15. Бактериальную петлю с остатками культуры прожигают до покраснения в пламени спиртовки (8).

16. Пробирку с культурой и петлю ставят в штатив.

17. Приготовленный мазок высушивают либо на воздухе, либо высоко над пламенем спиртовки.

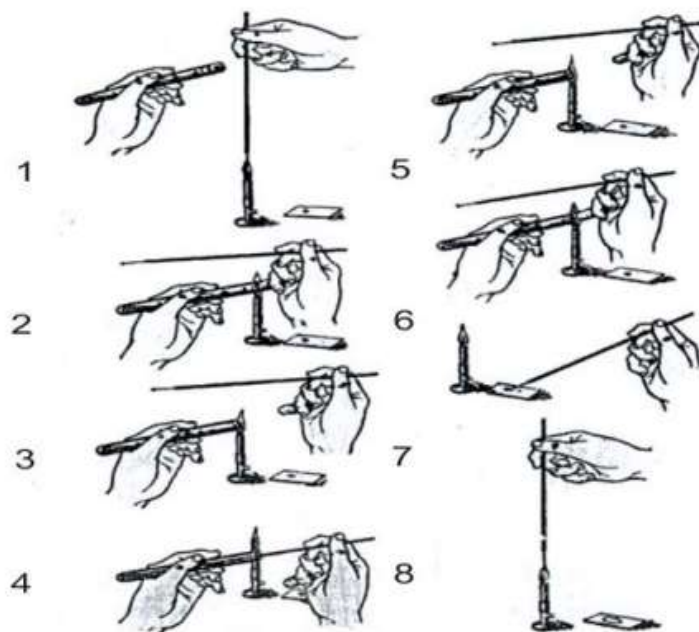


Рис. 6. Алгоритм приготовления мазка

*Примечания:*

1. Приготовление мазка из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, не требует использования дистиллированной воды или физраствора.
2. При приготовлении мазка из культуры, выросшей на чашке Петри, необходимо:
  - отметить изолированную колонию со стороны дна чашки;
  - чашку берут в левую руку и в сторону спиртовки приоткрывают крышку, придерживая ее 1 и 2 пальцами левой руки;
  - прокаленную петлю вводят под крышку чашки, остужая ее о край среды;
  - осторожно откалывают часть выделенной колонии и, не задевая края чашки, выносят на стекло с дистиллированной водой.

Такой алгоритм используется как для прижизненных, так и для фиксированных препаратов.

В микробиологической практике готовят препараты, позволяющие наблюдать живые клетки:

**Метод «раздавленная капля».** На середину чистого предметного стекла наносят каплю физраствора, стерильной петлей добавляют в нее небольшое количество бактерий и хорошо размешивают. Если исследуемые микроорганизмы выращены в жидкой питательной среде, то суспензию клеток микробов наносят с помощью стерильной пипетки. Каплю сверху накрывают покровным стеклом, предварительно подкрасив ее красителем (рис. 7), и рассматривают при большом увеличении или с иммерсией. В этом случае на покровное стекло наносят каплю иммерсионного масла.

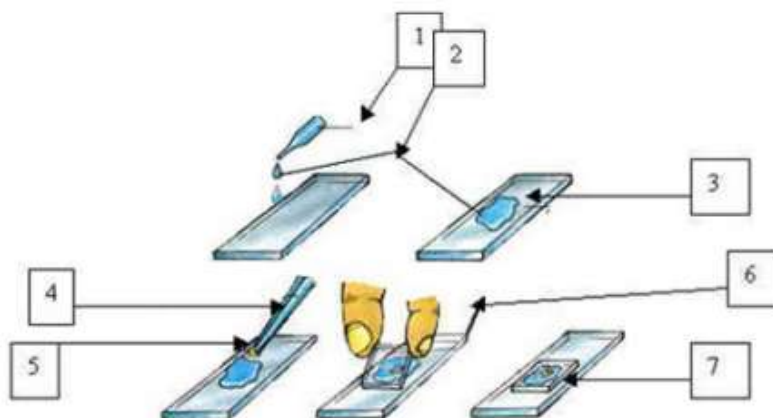


Рис.7. Приготовление препарата «раздавленная капля»: с помощью пипетки (1) капля воды (2) наносится на середину чистого обезжиренного стекла (3), куда с помощью микробиологической петли (4) вносят культуру микроорганизмов (5), не допуская растекания жидкости (6), каплю осторожно накрывают покровным стеклом (7)

Препарат помешают на столик микроскопа. Затем, смотря на препарат сбоку, очень осторожно погружают иммерсионный объектив 90X в масло, а затем медленно при помощи микрометрического винта приподнимают объектив до появления в поле зрения изучаемого объекта. Дальнейшая фокусировка производится микрометрическим винтом. В поле зрения микроскопа можно видеть быстродвигающиеся палочковидные бактерии, а у спорообразующих бацилл – и овальные споры.

**Метод «висячая капля».** Для получения висячей капли на чистое покровное стекло наносят каплю суспензии микробов, слегка подкрасив ее нейтральным красителем (нейтрального красного, метиленовой сини). Накладывают предметное стекло с углублением на покровное стекло так, чтобы капля оказалась в выемке, быстро переворачивают препарат. Капля, таким образом, окажется в висячем положении в закрытой камере. Препарат рассматривают при большом увеличении или с иммерсией, нанося каплю иммерсионного масла на покровное стекло. Такой подход позволяет наблюдать микробы длительное время и даже следить за делением и активным движением клеток.

**Фиксированные препараты** микроорганизмов изучают убитые клетки, которые в результате обработки пламенем или агрессивными реактивами становятся более восприимчивы к красителям, что, в свою очередь позволяет лучше изучить строение клеток, рассмотреть некоторые органеллы и т.п. Для того, чтобы его приготовить, последовательно выполняют следующие операции: приготовление мазка бактерий, высушивание, фиксацию, окраску, промывку, высушивание.

*Ход работы:*

1. На чистое предметное стекло в каплю дистиллированной воды вносят небольшое количество культуры микроорганизмов, тщательно перемешивают и растирают ее с по-

мощью петли концентрическими кругами, распределяя мазок по поверхности стекла тонким слоем;

2. Затем препарат высушивают на воздухе при комнатной температуре. Для ускорения процесса можно подсушивать препарат высоко над пламенем горелки. Высушивание надо проводить очень осторожно, не допуская перегрева мазка, так как при этом может произойти быстрое свертывание белков протоплазмы бактериальной клетки, что нарушит ее структуру.

3. После высушивания препарат фиксируют. Для этого высушенный мазок несколько раз быстро проводят через пламя горелки. После фиксации приступают к окраске.

4. Фиксированный мазок на 1-2 мин. покрывают раствором метиленового синего или карболового фуксина. Избыток краски тщательно смывают струей воды до полного обесцвечивания стекающих капель.

5. После окраски препарат высушивают над пламенем горелки и рассматривают с иммерсионным объективом. Для этого на фиксированный окрашенный и хорошо высушенный охлажденный мазок наносят каплю иммерсионного масла (покровным стеклом накрывать не надо).

6. Результаты приготовления и микроскопирования препаратов запишите в виде таблицы 2.

7. По окончании работ уберите рабочее место в соответствии с правилами работы в микробиологической лаборатории.

*Таблица 2*

Результаты микроскопирования микробиологических препаратов

Название препарата	Зарисовка	Пояснение, что наблюдали в области объектива микроскопа
«Раздавленная капля»		
«Висячая капля»		
Фиксированный препарат		

### **Контрольные вопросы**

1. Изложите основные правила работы в микробиологической лаборатории.
2. Укажите способы стерилизации микробиологической посуды и питательных сред.
3. В чем заключается принцип действия светового микроскопа?
4. Для чего используют люминесцентный и электронный микроскоп?
5. В чем различие между чистой и накопительной культурой?
6. Каково назначение предметных и покровных стекол, микробиологической петли, шпателя Дригальского?
7. Изложите суть метода лимитирующих разведений и цель его использования при количественном учете микроорганизмов почвенной экосистемы.
8. Укажите различие между прижизненными и фиксированными препаратами микроорганизмов.
9. Изложите техники приготовления препаратов «раздавленная капля», «висячая капля», а также фиксированных препаратов.

## **Лабораторная работа № 2**

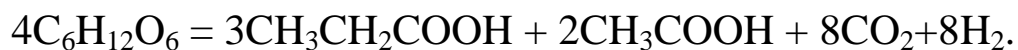
### **Участие почвенных микроорганизмов в цикле углерода**

Роль микроорганизмов в круговороте углерода двойственна: автотрофные микроорганизмы в реакциях фото- или хемосинтеза переводят накапливающийся в атмосфере диоксид углерода в органическое вещество; гетеротрофные микроорганизмы, наоборот, получают энергию путем разложения органических веществ [3, 12]. В зависимости от условий, микробы осуществляют **дыхание** (в аэробных условиях органические субстраты полностью окисляются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ), либо **брожение** (без доступа кислорода). Брожение сопровождается частичным высвобождением энергии, заключенном в органическом веществе. Поэтому среди конечных продуктов всегда присутствуют недоокисленные вещества – спирт, органические кислоты и т.д. Соответственно, различают молочнокислое, спиртовое, маслянокислое брожение.



Маслянокислые бактерии широко распространены в почве, навозе, загрязненных водоемах, в разлагающихся растительных остатках, на поверхности растений и т.д.

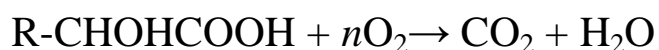
Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:



Помимо масляной в ходе брожения выделяется и уксусная кислота, при подкислении среды – бутиловый спирт и ацетон. Соответственно, по преобладанию тех или иных конечных продуктов выделяют **истинно маслянокислое брожение** (брожение глюкозы, крахмала), **ацетонобутиловое брожение**, брожение **пектиновых веществ**.

Маслянокислое брожение нередко является причиной прогоркания семян подсолнечника и сои, а также животных жиров и растительных масел. Накапливание в силосе масляной кислоты до 0,3-0,4% приводит к тому, что он плохо поедается животными. Также, деятельность маслянокислых бактерий приводит к самосогреванию влажного зерна и сена.

В природе широко распространен процесс окисления целлюлозы, поскольку она составляет подавляющую часть растительных остатков. В хорошо аэрируемой почве окисление целлюлозы происходит с участием аэробных микроорганизмов – бактерий, грибов, актиномицетов. Они вырабатывают ферменты целлюлазу и целлобиазу, гидролизующие целлюлозу до глюкозы с образованием промежуточных соединений в виде оксикислот:



**Цель работы:** изучить процессы маслянокислого брожения крахмала и окисления целлюлозы как примеры участия разных групп микроорганизмов в цикле углерода.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с функциями почвенной микрофлоры в цикле углерода;

2. Получить накопительную культуру маслянокислых почвенных бактерий, провести лабораторное наблюдение за процессом маслянокислого брожения почвенными микроорганизмами и ознакомиться с качественными реакциями на продукты брожения;

3. Провести наблюдение за процессом аэробного окисления целлюлозы в лабораторных условиях;

4. Приготовить препараты для микроскопирования из полученных накопительных культур.

**Материалы и оборудование:** пробирки, каучуковые пробки, неочищенный немытый картофель, мел, водяная баня, раствор Люголя, 5%-ный раствор  $\text{FeCl}_3$ , 96%-ный этиловый спирт, концентрированная серная кислота, целлюлозные фильтры, колбы на 150 мл, питательная среда Омелянского, микроскоп, предметные и покровные стекла.

**Задание 1. Получение накопительной культуры маслянокислых бактерий, проведение качественной реакции на масляную кислоту, микроскопирование препаратов из накопительной культуры.**

*Ход работы:*

1. Сырой неочищенный картофель с комочками почвы (служат источником спор маслянокислых бактерий) нарезают мелкими кубиками, заполняют им  $\frac{1}{3}$  высокой пробирки, добавляют немного мела, заливают водой на  $\frac{2}{3}$  и помещают на водяную баню при  $80^\circ\text{C}$  на 10 мин для пастеризации.

2. Закрывают ватно-марлевой пробкой. Инкубируют при комнатной температуре. Через 2-3 дня картофель всплывает вследствие бурного газообразования.

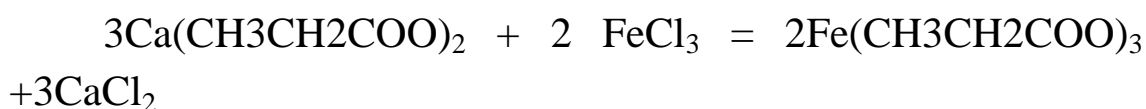
3. По окончании культивирования культуральную жидкость используют для микроскопирования и качественного определения продуктов брожения.

4. Для изучения морфологии маслянокислых бактерий каплю культуральной жидкости наносят на предметное стекло, добавляют каплю раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Обнаруживаются клетки бактерий рода *Clostridium* характерной формы (рис. 8):



Рис.8. Бактерии клостридиальной формы [20].

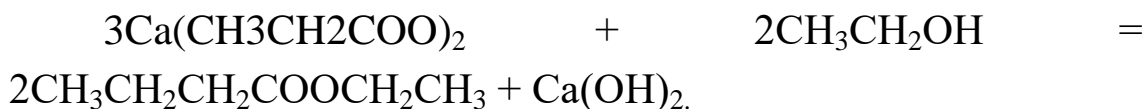
5. Нейтральные растворы маслянокислых солей при нагревании с  $\text{FeCl}_3$  приобретают коричневое окрашивание из-за образования маслянокислого железа. В пробирку наливают 3-5 мл культуральной жидкости, добавляют 1-2 мл 5%-го  $\text{FeCl}_3$  и нагревают на пламени. Реакция идет по уравнению:



Раствор маслянокислого железа в отраженном свете имеет буровато-коричневый свет, в проходящем свете – кроваво-красный.

6. К 3-5 мл культуральной жидкости в пробирке приливают 0,5 мл 96%-ного этанола и 1-2 мл концентрированной серной кислоты. При взбалтывании и нагревании появляется

характерный запах масляноэтилового эфира (запах ананаса).  
Реакция протекает по уравнению:



7. В тетради описать визуальные наблюдения, как изменилась питательная среда по окончании культивирования, зарисовать микрофотографированные препараты, описать результат проведения реакций на масляную кислоту.

**Задание 2. Получение по методу Омелянского накопительной культуры, осуществляющей аэробное окисление целлюлозы, приготовление и микрофотографирование препаратов.**

*Ход работы:*

1. В колбу на 100-150 мл наливают 30 мл питательной среды, содержащей 0,1%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 0,05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

2. К раствору добавляют  $\frac{1}{3}$  чайной ложки испытуемой почвы, погружают в колбу со средой складчатый фильтр конусом вверх (высота фильтра не должна превышать  $\frac{3}{4}$  высоты колбы и ставят в термостат при 28-30°C.

3. На границе между воздухом и средой на целлюлозе будут развиваться аэробные целлюлозоразрушающие бактерии, бумага постепенно станет слизкой, местами покроется желтыми пятнами колоний миксобактерий.

На препаратах, приготовленных из мазков с поверхности фильтра, можно обнаружить представителей разных родов. Наиболее часто встречаются следующие роды (рис. 9).

4. В тетради описать внешний вид фильтра после завершения культивирования, зарисовать результаты микрофотографирования, сделать вывод о возможной родовой принадлежности микроорганизмов в полученной накопительной культуре.

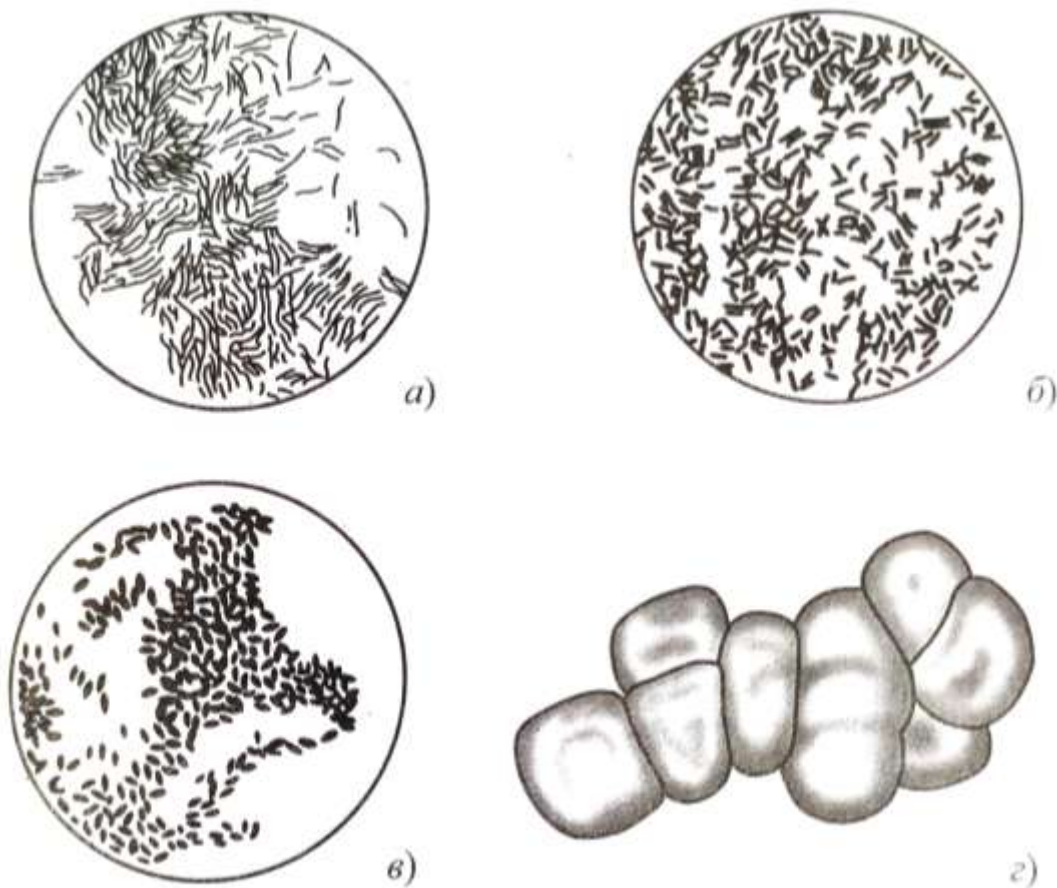


Рис. 9. Бактерии, окисляющие целлюлозу: а – *Cytophaga*; б – *Cellvibrio*; в – *Cellfalcicula*; г – *Polyangium*, плодовые тела [20].

***Cytophaga*** – слегка изогнутые, довольно длинные (3-8 мкм) палочки с заостренными концами. При старении переходят в укороченные палочки с округлыми концами, возможен переход и в шаровидную форму – микроспоры или миксоцисты (покоящиеся клетки). Разные виды этого рода образуют желтые, розовые, пурпурные, красно-коричневые, иногда бесцветные колонии.

***Cellvibrio*** – мелкие, слегка изогнутые в виде полумесяца неспорообразующие палочки с закругленными концами длиной 1,3-2 мкм, шириной 0,2-0,5 мкм. Колонии очень быстро распространяются по бумаге в виде желто-оранжевых пятен.

***Cellfalcicula*** – палочковидные клетки, утолщенные в центре, с заостренными концами, образуют на целлюлозе слизистые зеленые колонии.

*Polyangium* и *Sorangium* – миксобактерии. У этих двух родов клетки представляют собой цилиндрические палочки с тупыми, закругленными концами. При старении укорачиваются, образуют миксоспоры, которые собраны по 12-40 в спорангиоли – составные части плодовых тел. На бумаге образуют слизистые колонии желтого, оранжевого или темно-коричневого цвета.

*Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Stachybotris*, *Cladosporium*, *Dematium* – представители дейтеромицетов, эпифитный гриб *Fumago* и другие грибы также интенсивно разлагают целлюлозу. Активное участие в разложении целлюлозы также принимают некоторые виды **актиномицетов**.

Миксобактерии рода *Sorangium* легко обнаружить в подзолистых почвах под луговой растительностью и на окультуренных почвах. В этих же почвах при благоприятном режиме можно выявить и бактерии рода *Cellvibrio*, а на унавоженных – *Cytophaga*. В степных почвах наряду с грибами встречаются бактерии рода *Polyangium*.

#### **Контрольные вопросы**

1. Какие группы микроорганизмов можно выделить по способу использования углерода в качестве источника питания?
2. Чем отличается употребление органических веществ микроорганизмами в аэробных и анаэробных условиях?
3. Назовите типы брожения.
4. Укажите особенности протекания маслянокислого брожения в зависимости от исходных продуктов и кислотности среды.
5. Опишите качественные реакции на масляную кислоту.
6. Охарактеризуйте основные роды бактерий, осуществляющих аэробное окисление целлюлозы, назовите типы почвы, которые они преимущественно населяют.

#### **Вопросы для текущего контроля**

**Коллоквиум 1.** Общие микробиологические термины и понятия. Участие микроорганизмов в цикле углерода.

1. Правила работы с почвенными микроорганизмами, стерилизация, выбор и приготовление специальных питательных сред.

2. Методы культивирования почвенных микроорганизмов (в жидких и на твердых средах, стекла обрастания, обрастание комочков почвы). Автохтонная и аллохтонная микробиота почвы. Получение накопительных и чистых культур. Метод предельных разведений. Понятие колониобразующих единиц (КОЕ). Морфология бактериальных колоний. Физиолого-биохимические признаки микроорганизмов (отношение к кислороду, к кислотам и щелочам, температуре и т.д.).

3. Микроскопирование микроорганизмов. Устройство и область применения светового и электронного микроскопа. Приготовление витальных и фиксированных препаратов для светового микроскопа.

4. Участие почвенных микроорганизмов в цикле углерода. Аэробное окисление углеводов (целлюлозы, глюкозы). Основные представители. Брожение и его типы. Суммарные уравнения для аэробного и анаэробного окисления глюкозы. Оценка интенсивности брожения. Качественные реакции на продукты брожения.

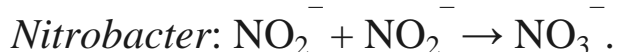
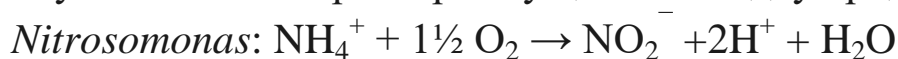
### **Лабораторная работа № 3**

#### **Участие почвенных бактерий в цикле азота (процессах аммонификации, нитрификации).**

Азот является одним из самых распространенных элементов в биосфере, при этом основная часть атмосферного азота находится в молекулярной форме ( $N_2$ ). Из-за того, что связи между двумя атомами азота очень прочные, живые организмы не способны напрямую использовать молекулярный азот – его сначала необходимо перевести в «связанное» состояние. В процессе связывания молекулы азота расщепляются, давая возможность отдельным атомам азота участвовать в химических реакциях с другими атомами, например, с кислородом, и таким образом мешая им вновь объединиться в молекулу азота. Связь между атомами азота и другими атомами достаточно слабая, что позволяет живым организмам усваивать атомы азота. Поэтому связывание азота – чрезвычайно важная часть жизненных процессов на нашей планете. Круговорот азота представляет собой ряд замкнутых взаимосвязанных путей, по которым азот циркулирует в земной биосфере [3, 7, 23].

Рассмотрим сначала процесс разложения органических веществ в почве. Различные микроорганизмы извлекают азот из разлагающихся органических материалов и переводят его в молекулы, необходимые им для обмена веществ. При этом оставшийся азот высвобождается в виде аммиака ( $\text{NH}_3$ ) или ионов аммония ( $\text{NH}_4^+$ ). Данный процесс называется *аммонификацией*. В аэробных условиях конечными продуктами являются  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , сульфаты. В анаэробных условиях выделяется сероводород, меркаптаны, индол и скатол, диамины путресцин и кадаверин, имеющие неприятный запах.

Образующийся аммиак или ионы аммония в ходе *нитрификации* окисляется до нитратов и нитритов, которые могут быть усвоены растениями. Этот процесс происходит в два этапа с участием бактерий преимущественно двух родов:



Энергию, выделяющуюся при окислении аммиака и нитрита, используют для ассимиляции диоксида углерода (хемотрофное питание, строго аэробные условия).

Дальнейшая судьба нитратов и нитритов – ассимиляция в растениях в виде органических молекул, которые со временем вновь подвергнутся аммонификации и нитрификации, либо участие в нитратном дыхании микроорганизмов (денитрификации), когда выделяется молекулярный азот. Общий баланс азота в почве зависит от деятельности азотфиксирующих бактерий, которые переводят  $\text{N}_2$  в доступные для растений формы [7, 23].

**Цель работы:** изучить процессы микробной аммонификации и нитрификации в почве.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с ролью процессов микробной аммонификации и нитрификации в цикле азота;



2. Получить накопительную культуру аммонифицирующих бактерий, ознакомиться с качественными реакциями на продукты гнилостного распада белковых субстратов;

3. Получить накопительные культуры почвенных микроорганизмов, осуществляющих первую и вторую стадии нитрификации, ознакомиться с качественными реакциями на продукты нитрификации.

**Материалы и оборудование:** колбы на 100 мл, образцы почвы, элективные питательные среды, реактив Грисса или цинк-йод-крахмал, серная кислота, дифениламин, микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

**Задание 1. Получение накопительной культуры аммонифицирующих бактерий, проведение качественных реакций на продукты гнилостного распада белковых молекул, приготовление мазков и микроскопирование препаратов.**

*Ход работы:*

1. В колбы на 100 мл разливают по 30 мл стерильной среды, содержащей 3% пептона, в качестве инокулята добавляют  $\frac{1}{3}$  чайной ложки почвы.

2. Колбы закрывают ватными пробками.

3. Над средой подвешивают две бумажки – красную лакмусовую или универсальную индикаторную бумагу, смоченную дистиллированной водой (для обнаружения выделяющегося аммиака), и фильтровальную, смоченную раствором лимоннокислого свинца, либо ацетата свинца (для выявления сероводорода и меркаптана). Бумажки не должны касаться среды.

4. На 3-5 сутки инкубации при 28-30°C проводят анализ – микроскопирование аликвот культуральной жидкости и оценивание изменения цвета индикаторных бумажек. Выде-

ляющийся в атмосферу аммиак окрашивает подвешенную лакмусовую бумажку в синий цвет. Сероводород окрашивает фильтровальную бумагу, смоченную ацетатом свинца, в черный цвет. Наличие серебристого налета указывает на выделение меркаптанов.

5. Для обнаружения возбудителей гнилостного распада белка готовят препарат «раздавленная капля», также фиксированные окрашенные препараты.

Чаще всего встречаются клетки *Proteus vulgaris*, представителя первого этапа распада белковых молекул – неспорообразующие, неодинаковой длины палочки. Также можно увидеть много спорообразующих клеток *Bacillus mycoides*, вызывающих аммонификацию белков в аэробных условиях. В анаэробных условиях и по мере исчерпания кислорода можно наблюдать *Clostridium putrificus* [20].

6. В тетради зарисовать и описать препараты, сделать вывод о биохимических реакциях в накопительной культуре по результатам качественных реакций.

**Задание 2. Получение накопительной культуры почвенных нитрификаторов, проведение качественных реакций на продукты нитрификации, приготовление и микроскопирование мазков.**

*Ход работы:*

1. Первую и вторую фазу нитрификации наблюдают при выращивании инокулята (¼ чайной ложки почвы) в соответствующих средах в течение 7-21 сут при 25-30°C. В среде для первой фазы нитрификации появляется азотистая, для второй фазы – азотная кислота.

2. Качественная среда на азотистую кислоту проводится с реактивом Грисса или цинк-йод-крахмалом: 1мл реактива Грисса и 10 мл культуральной жидкости кипятят. Наличие

азотистой кислоты определяется по появлению красного окрашивания.

3. Реакцию с цинк-йод-крахмалом проводят так: в лунку фарфоровой пластинки вносят каплю культуральной жидкости, 3 капли реактива и каплю 20%-ной серной кислоты. В присутствии азотистой кислоты появляется синее окрашивание.

4. При исследовании второй фазы нитрификации в лунку фарфоровой пластины вносят каплю культуральной жидкости, каплю серной кислоты и кристалл дифениламина. В присутствии азотной кислоты появляется темно-синее окрашивание.

5. То же происходит в присутствии и азотистой кислоты, поэтому вначале убеждаются в отсутствии азотистой кислоты в пробе.

6. При микроскопировании можно наблюдать овальные, похожие на ноль, клетки бактерий рода *Nitrosomonas* (в первую фазу нитрификации), а также мелкие, слегка искривленные и угловатые клетки *Nitrobacter* (во вторую фазу нитрификации).

7. В тетради необходимо описать биохимические процессы в культуральной жидкости, исходя из результатов качественных реакций, зарисовать и описать микробиологические препараты.

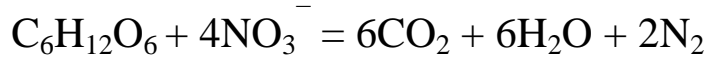
#### **Контрольные вопросы**

1. Опишите стадии цикла азота в биосфере и укажите, какую роль при этом выполняют микроорганизмы.
2. Что такое аммонификация?
3. Какие качественные реакции можно использовать для подтверждения процесса аммонификации?
4. Укажите этапы нитрификации и участвующих бактерий.
5. Укажите качественные реакции для первого и второго этапа нитрификации.

## Лабораторная работа № 4

### Моделирование процесса денитрификации в лабораторных условиях

Денитрификация (нитратное дыхание) происходит с использованием связанного кислорода нитрата. В процессе денитрификации органические субстраты окисляются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ :



Таким образом, денитрификация способствует снижению накопления нитратов в почвах и является основной причиной потерь азота удобрений из почвы в результате улетучивания его газообразных соединений [3, 7, 12]. К сожалению, это приводит к снижению биологической активности почвы, ее биоразнообразия, устойчивости. В связи с этим оценка интенсивности денитрификации и ее продуктов является исключительно важной. Следует отметить и положительное биосферное значение процесса денитрификации, которое заключается в том, что это единственный биологический процесс, благодаря которому связанный азот преобразуется в свободный. С глобальной точки зрения этот процесс имеет решающее значение для сохранения жизни на земной суше. В нормально аэрируемых почвах нитрат-материальная основа процесса денитрификации представляет собой конечный продукт минерализации, легко вымывается из почв и накапливается в гидросфере [23]. Содержание молекулярного азота в атмосфере в отсутствие денитрификации стало бы уменьшаться, и процессы роста растений и продукции биомассы на суше, в конце концов, прекратились бы.

Микроорганизмы, осуществляющие процесс денитрификации, широко распространены в природе и, как правило, относятся к родам *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. stutzeri*) и *Paracoccus* (*P. denitrificans*). Процесс идет в анаэробных условиях.

**Цель работы:** изучить процесс денитрификации в почве.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с процессом денитрификации в почве и его значением в цикле азота;
2. Получить накопительную культуру денитрифицирующих бактерий;
3. Провести качественные реакции на продукты жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий (нитрат, нитрит и аммиак);
4. Приготовить и провести микроскопирование препаратов из культуральной жидкости.

**Оборудование и реактивы:** среда Гильтая или заменяющая ее среда, прибор для культивирования денитрифицирующих организмов, свежая почва, шпатель, пипетки Мора на 1 мл, дифениламин в концентрированной кислоте, цинк-йод-крахмал (реактив Грисса), 20%-ная  $H_2SO_4$ , реактив Несслера, спиртовка, микроскоп, предметные стекла, реактивы для приготовления окрашенных препаратов.

**Задание №1. Получение накопительной культуры денитрифицирующих бактерий.**

*Ход работы:*

1. В 50 мл колбу с небольшим количеством среды Гильтая добавляют  $\frac{1}{3}$  чайной ложки почвы.
2. Среду тщательно перемешивают для удаления пузырьков воздуха, затем колбы дополняют питательной средой до края и закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлена открытая с двух сторон стеклянная трубка, расширенная в верхней части. Пробка вытесняет часть жидкости в стеклянную трубку (рис.10). Под пробкой не должны оставаться пузырьки воздуха.
3. В трубку над средой наливают вазелиновое масло небольшим слоем для создания анаэробных условий. Отсут-

ствие углеводов в среде исключает процесс брожения. В полученных условиях будут развиваться организмы, способные использовать связанный в соединениях кислород нитрата.



Рис.10. Прибор для культивирования денитрифицирующих бактерий [20].  
1 – ватная пробка; 2 – слой вазелинового масла; 3 – каучуковая пробка.

4. При постановке опыта наличие в среде нитрата устанавливается капельной реакцией с дифениламином.

5. Прибор со средой и почвой помещают в термостат при температуре 28-30°C. После 5-6 дней инкубации культуру подвергают анализу – отмечают появление пузырьков газа под пробкой и цвет среды.

### **Задание №2. Определение продуктов жизнедеятельности денитрифицирующих бактерий.**

*Ход работы:*

1. Из культуральной жидкости делают три пробы: *на нитрат* – с дифениламином, *на нитрит* – с реактивом Грисса, *на аммиак* – с реактивом Несслера.

Как правило, на 6 день пробы на нитрат и нитрит отрицательные. Обильное газообразование свидетельствует о том, что азот в составе нитрата восстанавливается до молекулярного азота. Желтое окрашивание с реактивом Несслера указывает на то, что культивируемые бактерии аммонифицируют нитрат, накапливая аммиак.

2. Результаты качественных реакций записать в тетради, объяснить наблюдаемые явления.

### **Задание №3. Микроскопирование бактерий-денитрификаторов.**

*Ход работы:*

1. Из середины колбы чистой пипеткой взять каплю и приготовить фиксированный окрашенный препарат, рассмотреть его на микроскопе под иммерсионным маслом.

На препарате возможно наблюдать неспорообразующие сферические клетки или короткие палочки *Paracoccus denitrificans*. Позеленение среды указывает на развитие *Pseudomonas fluorescens*. На среде с сегнетовой солью чаще развивается *P. stutzeri* [20].

2. В тетради зарисовать результаты микроскопирования, сделать вывод о том, какие бактерии преобладают в рассмотренном препарате.

#### **Контрольные вопросы**

1. Какой процесс называется нитратным дыханием почвы?
2. Какие бактерии в этом участвуют?
3. В каких условиях происходит нитратное дыхание и как это достигается в лабораторных условиях?
4. Какие химические реакции можно использовать как индикаторы процесса денитрификации в культуральной жидкости почвенных бактерий?

## **Лабораторная работа № 5**

### **Изучение процесса фиксации молекулярного азота почвенными бактериями**

Азотфиксация представляет собой важнейший биологический процесс, который играет большую роль в круговороте азота в природе и обогащает почву и водоёмы связанным азотом. В атмосфере над 1 га почвы содержится более

70 000 т свободного азота, который становится доступным для высших растений только благодаря процессу фиксации молекулярного азота в азотистые соединения [3, 7, 12].

Ассимиляцию молекулярного азота осуществляют прокариоты, которых в зависимости от взаимоотношений с растением, делят на три группы:

1. Живущие в симбиозе с растением (симбиотические азотфиксаторы);

2. Ризосферные (корневые) и филлосферные (листовые) бактерии, формирующие ассоциации с различными видами небобовых растений (ассоциативные азотфиксаторы);

3. Свободноживущие почвенные азотфиксаторы живут независимо от присутствия растения: вне ризосферы, в почве пара, даже в почве дорог.

Все три группы организмов являются *диазотрофными*, т.е. для питания могут использовать и молекулярный, и минеральный азот.

Симбиотическая азотфиксация – способность бактерий связывать молекулярный азот, находясь в симбиозе с высшими растениями. Клубеньки на корнях имеют более чем 1300 видов бобовых и более 200 видов небобовых и кустарниковых пород (ольха, облепиха, мох и др.). Клубеньковые бактерии относятся к родам *Rhizobium* (преимущественно), *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и другим [16, 20].

Внедрившись в ткань корня, эти бактерии распространяются в виде инфекционных нитей – колоний размножившихся клеток бактерий. В зрелой клубеньковой ткани бактериальные клетки превращаются в бактериоиды – грушевидные, сферические и ветвистые образования, которые по размеру в 3-4 раза больше по сравнению с палочковидной бактериальной клеткой. Соответственно, зона клубенька называется бактериоидной. Форма и размеры клубеньков разных бобовых растений неодинаковы. Разрушение клубеньков со-



проводится деградацией элементов растительной клетки и лизисом части бактериоидов, оставшаяся часть бактериоидов формирует мелкие, кокковидные клетки, выполняющих функцию размножения и сохранения в природе.

**Цель работы:** изучение жизнедеятельности почвенных симбиотических азотфиксирующих бактерий.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с ролью микробной азотфиксации в цикле азота и в минеральном питании растений;
2. Провести микроскопический анализ клубеньков бобовых растений.

**Материалы и оборудование:** свежие бобовые растения (возраст 7-14 дней), острая бритва, стерильная игла, предметные и покровные стекла, микроскоп и все необходимое для приготовления окрашенных препаратов.

**Задание 1. Получение свежих бобовых растений.** Предварительно, за 10-14 дней до проведения данной лабораторной работы посеять семена бобовых растений, получить всходы. К анализу пригодны варианты с хорошо развитой корневой системой.

**Задание 2. Изучение структуры клубеньков и их микроскопирование.**

*Ход работы:*

1. Для изучения строения клубенька готовится срез при помощи ботанической бритвы.
2. Тонкий срез, продольный или поперечный, помещают на предметное стекло и просматривают в «раздавленной капле» при разных увеличениях.
3. В сухой системе просматривают структуру клубенька, обнаруживают бактериоидную ткань.
4. При достаточной тонкости среза исследуют с иммерсионной системой, где хорошо видна бактериоидная зона клубенька.
5. В тетради зарисовать и описать форму бактериоидов.

### **Задание 3. Изучение формы клубеньковых бактерий.**

#### *Ход работы:*

1. Если клубенек достаточно крупный, его разрезают на две части, а поверхность среза многократно прокалывают стерильной иглой, вызывая как можно большее механическое повреждение клеток.

2. Затем из него отжимают каплю на предметное стекло и готовят фиксированный и окрашенный препарат.

3. Окрашивание проводят карболовым эритрозинном, фуксином или генциан фиолетовым. Ткань клубенька окрашивается в синий цвет, а бактерии – в красный.

4. В тетради зарисовать и описать форму обнаруженных клубеньковых бактерий.

#### **Контрольные вопросы**

1. Дайте определение азотфиксации.
2. Какова экологическая роль процесса азотфиксации в биосфере?
3. Назовите группы азотфиксирующих микроорганизмов и укажите их особенности.
4. Опишите структуру клубенька, образующегося на корнях растений в результате симбиоза с азотфиксаторами.

#### **Вопросы для текущего контроля**

**Коллоквиум 2.** Участие почвенных микроорганизмов в цикле азота.

1. Аммонификация, виды микробов-аммонификаторов, условия протекания процесса, уравнения реакций, роль в геохимическом цикле азота.

2. Нитрификация, виды микробов-нитрификаторов, условия протекания процессов, уравнения реакций, роль в геохимическом цикле азота.

3. Денитрификация (нитратное дыхание), виды микробов-денитрификаторов, условия протекания процесса, уравнения реакций, роль в геохимическом цикле азота

4. Азотфиксация (группы микроорганизмов по типу взаимодействия с растением), виды бактерий, условия протекания, уравнения реакций, строение клубеньков, роль в геохимическом цикле азота.

5. Качественные реакции, указывающие наличие в культуральной среде продуктов аммонификации, нитрификации, денитрификации, азотфиксации.

## Лабораторная работа № 6

### Изучение процессов превращения соединений фосфора почвенными бактериями

Микроорганизмы вносят весомый вклад в мобилизацию доступных для растений форм фосфора в почве. Значительное количество (до 30-35%) фосфора в почве находится в органической форме, малодоступной для растений – в виде нуклеиновых кислот, фитина и его производных (фософлипидов, инозит-фосфатов). Микроорганизмы, продуцирующие фосфатазу, способны отщеплять от этих органических соединений фосфорную кислоту. Взаимодействуя с почвенными катионами, фосфорная кислота переходит в формы солей, доступные для растений [3, 7, 12].

Также фосфор в почве находится в виде трикальциевых фосфатов  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  и других труднорастворимых солей. Специфичных организмов, способных растворять трикальциевые фосфаты, не выявлено. Однако известно, что косвенно в этом процессе участвуют некоторые виды бактерий. Например, нитрифицирующие бактерии, окисляя аммоний, образуют азотную кислоту; серобактерии, окисляя сероводород и серу, продуцируют  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; аэробные организмы в процессе дыхания выделяют углекислый газ, который превращается в  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Все эти кислоты взаимодействуют с трикальциевым фосфатом и образуют ди- и монофосфаты кальция, доступные растениям [20].

**Цель работы:** ознакомиться с ролью почвенных микроорганизмов в процессах мобилизации фосфора и фосфорного питания растений.

**Задачи:**

1. Изучить процесс мобилизации фосфора почвенными микроорганизмами из органических соединений и провести лабораторные тесты, позволяющие визуализировать соответствующую активность микроорганизмов;

2. Изучить способность почвенных микроорганизмов к мобилизации фосфора из труднорастворимых неорганических соединений посредством постановки необходимых лабораторных тестов.

**Материалы и оборудование:** стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, шпатели Дригальского, образцы почвы, богатые гумусом, стерильные пипетки.

**Задание №1. Изучение процесса мобилизации фосфора из органических фосфатов.**

*Ход работы:*

1. Разлить агаризованную среду Менкиной в чашки Петри и высеять заранее приготовленные разведения ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) почвенной суспензии в физрастворе.

2. Через несколько дней инкубации чашки просматривают. Если в почве присутствовали бактерии, выделяющие фосфатазу, то на данной среде по мере роста они отщепляют из органических соединений фосфорную кислоту. Этот процесс визуально заметен по зоне растворения мела вокруг растущих колоний. В этом отношении особо активны бактерии рода *Bacillus*.

3. Далее препараты, взятые из выросших колоний, микроскопируют. Наблюдают крупные соединенные попарно и в виде коротких цепочек спорообразующие палочки.

4. В тетради записать, зарисовать и объяснить наблюдаемые явления.

**Задание №2. Изучение процесса мобилизации доступных форм фосфора из нерастворимых солей фосфорной кислоты.**

*Ход работы:*

1. На дно чашки Петри насыпают 0,1-0,2 г  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , стерильной пипеткой вносят 0,5 мл почвенных разведений и

наливают (примерно 15 мл на чашку) теплую расплавленную агаризованную среду, содержащую 2% глюкозы.

2. Аккуратно перемешивают для равномерного распределения всех компонентов.

3. После застывания инкубируют несколько дней.

4. Растворение фосфата определяется по наличию прозрачного ореола вокруг выросших колоний. Способность к мобилизации фосфора из ортофосфата была описана для бактерий родов *Pseudomonas* и *Advenella*.

5. В тетради записать, зарисовать и объяснить наблюдаемые явления.

#### ***Контрольные вопросы***

1. Опишите роль бактерий в превращениях органических соединений фосфора.

2. Как происходит мобилизация доступных форм фосфора из нерастворимых солей (ортофосфата) с участием бактерий?

3. Бактерии каких родов участвуют в мобилизации фосфора?

### **Лабораторная работа № 7**

#### **Изучение роли почвенных бактерий в превращениях железа**

Трудная растворимость солей железа и сложность перехода в растворимое состояние усложняют поглощение ионов этого металла корнями растений, что объясняет внешние проявления в виде хлороза листьев, связанные с дефицитом железа для обеспечения реакций и процессов. В связи с этим дефицит железа, вызванный разными причинами, представляет собой серьезную мировую сельскохозяйственную проблему. Также следует отметить важную роль микроорганизмов для преобразования окисленной формы железа в восстановленную и наоборот. Это влияет на растворимость его соединений и доступность ионов металла для усвоения растениями [3, 7, 12, 20].

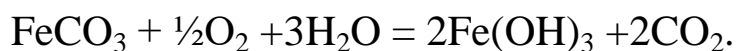
Железо поступает в биологический круговорот из гуминовых соединений почвы после мобилизации с участием микроорганизмов. В этой связи следует рассматривать два противоположных процесса – восстановление окисного (III) железа в закисное (II) и, соответственно, окисление закисного железа (II) в окисное (III).

Если почва насыщена водой, в ней происходят процессы восстановления железа (железоредукция), приводящие к оглеению почвы. При таких условиях железо может поступать в растение из почвы в избыточном количестве с негативными последствиями для него. Роль микроорганизмов в восстановлении железа можно свести к двум направлениям:

1. Выделяющиеся в ходе брожения восстановленные продукты жизнедеятельности (сероводород, метан, молекулярный водород) могут реагировать с окисным железом (III);

2. Окисное железо (III) используется специфическими группами микроорганизмов, которые используют его как энергетический субстрат.

В аэробных условиях закисное железо (II) превращается в окисное (III). В водных экосистемах, на дне болот и морей образуются залежи руд железа благодаря деятельности железобактерий, которые окисляют закисное железо в гидроксид железа:



Данный процесс также имеет негативное влияние, когда при осушении торфяно-болотных почв образующиеся охристые осадки гидроксида железа блокируют работу водопроводных труб и дренажных систем [1, 12].

В накопительной культуре железобактерий с наибольшей вероятностью можно встретить *Leptothrix ochraceae*, нитчатый организм из цепочки палочковидных клеток, окруженных трубчатым чехлом, пропитанным оксидом железа [20].

В почве образование отложений железа может происходить за счет разрушения органических комплексов железа представителями родов бактерий *Siderocarpa*, *Seliberia*, *Pedomicrobium* [16].

Для знакомства с бактериями, участвующими в превращениях железа, закладывают стекла обрастания по методу Холодного на 7-30 суток в водоем, либо в корневой зоне водных растений.

**Цель работы:** изучение жизнедеятельности микроорганизмов почвы, участвующих в круговороте железа.

**Задачи:**

1. Микроскопирование витальных препаратов из микроорганизмов почвы, участвующих в превращениях железа;
2. Проведение качественных реакций с накопленным бактериальными клетками железом;
3. Микроскопирование фиксированных препаратов, приготовленных из накопительных культур микроорганизмов, участвующих в превращениях железа в почве.

**Оборудование и материалы:** накопительная культура, микроскоп, спиртовка, пипетки, материалы для приготовления окрашенных препаратов, 10%-ная соляная кислота, раствор желтой кровяной соли.

**Задание №1. Приготовление препарата «раздавленная капля» из накопительной культуры бактерий, участвующих в превращениях железа.**

*Ход работы:*

1. Приготовленный препарат «раздавленная капля» микроскопировать с иммерсионной системой.
2. Поле обнаружения желтоватых нитей под покровное стекло добавить каплю 10%-ной соляной кислоты, наблюдать обесцвечивание нитей ввиду растворения железа.

3. Затем, сняв покровное стекло, нанести каплю желтой кровяной соли  $K_4[Fe(CN)_6]$ , наблюдая образование темно-синего осадка берлинской лазури.

**Задание №2. Приготовление фиксированного препарата из накопительной культуры бактерий, участвующих в превращениях железа.**

*Ход работы:*

1. Обработанный соляной кислотой препарат промывают водой, сушат, фиксируют и красят генцианом фиолетовым или эритрозином.

2. Далее препарат просматривают с иммерсионной системой, наблюдая в бесцветных нитях ярко окрашенные клетки или цепочки клеток, вышедших из нитей.

3. Результаты наблюдений в микроскоп описать в тетради, зарисовать, объяснить наблюдаемые явления.

**Контрольные вопросы**

1. В составе каких соединений железо присутствует в почве?

2. Какова роль микроорганизмов в восстановлении железа?

3. В каких условиях происходит восстановление/окисление железа бактериями?

4. Каковы положительные и отрицательные последствия окисления/восстановления железа бактериями?

## **Лабораторная работа № 8**

### **Роль почвенных бактерий в превращениях соединений серы**

В почве в виде неорганических соединений сера бывает окисленной (сульфаты, полиотионаты), восстановленной (сульфиды) и редко молекулярной. В почвах сера претерпевает разнообразные превращения, переходя из неорганических соединений в органические и обратно. С урожаем из почв ежегодно выносятся от 10 до 80 кг/га серы в зависимо-



сти от биологических особенностей сельскохозяйственных растений и величины урожая. Безбалластные минеральные удобрения не содержат серы, и дефицит ее в почве с ростом урожая постоянно увеличивается. Поэтому необходимы изучение серного режима почв, разработка методов диагностики дефицита серы и эффективного применения серосодержащих удобрений [3, 7, 13, 23].

Окисление серы и ее восстановленных неорганических и органических соединений происходит в аэробных и анаэробных условиях с участием разных групп микроорганизмов. В аэробных условиях окислительные процессы осуществляют хемоавтотрофные прокариоты – серные бесцветные (неокрашенные) бактерии и тионовые бактерии, термоацидофильные архебактерии, а также некоторые типичные гетеротрофные бактерии. В анаэробных процессах участвуют фототрофные серные пурпурные и зеленые бактерии, осуществляющие бескислородный фотосинтез.

Фототрофные серобактерии распространены главным образом в водоемах, хемотрофные тионовые – в почвах. Образующая ими серная кислота подкисляет почву, что способствует переводу некоторых важных для растений элементов (фосфора, железа) в доступную форму.

При разложении в почве органических серосодержащих веществ, а также при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Этот газ превращается в безвредные, доступные для растений соединения серобактериями. Распространены сульфатредуцирующие бактерии во всех почвах, но особенно много их в почвах с режимом, приводящим к длительному анаэробнозису, например в затопляемых почвах рисовых полей, а также в болотах, илах, лиманных грязях, пластовых водах, сопровождающих нефтяные место-

рождения. В подзолах мало сульфатов, и биогенным путем сульфиды в них не накапливаются. В щелочных и нейтральных почвах образуются нерастворимые сульфиды. Накопление сульфида железа приводит к образованию черного ила.

Процессы восстановительных звеньев цикла серы тесно сопряжены с окислительными, и часто сульфатредуцирующие бактерии развиваются в общих местообитаниях с серными, которые используют для окисления сероводород, поступающий из анаэробной зоны. Накопление в среде сероводорода может вызывать негативные последствия, так как он бывает причиной токсикоза почв, а в водоемах повышение концентрации  $H_2S$  приводит к массовой гибели рыбы и других животных. В местах высокой активности сульфатвосстанавливающих бактерий происходит коррозия металлических конструкций в почве ( $H_2S$  окисляет железо).

**Цель работы:** изучить жизнедеятельность почвенных бактерий, участвующих в цикле серы.

**Задачи:**

1. Получить накопительные культуры серобактерий и сульфатредуцирующих бактерий;
2. Приготовить препарат «раздавленная капля»;
3. Провести качественную реакцию на сероводород, образующийся в ходе жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий.

**Оборудование и материалы:** колбы, элективные среды, лимоннокислое железо, микроскоп, предметные и покровные стекла.

**Задание 1. Получение накопительной культуры пурпурных серобактерий.** Цветные серобактерии являются фотолитоавтотрофами. Источником углерода у них служит свет, донором водорода для восстановления  $CO_2$  – сероводород.

*Ход работы:*

1. На среде Ван-Ниля в анаэробных условиях можно получить накопительную культуру в течение 5-7 суток инкубации в люминостане или на свету. Инокулятом могут служить образцы почвы или ила.

2. В случае развития пурпурных серобактерий среда приобретает розовый, а затем красный цвет. Рост зеленых серобактерий придает среде желто-зеленый цвет. В подвижных клетках бактерий видны включения серы.

3. Приготовить препарат «раздавленная» капля, описать в тетради наблюдения.

**Задание 2. Получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий, проведение качественной реакции на сероводород.**

*Ход работы:*

1. На среде Ван-Дельдена в анаэробных условиях получают накопительную культуру сульфатвосстанавливающих бактерий, предварительно добавив в среду лимоннокислое железо (приблизительно 0,5 г на 100 мл). Тогда по мере выделения сероводорода среда будет окрашиваться в черный цвет.

2. Описать в тетради результаты культивирования.

**Контрольные вопросы**

1. В каких видах встречается сера в почвах?
2. Назовите группы бактерий, участвующих в окислении соединений серы.
3. Охарактеризуйте тип метаболизма сульфатредуцирующих бактерий.
4. Укажите, какие процессы происходят с соединениями серы на разных типах почв.
5. Чем опасно чрезмерное накопление сероводорода в почве?
6. Укажите качественную реакцию на выделение сероводорода микроорганизмами в накопительной культуре.

### **Вопросы для текущего контроля**

**Коллоквиум 3.** Участие почвенных микроорганизмов в мобилизации серы, фосфора и железа.

1. Доступные для растений формы фосфора, железа и серы в почве. Физические факторы, влияющие на доступность этих соединений. Геохимические циклы фосфора, железа и серы.

2. Последствия накопления сероводорода в почве вследствие сульфатного дыхания. Условия протекания и основные уравнения реакций. Качественные реакции на образования сероводорода в питательной среде. Значение сероводородокисляющих микроорганизмов в почве. Основные представители, условия культивирования.

3. Роль железа в развитии растений, доступные формы железа в почве и их превращения с участием микроорганизмов. Влияние физических факторов (обводненность). Качественные реакции на железо в форме (II) и (III).

4. Роль фосфора в развитии растений, формы фосфора в почве. Роль микроорганизмов в мобилизации органических форм фосфора и трифосфатов. Основные уравнения реакций.

## **Лабораторная работа № 9**

### **Эпифитные микроорганизмы зерна**

На поверхности зерна обнаруживается разнообразная микрофлора, источником которой служит как ризосфера/филлосфера, так и переносимая насекомыми пыль. Развиваться при этом будут лишь эпифитные микроорганизмы, которые питаются продуктами экзосмоса растений, устойчивы к колебаниям влажности и действию фитонцидов. Численность этих микроорганизмов невелика, а видовой состав относительно постоянен: более 90% составляют гнилостные бактерии (род *Pseudomonas*). Особенно часто встречается *Erwinia herbicola*, образующая на плотных средах золотисто-желтые колонии. Встречаются также *Pseudomonas fluorescens*, микрококки, молочнокислые бактерии, дрожжи. Бацилл и микроскопических грибов немного.

В определенных условиях эпифитные микроорганизмы могут быть полезны для растений, поскольку препятствуют

проникновению паразитов в ткани растения. Однако на хранении зерна присутствие эпифитных микроорганизмов может сказаться отрицательно [2, 13, 14].

В зрелом зерне вода находится в связанном состоянии и поэтому рост микроорганизмов невозможен, они пребывают в покоящемся состоянии. На зерне с повышенной влажностью микроорганизмы начинают развиваться довольно быстро и данный процесс интенсифицируется с повышением температуры. Активные микробиологические процессы на поверхности зерна способствуют термогенезу (повышению его температуры). Самонагревание зерна ведет к смене микрофлоры, вытеснению эпифитных микроорганизмов, появлению термотолерантных микрококков (на плотных средах визуализируются как мелкие белые, плоские колонии), плесневых грибов, актиномицетов. Самонагревание выше 40-50°C способствует развитию спорообразующих и термофильных бактерий, виды плесневых грибов рода *Penicillium* постепенно заменяются представителями рода *Aspergillus*.

Таким образом, по видовому составу микрофлоры можно судить о том, подвергалось ли зерно самонагреванию и насколько далеко зашел этот процесс. Преобладание *Erwinia herbicola* в микробном ценозе зерна служит показателем его хорошего качества. Большое количество спорообразующих бактерий и грибов указывает на потерю семенами всхожести [15, 20].

**Цель работы:** определение количественного и качественного состава микробиоценоза зерна.

**Задачи:**

1. Провести количественный учет микробиоценоза зерна;
2. Определение качественного состава микробиоценоза зерна.

**Материалы и оборудование:** зерно в колбах (свежее и хранившееся при повышенной влажности), весы, колбы со

стерильной водой (50мл), пробирки, чашки Петри, элективные твердые питательные среды, микроскопы и все необходимое для микроскопирования.

**Задание 1. Количественный учет микробиоценоза зерна.**

*Ход работы:*

1. Готовится вытяжка: 5 г зерна помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2-3 г песка.
2. Колбы взбалтывают круговыми движениями 10 мин.
3. Из полученной вытяжки готовят разведения ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ).
4. По 1 мл каждого разведения вносят в чашки Петри и заливают охлажденной до 50°C агаризованной средой.
5. Через 3-5 суток инкубации подсчитывают общее число КОЕ и рассчитывают число КОЕ на 1 г зерна.
6. Ход вычислений записывают в тетради.

**Задание 2. Определение качественного состава микроорганизмов зерна.** Выросшие на чашках колонии группируют по культуральным признакам.

*Ход работы:*

1. Из каждой группы колоний готовят препараты.
2. Выявляют принадлежность к роду или виду.
3. Определяют численность бактерии каждой группы в процентах от общего числа микроорганизмов.
4. На основании микробиологического анализа делают заключение о качестве зерна.

На свежем доброкачественном зерне преобладает *Erwinia herbicola* (до 80%), которая образует блестящие оранжевые колонии. Встречается *Pseudomonas fluorescens*, формирующая желтовато-зеленоватые флуоресцирующие колонии; непигментированные неспорообразующие палочки; дрожжи – блестящие, выпуклые, часто окрашенные в розовые тона колонии. При учете на сусло-агаре с мелом выделя-

ются молочнокислые бактерии, образующие чечевицеобразные мелкие колонии с зонами растворения мела [20].

На несвежем зерне, хранившемся при повышенной влажности, *Erwinia herbicola* и *Pseudomonas fluorescens* не выявляются. Обнаруживаются микрококки, образующие мелкие белые блестящие колонии; спорообразующие палочки; актиномицеты, а также неспорообразующие палочки. При учете на сусло-агаре обнаруживается значительное количество грибов рода *Penicillium* и *Aspergillus*.

В тетради описать морфологию выросших колоний и клеток в приготовленных препаратах. Сделать вывод о качестве исследуемого зерна.

#### **Контрольные вопросы**

1. Укажите особенности жизнедеятельности эпифитных микроорганизмов зерна.
2. В чем заключаются польза и вред эпифитных организмов для растения?
3. Какие виды бактерий считаются эпифитными организмами зерна?
4. Что является причиной саморазогревания зерна и к каким последствиям оно приводит?
5. Укажите микробиологические признаки свежего доброкачественного и некачественного зерна.

## **Лабораторная работа № 10**

### **Анализ бактериальных препаратов (биоудобрений)**

Одним из способов повышения урожая является выращивание сельскохозяйственных культур по интенсивной технологии, что требует обязательного внесения минеральных удобрений. Наряду с этим активно продвигаются идеи биологического и природного земледелия, при котором применение химических удобрений и пестицидов сводится к минимуму, а в качестве функциональной альтернативы предлага-

ется использование микробиологических удобрений, которые содержат штаммы бактерий, способных повышать плодородие почв, например, за счет повышенной азотфиксации, а благодаря антагонистическим свойствам используемых штаммов подавлять рост патогенной микрофлоры.

Соответственно, важным условием эффективного применения микробиологических удобрений является сохранение жизнеспособности клеток в составе препарата [7, 12, 15, 20].

**Цель работы:** оценка числа живых клеток в составе бактериального препарата путем определения колониеобразующей способности.

**Задачи:**

1. Приготовление вытяжки из анализируемого биоудобрения;
2. Посев лимитирующих разведений полученной вытяжки на селективные питательные среды;
3. Определение общего числа клеток в анализируемом биоудобрении на 1 г препарата.

**Оборудование и материалы:** чашки Петри, твердая агаризованная среда, бактериальный препарат (азобактерин, ризоторфин, нитрагин и т.п.).

**Задание.** Приготовление вытяжки из препарата и высев на чашки Петри.

*Ход работы:*

1. Навеску препарата 10 г помещают в 100 мл воды.
2. Выдерживают в течение 1 ч, периодически встряхивая.
3. Затем содержимое энергично встряхивают 10 мин.
4. 10 мл полученной суспензии переносят в колбу с 90 мл стерильной водопроводной воды.
5. Встряхивают и получают разведение  $10^{-2}$ .



6. Затем готовят последующие разведения вплоть до  $10^{-8}$ .

7. Из двух последних разведений набирают по 1 мл суспензии, помещают в 3 параллельные чашки Петри, заливают слоем в 7-10 мм расплавленного охлажденного до  $50^{\circ}\text{C}$  агара Эшби (можно заменить на МПА + 2% глюкозы) тщательно, но аккуратно, перемешивают его с суспензией.

8. Как только агар застынет, чашки переворачивают вверх дном и в таком положении выдерживают в термостате при  $26-28^{\circ}\text{C}$ .

9. Подсчитывают клетки на 3-5 сутки. Общее число клеток (X) определяют по формуле:

$$X = K * P,$$

где K – среднее количество колоний, P – степень разведения.

10. Результаты расчетов заносят в тетрадь, делают вывод о жизнеспособности клеток в составе биопрепарата.

При выпуске в 1 г азобактерина, в частности, должно быть не менее 100 млн клеток азотобактера.

### ***Контрольные вопросы***

1. Что представляют собой удобрения на основе микроорганизмов?

2. Назовите преимущества и недостатки использования микробиологических удобрений.

3. Назовите критерии, по которым следует нормировать качество биоудобрений.

## **Лабораторная работа № 11**

### **Изучение антагонизма в почвенных экосистемах**

Явление антагонизма широко распространено в почвенных экосистемах. Представителями автохтонной микробиоты верхних горизонтов почвы являются актиномицеты. Их роль в почвообразовательном процессе заключается в деструкции труднорастворимых соединений – лигнина, целлюлозы. Кро-

ме того, актиномицеты синтезируют антибиотики и противомикробные вещества, подавляя рост и развитие патогенных бактерий и грибов в почве и проявляя, таким образом, антагонистическую активность [7, 6, 16, 20]. Антагонизм актиномицетов может проявляться, в частности, по отношению к кишечной палочке, попадающей в почву с фекальными массами сельскохозяйственных животных и представляющей потенциальную опасность для человека и животных как условный патогенный организм-возбудитель коллибациллезов и пр.

Также антагонизм встречается в отношениях «растение-микроорганизм», когда растения продуцируют особые вещества фитонциды, препятствуя развитию определенных групп микроорганизмов в филло- и ризосфере [14].

**Цель работы:** изучение антагонизма в почвенных экосистемах. оценка антагонистической активности актиномицетов и фитонцидов чеснока по отношению к кишечной палочке.

**Задачи:**

1. Определить антагонистическую активность актиномицетов по отношению к кишечной палочке;
2. Оценить антагонистическую активность фитонцидов чеснока по отношению к кишечной палочке.

**Материалы и оборудование:** чашки Петри с культурой почвенных актиномицетов, чашки со сплошным газоном кишечной палочки, дольки чеснока, стерильные диски из фильтровальной бумаги, стерильный нож, пинцет, автоматические пипетки и стерильные наконечники, спиртовка, спички.

**Задание 1. Определение антагонистической активности актиномицетов по отношению к кишечной палочке.**

*Ход работы:*

1. Чашка с выросшим сплошным газоном кишечной палочки делится на 4 сектора (один – контрольный, остальные опытные).

2. С обратной стороны сектора помечаются маркером.

3. Из чашки с культурой актиномицетов стерильным ножом вырезаются блоки размером 1x1 см и аккуратно переносятся в середину каждого опытного сектора.

4. Чашку не переворачивают, ставят в термостат и инкубируют в течение 7-14 дней при температуре 28°C.

5. Антагонистическую активность отмечают по появлению зон просветления на бактериальном газоне.

6. Результаты опыта зарисовывают в тетради и делают выводы о наличии/отсутствии антагонистической активности почвенных актиномицетов в отношении кишечной палочки.

## **Задание 2. Определение бактерицидной активности фитонцидов чеснока дисковым методом.**

*Ход работы:*

1. Предварительно в фарфоровой чашке готовят мезгу из дольки чеснока, добавляя 1-2 мл стерильной воды.

2. Чашка с выросшим сплошным газоном кишечной палочки делится на 4 сектора (один – контрольный, остальные опытные).

3. В каждом секторе раскладываются стерильные диски из фильтровальной бумаги (по 3 штуки).

4. В контрольном секторе на каждый диск наносят по 20 мкл стерильной воды.

5. На опытных секторах – по 20 мкл чесночной суспензии.

6. Чашку не переворачивают, ставят в термостат и инкубируют в течение 7-14 дней при температуре 28°C.

7. Антагонистическую активность чеснока отмечают по появлению зон просветления на бактериальном газоне.

8. Результаты опыта зарисовывают в тетради и делают выводы о наличии/отсутствии антагонистической активности фитонцидов чеснока в отношении кишечной палочки.

### ***Контрольные вопросы***

1. Приведите примеры антагонизма в почвенных экосистемах.
2. Какова роль антагонизма в почвенных экосистемах для урожайности сельскохозяйственных культур?
3. Что такое высеивание бактериальной культуры сплошным газоном?
4. Изложите суть дискового метода для оценки противомикробной активности.

## **Лабораторная работа № 12**

### **Изучение процесса трансформации отходов агропромышленного комплекса микроорганизмами и их участие в биоремедиации загрязненных почв**

Непригодная для кормовых целей солома представляет собой отход агропромышленного комплекса, нуждающийся в утилизации. Перспективным направлением может быть использование такой соломы для получения гумуса [1, 3, 7, 13]. Основным источником гумуса в почве являются пожнивные остатки и навоз, которые не всегда покрывают потребность растений в органических веществах. Выход гумуса при внесении соломы в почву зависит от ряда факторов: типа почвы, добавления минерального азота и степени аэрации почвы. При аэробном разложении соломы выход гумуса выше, чем в анаэробных условиях.

Загрязнение почвы из-за способности адсорбировать, накапливать загрязнение и отсутствия способностей быстрого и полного самоочищения – важнейшая проблема защиты среды обитания. Широкая механизация сельского хозяйства приводит к загрязнению сельскохозяйственных земель значительным количеством углеводородов. Керосин и бензин, используемые в качестве топлива, а также аварийные разливы нефти попадают в почву, нарушая ее свойства и делая невозможным использование таких земель для дальнейшего сельскохозяйственного использования. Попадание в почву

парафинов (твердых фракций нефтепереработки) приводит к закупориванию пор почвы, нарушает влагообмен и дыхание почвы [1, 3, 23]. Процесс восстановления разрушенных таким образом земель является многостадийным и длительным, включает в себя механическую, химическую и биологическую очистку. Углеводородные соединения могут быть трансформированы в менее токсичные формы с участием микроорганизмов.

**Цель работы:** ознакомиться с микробиоценозами, участвующими в разложении отходов сельского хозяйства и биоремедиации нефтезагрязненных земель.

**Задачи:**

1. В лабораторных условиях изучить процесс трансформации растительных остатков в гуминовые вещества и сменяющиеся при этом микробиоценозы;

2. Изучить процесс разложения парафина почвенными микроорганизмами в лабораторных условиях.

**Материалы и оборудование:** чашки Петри, пробирки, колбы, элективные среды, солома, парафин, спиртовка, автоматические пипетки и наконечники, микроскоп и все необходимое для микроскопирования.

**Задание 1. Изучение процесса трансформации органических растительных остатков в гуминовые вещества и соответствующей смены микробиоценозов.** Опыт закладывают в чашках Петри на гелевых пластинах, что обеспечивает хорошую аэрацию и имитирует поверхностное внесение соломы в почву.

*Ход работы:*

1. Отмытые от следов хлора гелевые пластины пропитывают 3 мл среды Виноградского без источников азота и углерода.

2. В качестве единственного источника углерода на поверхность пластины помещают 1 г абсолютно сухой измель-

ченной соломы и добавляют к ней 1 мл почвенной суспензии разведения  $10^{-2}$ .

3. Количество чашек рассчитывают исходя из планируемых сроков анализа результатов опыта (в рамках длительности изучаемой дисциплины выбираем 15-45 суток, т.е. 6 чашек по 2 определения на 15, 30, 45 сутки; в этот промежуток времени уже возможно оценить изменение качественного состава микробиоценоза).

4. Периодически через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 210, 270 и 360 сут инкубации вынимают по 2 чашки для микробиологического анализа.

5. Сроки проведения анализов приурочены ко времени разложения отдельных химических компонентов соломы (экстрактивных межклеточных веществ, целлюлозы, лигнизированной целлюлозы и лигнина). В последние сроки анализов (начиная со 150 сут) определяют содержание гумуса – фульвокислот и гуминовых кислот, например, по методу Тюрина.

6. Из отбираемых чашек готовятся суспензии и высеваются на селективные среды: сапротрофные бактерии на МПА (активно растут на 30-60 суток инкубации), грибы – на сусло-агар (появляются после 15 суток инкубации). Целлюлозоразрушающие бактерии определяются на среде Гетчисона на 30-90 суток разложения соломы.

7. Проводят визуальную оценку колоний и микроскопирование. Результаты наблюдений описывают в тетради в виде таблицы 3:

*Таблица 3*

Изменение микробиоценоза, разлагающего солому,  
в ходе культивирования.

Время, сут	Морфология колоний на чашках	Морфология клеток на препаратах
15		
30		
45		

## **Задание 2. Выделение смешанной культуры микроорганизмов, окисляющих парафин.**

*Ход работы:*

1. Расплавленную агаризованную селективную среду разливают в чашки Петри, одновременно вносят 3-4 капли стерильного расплавленного парафина (в качестве источника углерода).

2. После охлаждения на поверхности образуются островки парафина в виде тонких пленок.

3. Инокулятом служит почвенная суспензия с нефтезагрязненных участков ( $\frac{1}{3}$  чайной ложки почвы на 30 мл стерильной водопроводной воды в колбе на 100 мл).

4. Суспензия наносится крупными каплями на островки парафина.

5. Чашки не переворачивают, помещают в термостат на 7-14 дней при температуре 28°C. Микробы, способные окислять парафин, обнаруживаются в виде наростов на парафиновых пленках.

6. Мазки, полученные из смешанных культур, микроскопируют.

7. В тетради описывают характер роста микроорганизмов на чашках Петри, зарисовывают и описывают микроскопированные препараты.

### ***Контрольные вопросы***

1. Какова роль гумуса в плодородии почвы?
2. Что является источником гумуса в почве?
3. Какова роль микроорганизмов в гумусообразовании?
4. Назовите причины и последствия загрязнения почвы продуктами нефтепереработки.
5. Какова общая схема биоремедиации нефтезагрязненных земель?
6. На чем основано применение микроорганизмов в очистке земель от разливов нефти?

### ***Вопросы для текущего контроля***

**Коллоквиум 4.** Микробиологическая оценка качества сельскохозяйственных кормов и биоудобрений на основе штаммов микроорганизмов, использование микроорганизмов для борьбы с фитопатогенами, утилизация отходов агропромышленного комплекса, биоремедиация.

1. Эпифитные микроорганизмы ризосферы и филлосферы. Функции в симбиозе с растением.

2. Представители эпифитной микрофлоры зерна.

3. Факторы, влияющие на доброкачественность зерна. Причины и последствия термогенеза зерна.

4. Участие микроорганизмов в силосовании, реакции молочно-кислого брожения. Определение микробиологических показателей качества силоса.

5. Удобрения на основе штаммов микроорганизмов, повышающих плодородие почвы. Азотобактерин, ризоторфин, нитрагин. Механизм действия в почве. Критерии качества биопрепаратов по количеству жизнеспособных клеток.

6. Роль микроорганизмов в деструкции остающихся в почве и на её поверхности пожнивно-корневых остатков сельскохозяйственных культур. Биопрепараты и агротехнические приёмы для ускоренного разложения соломы.

7. Антагонистические отношения в микробных сообществах и их роль в защите растений от фитопатогенов. Продукция антибиотиков и противомикробных соединений почвенными грибами.

8. Выделение консорциумов и чистых культур микроорганизмов, способных к деструкции углеводов. Состав элективных сред и условия культивирования.

9. Получение биогаза, общие условия протекания реакций, участвующие микроорганизмы, схемы биореакторов.

10. Биоиндикация в почве и биосенсоры на основе почвенных микроорганизмов.



## РАЗДЕЛ 2. АГРОХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ

### Лабораторная работа №1

#### Разделение фотосинтетических пигментов методом бумажной хроматографии

Фотосинтез происходит в хлоропластах, которые включают систему ламинарных двойных мембран – тилакоидов, образованных внутренней мембраной. В тилакоидах осуществляется световая фаза фотосинтеза – световая энергия солнечных лучей преобразуется в энергию АТФ, а биохимические реакции восстановления  $\text{CO}_2$  и синтеза углеводов происходят в межтилакоидном пространстве. В мембранах тилакоида содержатся пигменты:

зеленые пигменты – хлорофилл *a* и хлорофилл *b*;

желтые пигменты – каротиноиды, представленные каротинами и ксантофиллами [8].

Метод хроматографического разделения хлорофиллов был впервые разработан русским физиологом Михаилом Семеновичем Цветом и представлен в магистерской диссертации «Физико-химическое строение хлорофильного зерна», защита которой состоялась в 1901 г. в Казанском университете.

Метод бумажной хроматографии основан на распределении пигментов между целлюлозой хроматографической бумаги и подвижной фазой – растворителями. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движутся растворители, молекулы пигментов, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с коэффициентом распределения. Чем выше растворимость пигмента в подвижной фазе, тем дальше он продвигается по бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

Хроматографирование на бумаге выполняют восходящим и нисходящим способами. При восходящей хроматографии бумажную полосу подвешивают вертикально; при этом нижний ее конец, на который нанесена смесь пигментов, погружают в растворитель. По мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение растворенных веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы со смесью пигментов, нанесенных недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, который размещают в верхней части камеры. Нижний конец бумаги располагают так, чтобы он не касался налитого на дно камеры растворителя. В результате действия капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает передвигаться вниз по бумажной полосе, в результате чего смесь разделяется. Нисходящую хроматографию как более простую применяют чаще.

Хроматографирование выполняют в герметично закрытых сосудах, где поддерживают насыщенную парами растворителей атмосферу, что предотвращает их испарение с бумаги. Для эффективного разделения пигментов толщина бумаги должна быть равномерной, а сама бумага – обладать достаточной плотностью. При хроматографировании получают пять полос пигментов, хорошо отделенных друг от друга, в такой последовательности (от стартовой линии): хлорофилл b, хлорофилл a, виолаксантин, лютеин и каротины.

**Цель работы:** ознакомиться с техникой проведения восходящей бумажной хроматографии.

**Задачи:**

1. Приготовление вытяжки из листьев зеленых растений;
2. Проведение разделения фотосинтетических пигментов методом восходящей бумажной хроматографии.

**Материалы и оборудование:** листья растений, ацетон, бензин, бензол, хлороформ, изопропиловый спирт, хлорид

натрия (насыщенный раствор), сульфат натрия прокаленный, вазелин,  $\text{CaCO}_3$ , кварцевый песок, весы, ножницы, ступки с пестиками, пробирки или колбочки на 25 мл, воронки, фильтры, фарфоровые чашки, пипетки, хроматографические колонки, полоски хроматографической бумаги размером 3x25 см, вентилятор или фен, штативы для пробирок, предметные стекла, линейки, карандаши.

### **Задание 1. Получение вытяжки.**

*Ход работы:*

1. Для анализа отбирают зеленые листья. Величина навески может меняться в зависимости от содержания пигментов.
2. Отвешенную пробу быстро измельчают ножницами, переносят в фарфоровую ступку и тщательно растирают с чистым кварцевым песком или толченым стеклом. Предварительно в ступку вносят немного  $\text{CaCO}_3$  для нейтрализации кислот клеточного сока.
3. Затем приливают 3-4 мл ацетона и продолжают растирать.
4. Полученный экстракт сливают по палочке в сухую чистую колбочку на 25 мл.

### **Задание 2. Разделение пигментов.**

*Ход работы:*

1. Полученный экстракт пигментов наливают в фарфоровую чашку. Берут полоску хроматографической бумаги размером 3x25 см и на один из концов пипеткой наносят 0,5 мл экстракта пигментов (в виде узкой полосы).
2. Для анализа необходим сравнительно большой объем раствора, поэтому наносить раствор надо в несколько приемов: каждую следующую порцию после подсушивания предыдущей в токе воздуха от вентилятора или фена.
3. После этого погружают кончик бумажной полоски в ацетон, чтобы все пигменты поднялись на 1-1,5 см.

4. Высушив полоску до полного исчезновения запаха ацетона, ее помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру таким образом, чтобы его нижний конец был опущен в смесь растворителей на 1 см, а края не касались стенок (рис. 11).

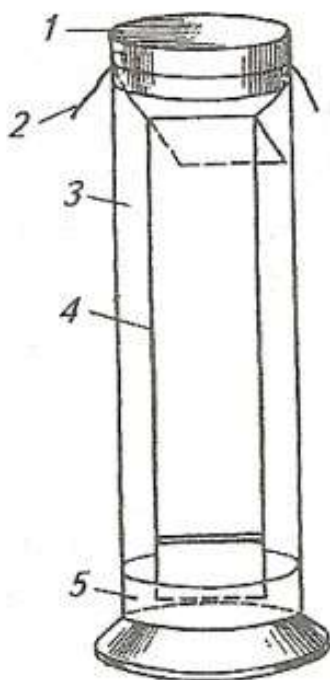


Рис. 11. Общий вид сосуда для восходящей хроматографии: 1 – корковая пробка; 2 – нитка; 3 – стеклянный сосуд; 4 – хроматографическая бумага; 5 – смесь растворителей.

Хроматографическая камера представляет собой цилиндр, на дно которого налита смесь растворителей «бензин:бензол» в отношении 1:2. Цилиндр плотно закрывают крышкой.

5. Через 45 мин наблюдается разделение пигментов, которые располагаются следующим образом (от места нанесения вытяжки): хлорофилл *b*, хлорофилл *a*, виолаксантин, лютеин, каротины.

6. Хроматограмму вынимают из цилиндра и просушивают при помощи вентилятора или фена. Затем обводят простым карандашом зоны с соответствующими пигментами.

7. Вклеивают полученную хроматограмму в тетрадь, подписывают пигменты и делают вывод о причинах разделения пигментов на бумаге.

### ***Контрольные вопросы***

1. В каких органах растений происходит фотосинтез, какие органеллы при этом задействованы?
2. Назовите фотосинтетические пигменты зеленых растений.
3. На каком принципе основан метод бумажной хроматографии?
4. Назовите способы проведения бумажной хроматографии.
5. Какие необходимые условия нужно соблюдать для разделения пигментов?

## **Лабораторная работа № 2**

### **Химические свойства пигментов листа**

По химической природе хлорофиллы представляют собой сложные эфиры дикарбоновой кислоты хлорофиллина и двух спиртов – метилового ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) и фитола ( $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{OH}$ ) [8-10]. В центре молекулы хлорофилла располагается атом магния, соединенный с азотом четырех пиррольных колец двумя основными и двумя дополнительными связями (металлорганическая связь).

Каротиноиды представляют собой производные непредельного углеводорода изопрена  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ . Они имеют конъюгированные связи и также являются фотоактивными пигментами. Эмпирическая формула каротина –  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ .

Ксантофиллы – кислородные производные каротина тетратерпены, которые содержат гидроксильную группу и поэтому легко растворяются в спирте. Пигменты растворимы во многих органических растворителях, но не растворимы в воде [8, 9].

**Цель работы:** ознакомиться с особенностями химического строения фотосинтетических пигментов зеленых растений.

### **Задачи:**

1. Получить спиртовую вытяжку пигментов из листьев зеленых растений;
2. Провести разделение фотосинтетических пигментов по Краусу;
3. Провести реакцию омыления хлорофилла щелочью;
4. Изучить химические свойства феофитина.

**Материалы и оборудование:** высушенные или свежие листья, этиловый спирт, бензин, ступки с пестиками, штативы с пробирками, воронки, фильтры, 20 %-ный раствор NaOH, 10 %-ная соляная кислота, уксуснокислая медь или цинк, спиртовка, спички.

**Задание 1. Получение спиртовой вытяжки пигментов.** Обычно пигменты легко извлекаются из сухих или свежих листьев полярными растворителями (спирт, ацетон), которые разрушают связь хлорофиллов и ксантофиллов с липопротеидами пластид и тем самым обеспечивают их полное экстрагирование.

#### *Ход работы:*

1. Листья (2-3 г) растереть в фарфоровой ступке с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя 3-5 мл этилового спирта.
2. Для нейтрализации кислотности можно добавить щепотку растертого мела. Отфильтровать полученную вытяжку через складчатый фильтр или вату.
3. Оставшуюся в ступке массу повторно растирают с небольшим количеством спирта и отфильтровывают в ту же пробирку.
4. Полученный фильтр содержит зеленые и желтые пигменты, но из-за преобладания хлорофиллов имеет интенсивно зеленую окраску.

**Задание 2. Разделение пигментов по Краусу.** Метод основан на различной растворимости пигментов в спирте и

бензине. Эти растворители при сливании не смешиваются и образуют два слоя – верхний бензиновый и нижний спиртовой.

*Ход работы:*

1. В чистую пробирку налить 2-3 мл спиртовой вытяжки пигментов и добавить двойное количество бензина.

2. Закрывать пробирку пробкой и несколько раз сильно встряхнуть, чтобы перемешать содержимое, а затем дать содержимому отстояться.

3. Произойдет расслоение смеси: в верхний бензиновый слой зеленого цвета перейдут хлорофиллы и каротин, а ксантофиллы, которые не растворяются в бензине, остаются в нижнем спиртовом слое.

4. Если разделение пигментов произошло не совсем чисто и нижний ксантофилловый слой сохраняет зеленоватое окрашивание, в раствор добавляют 2-3 капли дистиллированной воды и вновь встряхивают.

5. При помутнении ксантофиллового слоя следует прилить в пробирку немного этилового спирта и снова встряхнуть ее.

6. Зарисовать результат опыта цветными карандашами с указанием слоев и пигментов в них.

**Задание 3. Омыление хлорофилла щелочью.** Обработывая хлорофилл щелочью, можно вызвать омыление эфирных групп, то есть отщепление остатков метилового спирта и фитола, и осаждение образующейся при этом соли хлорофиллиновой кислоты в раствор спирта. Соль хлорофиллиновой кислоты сохраняет зеленую окраску и оптические свойства хлорофилла, но отличается большей гидрофильностью. В верхнем бензиновом слое остается каротин, придавая ему желтовато-оранжевую окраску.

*Ход работы:*

1. В пробирку налить 1-2 мл спиртового раствора пигментов и несколько капель 20 %-ного раствора щелочи или несколько гранул щелочи, перемешать.

2. Прилить равный объем бензина и взболтать содержимое, дать отстояться.

3. Произойдет разделение содержимого пробирки на два слоя, но теперь зеленым будет нижний спиртовой слой, а бензиновый – желтым.

4. Зарисовать пробирку с образовавшимися слоями и указать распределение пигментов.

**Задание 4. Получение феофитина и восстановление металлорганической связи.** Хлорофиллы содержат в порфириновом ядре слабо удерживаемый атом магния. При действии сильной кислоты магний хлорофилла замещается двумя атомами водорода, что приводит к образованию вещества бурого цвета – феофитина. Если на феофитин подействовать солями меди, цинка или ртути, то два протона в порфириновом ядре вновь замещаются на атом металла, и восстанавливается зеленая окраска. Следовательно, цвет хлорофилла связан с наличием металлорганической связи в молекуле.

*Ход работы:*

1. В пробирку наливают 2–3 мл спиртовой вытяжки пигментов и прибавляют 2 капли 10 %-ной HCl.

2. При взбалтывании пробирки зеленая окраска хлорофилла переходит в бурую – образуется феофитин.

3. Затем в пробирку с феофитином добавляют несколько кристалликов уксуснокислой меди или цинка и пробирку осторожно нагревают на спиртовке до начала кипения раствора.

4. Отмечают восстановление зеленой окраски раствора.

5. Описывают результаты проведенных реакций в тетради и делают выводы о химических свойствах пигментов.

**Контрольные вопросы**

1. Какова химическая структура хлорофилов *a* и *b*?
2. В чем заключается особенность химического строения ксантофилов и каратиноидов?



3. Какие особенности химической структуры фотосинтетических пигментов обеспечивают их фотоактивность?

4. Как магний, содержащийся порфириновом в кольце хлорофиллов, участвует в световой фазе фотосинтеза?

### **Лабораторная работа № 3**

#### **Зависимость площади листовой поверхности от типа почвы**

Почвы имеют различный гранулометрический состав, что определяет различные уровни влажности и насыщенности кислорода в разных типах почв. Косвенно, эти факторы оказывают влияние на фотосинтетическую активность растений и, соответственно, на величину образующейся зеленой биомассы [18, 19]. При изучении интенсивности фотосинтеза, дыхания, транспирации в разных условиях чаще всего получаемые величины рассчитывают на единицу листовой поверхности, поэтому возникает необходимость ее измерения.

**Цель работы:** изучить основные методы определения площади листовой поверхности.

#### **Задачи:**

1. Ознакомиться с методом отпечатков и методом высечек как основных приемов определения площади листовой поверхности;

2. Оценить применимость мобильных приложений соответствующего назначения.

**Материалы и оборудование:** образцы почв, семена растений, бумага, линейки, сверла, ножницы, торсионные или аналитические весы.

**Задание 1. Выращивание растений на разных типах почв.** В течение 7-14 дней выращивать растения на разных типах почв до появления значительного количества листьев, пригодных для анализа.

*Важно!!! При проведении данного эксперимента уровень освещенности, температурный режим и режим полива должны быть одинаковыми для всех образцов.*

### **Задание 2. Ознакомление с методом отпечатков.**

Ход работы:

1. Лист растения накладывают на однородную бумагу и обводят контур остро отточенным карандашом.

2. Получив отпечаток листа, определяют его площадь весовым методом. Для этого вырезают бумагу по контуру листовой пластинки и взвешивают на торсионных или аналитических весах.

3. Одновременно из такой же бумаги вырезают квадрат, например площадью  $100 \text{ см}^2$  ( $10 \times 10 \text{ см}$ ), и также определяют его массу.

Площадь исследуемого листа находят по формуле:

$$S = aC/b,$$

где  $a$  – масса контура листа, мг;

$b$  – масса квадрата бумаги, мг;

$C$  – площадь квадрата бумаги,  $\text{см}^2$ .

Описанный метод прост и достаточно точен, но мало-производителен. Кроме того, его практически нельзя использовать при исследовании гофрированных и сложных листьев.

**Задание 3. Ознакомление с методом высечек.** Этот наиболее доступный и продуктивный метод особенно ценен в полевых условиях.

Ход работы:

1. Отбирают среднюю пробу растений, быстро срезают листья и определяют их массу.

2. Затем из каждого листа выбирают пробочным сверлом определенного диаметра несколько высечек, объединяют их вместе и устанавливают массу. Диаметр сверла выбирают

в зависимости от размеров листовой пластинки и ее поверхностной плотности.

3. Площадь листьев определяют по формуле:

$$S=ac/b,$$

где  $a$  – общая масса сырых листьев, г;

$b$  – общая масса сырых высечек, г;

$c$  – общая площадь высечек,  $\text{см}^2$ .

**Задание 4. Использование мобильных приложений для определения площади листа.** С помощью мобильных приложений (Field Area, Leaf-IT и пр.) оценить площадь листовой поверхности растений при выращивании на различных типах почв.

Результаты измерений занести в таблицу 4.

*Таблица 4*

Результаты измерения площади листовой поверхности при выращивании растений на разных типах почв

Тип почвы	Метод измерения площади листовой поверхности		
	Метод отпечатков	Метод высечек	Мобильные приложения

Сделать выводы о влиянии типов почв на площадь листовой поверхности.

**Контрольные вопросы**

1. Для чего нужно определять площадь листовой поверхности?
2. В чем заключается метод отпечатков, каковы его недостатки?
3. Изложите суть метода высечек, его преимущества и недостатки.
4. Каково влияние типов почв на площадь листовой поверхности?

## Лабораторная работа № 4

### Определение чистой продуктивности фотосинтеза растений при выращивании на различных типах почв

На долю органических соединений, создаваемых в ходе фотосинтеза, приходится около 85% общей биомассы растительного организма. Поэтому изменение сухой массы может довольно объективно отражать ассимиляционную деятельность растений [18, 19, 21, 22].

Именно этот показатель положен в основу метода определения «нетто-ассимиляции», или чистой продуктивности фотосинтеза. Чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ) представляет собой прирост сухой массы растений в граммах за определенное время (сутки), отнесенный к единице листовой поверхности ( $m^2$ ). Ее учитывают периодическим отбором проб растений, у которых определяют общую массу, массу отдельных органов и площадь листьев. Для определения ЧПФ с учетом неравномерного нарастания площади листьев используют следующую формулу:

$$\text{ЧПФ} = \frac{(B_2 - B_1)(\ln L_2 - \ln L_1)}{(L_2 - L_1)}$$

где  $B_1$  и  $B_2$  – сухая масса растений в начале и в конце учетного периода;

$(B_2 - B_1)$  – прирост сухой массы за  $n$  дней;

$\ln L_2$  и  $\ln L_1$  – натуральные логарифмы показателей площадей листьев в начале и в конце учитываемого периода;

$n$  – период между двумя наблюдениями, дней.

Уравнение наиболее удовлетворительно выражает зависимость «нетто-ассимиляции» от прироста сухого вещества и динамики нарастания листовой поверхности

Оптимальное время между пробами составляет 7-10 дней, в периоды интенсивного роста растений оно может быть сокращено до 5 дней.

Источник погрешностей метода связан с трудностью отбора проб растений, обусловленной большим разнообразием культур, ценозов и условий произрастания. Невозможно точно учесть и изменения массы подземных частей, которые у некоторых растений служат основным местом накопления пластических веществ. Кроме того, часть фотосинтетически усвоенного углерода расходуется на дыхание и экзоосмос. Наконец, в период физиологической зрелости растений наблюдается стабилизация массы сухого вещества, а с возрастом отмечается даже снижение количества биомассы в результате отмирания части листового аппарата и других органов растения. Однако скорость фотосинтеза у функционирующих листьев может не меняться очень слабо. В данном случае показатель «нетто-ассимиляции» уже не будет отражать реальное состояние фотосинтетической активности растений. Перечисленные обстоятельства необходимо учитывать при использовании рассматриваемого метода.

Метод определения «нетто-ассимиляции» эффективен при использовании фотосинтеза в природных условиях. Он позволяет получать ценный материал для изыскания наиболее рациональных путей повышения продуктивности культурных и естественных ценозов, прогнозирования и программирования урожаев, целесообразного географического размещения сельскохозяйственных растений.

Показатели чистой продуктивности фотосинтеза в природных условиях обычно колеблется от 0,1 до 20 г и более сухого вещества на  $1\text{ м}^2$  площади листьев в сутки: у злаков в фазе интенсивного роста – 40-50, у основных сельскохозяйственных культур при благоприятных условиях – 4-10 г/( $\text{м}^2 \cdot \text{сут}$ ).

**Цель работы:** ознакомиться с методом определения чистой продуктивности фотосинтеза при выращивании растений на разных типах почв.

### **Задачи:**

1. Подготовить культуры растений для анализа.
2. Провести отбор проб для определения сухого вещества в отдельных органах растений и измерения площади листьев;
3. Рассчитать на основе полученных данных чистую продуктивность фотосинтеза.

**Материалы и оборудование:** растения, бюксы или металлические стаканчики, ножницы, бумага, технические и аналитические весы, термостат.

**Задание 1. Выращивание растений на разных типах почв.** В течение 7-14 дней выращивать растения на разных типах почв до появления значительного количества листьев, пригодных для анализа. **Важно!!!** При проведении данного эксперимента уровень освещенности, температурный режим и режим полива должны быть одинаковыми для всех образцов.

**Задание 2. Отбор проб.** На опытных посевах берут пробы растений. Для уменьшения разброса результатов в пробу включают наиболее типичные и однородные для данного посева и фазы развития экземпляры.

**Задание 3. Проведение анализа.** Дальнейшая обработка материала заключается в отборе проб для определения сухого вещества в отдельных органах растений и измерении площади листьев.

#### *Ход работы:*

1. Для нахождения содержания сухого вещества из растительной массы каждой части (%) берут две-три порции материала, помещают в бюксы (или металлические стаканчики), взвешивают и высушивают в термостате при 105°C до постоянной массы.

2. Затем рассчитывают содержимое сухого вещества и устанавливают массу абсолютно сухих частей, а в итоге общую сухую массу растений, взятых для исследования.

3. Площадь листьев определяют по одному из методов, описанных в работе № 3. Определение следует выполнять быстро и только на зеленых листьях.

4. Через 7-10 дней таким же образом вновь отбирают растения и описанные определения повторяют.

5. Чистую продуктивность фотосинтеза рассчитывают по указанной формуле.

Если наблюдения провести в течение вегетации растений, можно получить ценные данные о продуктивности работы листьев в отдельные периоды жизни исследуемой культуры или в зависимости от условий ее произрастания.

6. Результаты опыта записывают в таблицу 5, делают вывод о влиянии разных типов почв на чистую продуктивность фотосинтеза.

*Таблица 5*

Определение чистой продуктивности растений,  
выращенных на разных типах почв

	дата наблюдения				
	тип почвы				
	число растений в пробе				
Сырая масса, г	Стеблей				
	Листьев				
	Соцветий				
	общая				
Сухая масса, г	Стеблей				
	Листьев				
	Соцветий				
	общая				
Площадь листьев, см <sup>2</sup>					
ЧПФ, г/(м <sup>2</sup> ·сут)					

### **Контрольные вопросы**

1. Изложите суть метода определения чистой продуктивности фотосинтеза.
2. В чем заключаются ограничения данного метода?
3. Какова область применения этого метода?

## **Лабораторная работа № 5**

### **Образование сахара и крахмала в зеленых листьях различных сельскохозяйственных культур на свету**

У всех растений – от низших до некоторых высших растений, главным образом двудольных, углеводы, образовавшиеся в хлоропластах в процессе фотосинтеза, немедленно превращаются в крахмал, называемый ассимиляционный [4, 9, 10].

Однако ассимиляционный крахмал представляет собой достаточно лабильную форму и может довольно быстро использоваться в процессах метаболизма или превращаться в ряде органов (семенах, плодах, стеблях, корнях, корневищах) в запасной крахмал.

При этом, в сахаристом листе однодольных растений, например, злаков, крахмал почти не обнаруживается. Сахара здесь представлены в основном сахарозой и различными моносахаридами. Они транспортируются в другие части растений и превращаются здесь в запасной крахмал.

Определить сахара можно с помощью Фелинговой жидкости, в которой содержится окись меди  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ; сахар отнимает от нее кислород, а сам окисляется в глюкуроновую кислоту.  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  превращается в закись меди  $\text{Cu}_2\text{O}$ , который выпадает в виде кирпично-красного осадка.

**Цель:** оценить способность различных растений накапливать сахар и крахмал в листьях.

#### **Задачи:**

1. Подготовить культуры растений;



2. Оценить содержание крахмала в листьях методом крахмальной пробы;

3. Определить содержание редуцирующих сахаров.

**Материалы и методы:** листья лука, гороха/фасоли, злаковых, этиловый спирт, раствор йода в йодистом калии, реактив Фелинга, вода, водяная баня, электроплитка, штатив с пробирками, ножницы, пинцет, лезвие бритвы, препаровальные иглы, сверла, чашки Петри.

**Задание 1. Получение проростков анализируемых сельскохозяйственных культур.** Заблаговременно до проведения данной лабораторной работы посадить и вырастить интересующие сельскохозяйственные культуры.

***Важно!!!** При проведении данного эксперимента уровень освещенности, температурный режим и режим полива должны быть одинаковыми для всех образцов.*

**Задание 2. Проведение крахмальной пробы.**

*Ход работы:*

1. Для того, чтобы определить наличие крахмала в листьях, делают сверлом высечку между жилками листа, помещают ее в пробирку с водой, кипятят 2-3 мин, чтобы убить клетки.

2. Воду сливают, приливают 2-3 мл спирта и вновь кипятят на водяной бане до полного извлечения пигментов (нагревать следует осторожно, т.к. при бурном кипении может произойти выплескивание спирта из пробирки).

3. Далее сливают спирт, размягчают ткань листа, наливая на него небольшое количество воды, т.к. после действия спирта она становится хрупкой.

4. Помещают высечку в чашку Петри и добавляют раствор йода в йодистом калии.

5. Через 3–5 мин раствор сливают и оценивают содержание крахмала в листе по четырехбалльной шкале: иссиня-

черный цвет – 4 балла, темно-синий – 3 балла, светло-синий – 2, голубой – 1, желтый (цвет раствора), отсутствие окраски – 0.

### **Задание 3. Определение редуцирующих сахаров.**

*Ход работы:*

1. Нарезают на мелкие кусочки листья, заполняют ими пробирку на  $\frac{1}{4}$ , заливают небольшим количеством воды и нагревают в кипящей водяной бане не менее 5 мин.

2. Полученную вытяжку фильтруют.

3. Приливают к фильтрату реактив Фелинга (в количестве равном фильтрату) и кипятят 5-7 мин.

4. При наличии моносахаров в пробирке выпадает кирпично-красный осадок оксида меди, количество которого оценивают по 4-балльной системе: обильный кирпично-красный осадок – 4 балла; умеренный осадок – 3 балла; слабое покраснение на дне пробирки – 2 балла; незначительное, едва заметное потемнение на дне пробирки – 1 балл; отсутствие осадка – 0.

5. Результаты опытов заносят в тетради в виде таблицы 6.

*Таблица 6*

#### Определение сахаров и крахмала в зеленых листьях сельскохозяйственных культур

Наименование культуры	Содержание крахмала, балл	Содержание сахаров, балл

#### **Контрольные вопросы**

1. В чем заключается разница между ассимиляционным и запасным крахмалом у растений?

2. Изложите суть методов определения редуцирующих сахаров и крахмальной пробы.

3. В чем заключаются ограничения данного метода?

4. Какие культурные растения не накапливают крахмал в листьях?

## Лабораторная работа № 6

### Определение первичного (ассимиляционного) крахмала в клетках листьев $C_3$ - и $C_4$ -растений

Растения, у которых первый стабильный продукт фотосинтеза представлен трехуглеродной фосфоглицериновой кислотой (ФГК), принято называть  $C_3$ -растениями. Синтез сахаров в фотосинтезе осуществляется у них в цепи реакций, образующих цикл Кальвина. У  $C_3$ -растений во всех фотосинтезирующих клетках функционирует цикл Кальвина и поэтому во всех клетках листа образуется крахмал [4, 9, 18].

У  $C_4$ -растений первичная ассимиляция  $CO_2$  осуществляется в цикле Кальвина и в цикле Хетча-Слека в клетках мезофилла листа. Первыми продуктами этого цикла являются четырехуглеродные органические кислоты (ЩУК), поэтому такие растения принято называть  $C_4$ -растениями. Цикл Кальвина функционирует у них только в клетках обкладки проводящих пучков листа. Поэтому крахмал образуется только в этих клетках, но не в клетках мезофилла [9, 10, 18, 19].

**Цель работы:** ознакомиться с особенностями накопления крахмала у  $C_3$ - и  $C_4$ -растений.

**Задачи:**

1. Приготовить срезы листьев анализируемых растений;
2. Провести окрашивание срезов раствором Люголя и последующее микроскопирование.

**Материалы и оборудование:** микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвия безопасной бритвы, стакан с водой, препаровальные иглы, стеклянные палочки, фильтровальная, кусочки пенопласта или бузины, раствор Люголя, 30% раствор NaOH или KOH, листья  $C_4$ -растений (кукурузы, сорго, амаранта или лебеды) и  $C_3$ -растений (хлорофитума, традесканции), зафиксированные в солнечный день в 70% этаноле (перед фиксацией материал растения выдержать несколько часов на ярком свету).

### **Задание 1. Приготовление срезов листьев.**

*Ход работы:*

1. Продольные и поперечные срезы листьев кукурузы и  $C_4$ -растений делают острым лезвием безопасной бритвы.
2. Для получения поперечных срезов используют кусочки бузины или пенопласта.
3. Срезы помещают на предметное стекло в каплю 30% раствора щелочи для их просветления.
4. Через 10-15 мин. щелочь отсасывают фильтровальной бумагой, срезы промывают водой и добавляют каплю раствора Люголя.
5. Затем срезы накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом при малом и при большом увеличении.

**Задание 2. Микроскопирование срезов.** Изучая срезы, обращают внимание на локализацию крахмала в клетках листа. У кукурузы крахмал локализуется в клетках обкладки проводящих пучков и в клетках устьиц. В остальных клетках мезофилла, расположенных между жилками, крахмала нет. Поэтому на продольном срезе проводящие пучки с обкладкой четко выделяются как темные полосы, а на поперечном срезе выглядят в виде черной короны (так называемая кранцанатомия), окружающей неокрашенные ткани ксилемы. В листьях  $C_3$ -растений крахмал находится во всех клетках мезофилла, а также в замыкающих клетках устьиц. Неокрашенными остаются только клетки эпидермы и сосудистые пучки.

Зарисовать в тетради полученные срезы растений.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем особенность фотосинтеза  $C_3$ - и  $C_4$ -растений?
2. Как это отражается на структурных особенностях листа и областях накопления крахмала?

### **Вопросы для текущего контроля**

#### **Коллоквиум 5. Фотосинтез.**

1. У каких листьев, световых или теневых, толщина мезофилла и содержание хлорофилла выше и почему?
2. С помощью каких приемов можно отделить ксантофиллы, каротины от других пигментов?
3. При помощи какой реакции можно доказать, что атом металла придает хлорофиллу зеленый цвет и что хлорофилл – сложный эфир?
4. Спиртовая вытяжка хлорофилла несколько дней стояла на хорошо освещенном окне. Что произошло с пигментами?
5. На каком свете, только на красном или на красном и синем, фотосинтез будет протекать более активно?
6. После повторных заморозков осенью трава приобретает буровато-оливковую окраску. Как объяснить изменение окраски? Жизнеспособны ли такие растения?
7. Почему при хроматографии на бумаге в бензине каротин движется с фронтом растворителя, а ксантофиллы расположены ниже?
8. Почему при хроматографии на бумаге в бензине хлорофилл *a* находится выше хлорофилла *b*?
9. При хроматографии пигментов на бумаге в бензине на старте остается иногда некоторое количество зеленого пигмента. Что это за пигмент? Почему в отличие от других он не двигается?
10. При хроматографии смеси пигментов на бумаге в бензине оказалось, что полосы ксантофиллов, хлорофилла *a* и *b* плохо отделены одна от другой. Какой растворитель следует добавить к бензину, чтобы добиться разделения полос, почему?
11. Назвать желтые пигменты листа, каковы особенности их окраски?
12. Каково отличие окраски хлорофилла *a* и *b*?
13. Как доказать необходимость света, углекислого газа для процесса фотосинтеза?
14. В отличие от большинства растений у суккулентов устьица обычно закрыты в течение жаркого летнего дня и открываются только ночью. Как у них протекает фотосинтез, почему?
15. Почему такие растения, как сорго, кукуруза, сахарный тростник, могут успешно фотосинтезировать при закрытых в дневное время устьицах?
16. Почему у многих растений в жаркие полуденные часы наблюдается не поглощение, а выделение CO<sub>2</sub>?
17. Рассчитайте листовую продуктивность фотосинтеза, если начальная биомасса растений с 1 м<sup>2</sup> составляет 42,5 г, а конечная –

412,3 г, время роста растений 10 дней. Площадь листьев растений в начале и в конце исследований равна 1,3 и 8,4 м<sup>2</sup> соответственно.

18. Каковы особенности образования ассимиляционного крахмала и сахаров в листьях у однодольных и двудольных растений и с чем это может быть связано?

19. Каково значение доступности воды для протекания фотосинтеза?

20. Какие факторы могут повлиять на интенсивность фотосинтеза и почему?

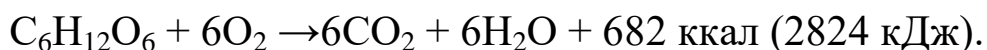
21. Какие показатели характеризуют светолюбие и теневыносливость листьев?

22. Что такое листовая мозаика? У каких растений наблюдается это явление – у светолюбивых или теневыносливых?

## **Лабораторная работа № 7**

### **Определение интенсивности дыхания по количеству выделения CO<sub>2</sub>**

Все жизненные процессы, протекающие в растительном организме, связаны с затратой энергии. Рост, питание, размножение, обмен веществ, процессы синтеза и распада органических веществ, прорастание, передвижение и поглощение веществ и т.д. связаны с затратой энергии. Это обусловлено тем, что живая клетка представляет собой открытую энергетическую систему и жизненные процессы в ней протекают только при условии притока энергии извне. Для поддержания жизненных процессов у растений имеется 2 источника энергии: солнечная энергия, усваиваемая и запасаемая в процессе фотосинтетического фосфорилирования в АТФ. А также запасаемая в образуемых органических веществах в процессе фотосинтеза, в основном в углеводах, энергия которых используется растением в процессе их окисления, т.е. в процессе дыхания, при котором в митохондриях также она запасается в АТФ [8, 9, 21, 22]. Поэтому дыхание является процессом противоположным фотосинтезу и выражается следующим суммарным уравнением:



Наиболее общим показателем скорости окисления является интенсивность дыхания (ИД), о котором можно судить по поглощению кислорода, количественному выделению углекислого газа и окисленного органического вещества. Интенсивность дыхания и его энергетическая эффективность зависит от физиологического состояния растений, внешних условий. В свою очередь, интенсивность дыхания может, в известной мере, быть показателем уровня физиологической активности тканей исследуемого растения.

**Цель работы:** освоение метода определения интенсивности дыхания растений по учету выделяемого углекислого газа как одного из показателей физиологического состояния растительных тканей.

**Задачи:**

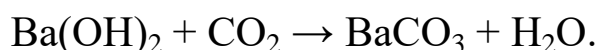
1. Подготовить растительный материал для анализа;
2. Определить интенсивность дыхания.

**Материалы и оборудование:** растительный материал различных частей растений или их различного физиологического состояния (проросшие и непроросшие семена, молодые и старые листья, листья и побеги, распускающиеся почки и побеги, цветки и листья и т.д.), 0,1 н. раствор барита, 0,1 н. раствор соляной или щавелевой кислоты, 1% раствор фенолфталеина, весы, конические колбы на 250 мл с резиновыми пробками, и резиновые пробки с отверстием для титрования, нитки, марлевые мешочки или марлевые салфетки 15×15 см, бюретки для титрования, стеклянные воронки.

**Задание 1. Подготовка растительного материала.** Заблаговременно необходимо подготовить растения для анализа. В зависимости от поставленных задач это могут быть одинаковые растения, выращенные на разных типах почв,

разные виды сельскохозяйственных культур растений, выращенных в одинаковых условиях, или их органы и части, и т.д.

**Задание 2. Учёт количества  $\text{CO}_2$ , выделяемого органами растения при дыхании и поглощении его баритом.** Процесс поглощения диоксида углерода баритом можно записать в виде уравнения



*Ход работы:*

1. Для этого в конические колбы на 250 мл с подогнанными резиновыми пробками по количеству изучаемых объектов быстро залить из колбы сифоном с зажимом по 10 мл 0,1 н раствора  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  и внести по 2 капли фенолфталеина, сразу закрыть плотно резиновыми пробками.

2. Отвесить по 5-10 г исследуемого материала: молодые и старые листья, распускающиеся почки и побеги, проросшие и не проросшие семена, цветки и листья и др., поместить их в маршевые мешочки или марлевые салфетки  $15 \times 15$  см, завязав их ниткой, оставив длинный конец.

3. Подвесить мешочки в колбы так, чтобы они не касались раствора барита, закрепив их за конец нитки, прижав к стенке колбы пробкой.

4. Записать время для каждой колбы, когда они были закрыты пробкой. При использовании корковых пробок, необходимо заливать их парафином.

5. Аналогично подготовить и контрольную колбу, в которую тоже налить 10 мл барита и 2 капли фенолфталеина, закрыть плотно пробкой.

6. Колбы с объектами, содержащими хлорофилл, необходимо на все время опыта поместить в темноту для исключения процесса фотосинтеза.



7. Время от времени колбы следует осторожно покачивать, чтобы разрушать пленку  $\text{BaCO}_3$ , препятствующую полноте поглощения  $\text{CO}_2$ , не допуская попадания ни одной капли раствора на мешочек с материалом.

8. Через 30 минут вынуть материал, быстро закрыть колбу пробкой и отметить время окончания опыта.

9. Провести титрование оставшейся щелочи, приливая из бюретки каплями через отверстие в пробке 0,1 н щавелевую или соляную кислоту до исчезновения розового окрашивания. Чтобы избежать уменьшения концентрации раствора барита из-за поглощения углекислоты из воздуха, следует провести титрование колб, используя для титрования пробку с отверстием.

10. Контрольную колбу можно титровать через 20 минут после наливания раствора барита.

11. Результаты опыта записывают в таблицу 7, делают вывод об интенсивности в зависимости от действия изучаемых факторов.

12. Интенсивность дыхания определяется количеством выделенного мг  $\text{CO}_2$  на г растительной массы за час (мг  $\text{CO}_2/\text{г}\cdot\text{ч}$ ), по формуле:

$$\text{ИД} = (a - b) \cdot K \cdot 2,2 \cdot \frac{60}{p \cdot t},$$

где  $a$  – количество 0,1 н соляной или щавелевой кислоты, израсходованной на титрование барита в контрольной колбе;

$b$  – результат титрования опытной колбы;

$K$  – поправка к титру соляной или щавелевой кислоты;

2,2 – количество мг  $\text{CO}_2$ , эквивалентное 1 мл 0,1н соляной или щавелевой кислоты;

$p$  – масса растительного материала, г;

$t$  – продолжительность опыта в минутах;

60 – для перевода времени на час.

Таблица 7

## Результаты определения интенсивности дыхания (ИД)

	Объект		
	навеска, г		
	объем $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , мл		
Время опыта, мин	Начало		
	Конец		
	продолжительность опыта, мин		
Расход $\text{HCl}$ , мл	Контроль		
	Опыт		
	поправка к титру $\text{HCl}$		
	ИД, $\text{мг CO}_2/\text{г}\cdot\text{ч}$		

**Контрольные вопросы**

1. Каковы процессы в тканях растений, приводящие к получению энергии?
2. Напишите общие уравнения фотосинтеза и дыхания. Как взаимосвязаны эти процессы?
3. Что такое интенсивность дыхания и от каких факторов она может зависеть?
4. В чем суть метода определения интенсивности дыхания по выделению углекислого газа?

**Лабораторная работа № 8****Сравнение дыхательного коэффициента  
в прорастающих семенах различных культурных растений**

Дыхательный коэффициент (ДК) – это объемное или молярное отношение  $\text{CO}_2$ , выделенного при дыхании, к поглощенному за это время  $\text{O}_2$  ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ). ДК служит характеристикой калорийности субстрата, т.е. его энергоемкости. Степень энергоемкости зависит от вида дыхательного субстрата и степени его окисленности. При дыхании могут использоваться жиры, белки, углеводы и органические кислоты [9, 10, 21, 22].

Чем более окислен исходный субстрат, тем меньше поглощается кислорода воздуха, а значит и меньше выделяется

энергии. Поэтому, при нормальном доступе кислорода величина ДК зависит от субстрата дыхания.

Если в процессе дыхания используется углеводы, то ДК равен единице. Это видно из уравнения  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6H_2O + 6CO_2$ , в котором отношение  $6CO_2/6O_2$  равно 1.

При окислении жирных кислот и белков ДК будет меньше единицы. Они менее насыщены кислородом, и на их окисление идет больше  $O_2$ . Например, окисление масляной кислоты  $CH_3-CH_2-CH_2-COOH + 5O_2 \rightarrow 4H_2O + 4CO_2$ , имеет отношение  $4CO_2/5O_2$  равное 0,8, т.е. меньше единицы.

При использовании более окисленных органических кислот, например щавелевоуксусной кислоты, ДК больше единицы:  $C_4H_4O_5 + 2,5O_2 \rightarrow 2H_2O + 4CO_2$ , соотношение  $4CO_2/2,5O_2$  равно 1,6.

Поэтому, как более калорийный субстрат для дыхания, в качестве запасного вещества жиры составляют более 80% видов растений. Жиры обладают и другими преимуществами: низкий удельный вес, не гигроскопичность.

Однако семена различных сельскохозяйственных культур отличаются качественным составом запасных веществ. Число видов растений, образующих семена с высоким содержанием жира (свыше 20%), исключительно велико. Из культурных растений сюда относятся различные представители сложноцветных (подсолнечник, сафлор), крестоцветных (различные виды горчиц, рапс, рыжик), тыквенных (тыква, кабачок, арбуз), молочайных (клещевина), льновых (лен масличный и долгунец), губоцветных (перилла), бобовых (арахис, соя, некоторые виды люпина) и многие другие.

В семенах злаков содержание крахмала значительно превышает содержание белка, вследствие чего они могут рассматриваться как истинно крахмалистые семена. К этой же группе следует отнести и семена гречихи, содержащие около 70% крахмала и всего 10% белка. В зерновках злаков

содержание крахмала в зависимости от вида растения варьирует от 45 до 75% от сухого веса, а белка – от 10 до 15%. Семена бобовых, наряду с крахмалом, содержат также значительное количество белка. Так, семена люпина желтого, сои, арахиса, содержат от 30 до 55% белка. Соответственно, при прорастании семян различных сельскохозяйственных культур следует ожидать различной интенсивности дыхания.

**Цель работы:** освоение метода определения коэффициента дыхания в наклюнувшихся семян различных культурных растений.

**Задачи:**

1. Подготовить наклюнувшиеся семена различных культурных растений;
2. Определить коэффициент дыхания.

**Материалы и оборудование:** наклюнувшиеся семена, 20%-ный раствор КОН, окрашенная вода в химическом стаканчике. Прибор, состоящий из пробирки с хорошо притертой резиновой пробкой, в которую вставлена изогнутая под прямым углом тонкая стеклянная трубка; горизонтальное колено трубки градуируют, прикрепляя к ней при помощи резиновых колечек полоску миллиметровой бумаги. Штатив для пробирок, фильтровальная бумага, фарфоровые чашки, пинцеты, пипетки, секундомер или песочные часы.

**Задание. Определение коэффициента дыхания.**

*Ход работы:*

1. Помещают в пробирку (примерно до половины) наклюнувшиеся семена, закрывают ее пробкой, в которую вставлена изогнутая градуированная трубка.

2. Прежде вводят в трубку каплю окрашенной жидкости, для этого погружают наружный конец трубки в окрашенный раствор и зажимают пальцем противоположный конец и вставляют, держа трубку горизонтально, в пробирку (рис.12).

3. Во время опыта обязательно поддерживают постоянную температуру. Для этого ставят прибор в штатив или колбу и не нагревают руками.

4. Отмечают положение внутреннего мениска капли и засекают время по секундомеру. После пятиминутной экспозиции измеряют расстояние, пройденное каплей, и делают второй отсчет, а еще через 5 минут – третий.

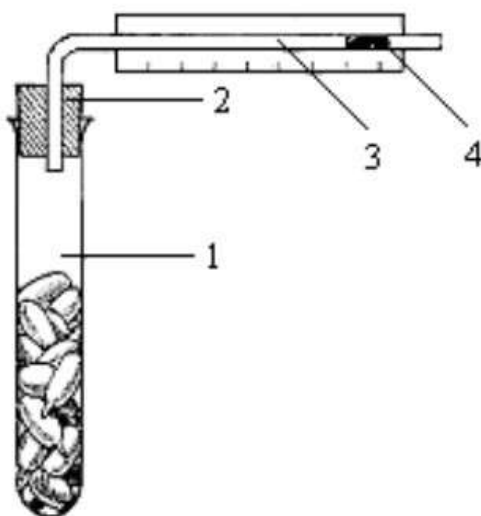


Рис. 12. Прибор для определения дыхательного коэффициента: 1 – пробирка; 2 – резиновая пробка; 3 – трубка с измерительной шкалой; 4 – капля окрашенной воды

5. Вычисляют среднее расстояние, пройденное каплей за 5 минут (А), которое соответствует разности между объемами поглощенного кислорода и выделенной углекислоты.

6. Открывают пробку с семенами и вкладывают в нее пинцетом свернутую в кольцо полоску фильтровальной бумаги, смоченную 20%-ным раствором едкого натра. Закрывают пробирку пробкой с трубкой с каплей окрашенной жидкости. Отмечают положение мениска при пятиминутных интервалах и вычисляют среднюю величину (В).

7. Обозначают объем поглощенного кислорода через В, т.к. весь выделяемый диоксид поглощается щелочью, а объем

выделенной углекислоты определяют через А, как разницу между поглощенным O<sub>2</sub> и выделенным CO<sub>2</sub>.

8. Зная величины А и В, находят дыхательный коэффициент:  $A = O_2 - CO_2$ ;  $B = O_2$ ;  $CO_2 = B - A$ .

9. Затем дыхательный коэффициент (ДК) вычисляют по формуле:

$$ДК = \frac{CO_2}{O_2} = \frac{B-A}{B}$$

10. Результаты в тетради заносят в таблицу 8 и делают вывод о разнице в КД у семян с различным качественным составом запасных веществ.

*Таблица 8*

Результаты определения дыхательного коэффициента  
в семена различных культурных растений

		Отсчеты, мм за 5 мин				
	Условия опыта	1	2	3	среднее	ДК
Семена культуры 1	без щелочи (А)					
	с щелочью (В)					
Семена культуры 2	без щелочи (А)					
	с щелочью (В)					

**Контрольные вопросы**

1. Что такое дыхательный коэффициент?
2. Как меняется дыхательный коэффициент в зависимости от окисленности исходного субстрата?
3. Какие группы семян выделяют по качественному составу запасных веществ? Назовите представителей.

## Лабораторная работа № 9

### Изучение активности дыхательных ферментов в тканях культурных растений

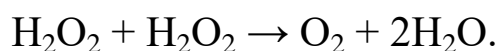
Дыхание (а по сути, окислительно-восстановительные превращения субстрата) происходит с участием комплексной системы ферментов [8-10], которые можно разделить на несколько групп.

*Дегидрогеназы (дегидразы)*, катализирующие дегидрирование субстрата, т.е. отнятие водорода и электрона от субстрата дыхания. Растительные дегидрогеназы можно обнаружить с помощью некоторых химических соединений, например, метиленовая синь, имеющих в окисленном состоянии цветные молекулы. В восстановленном состоянии (т.е. присоединив водород) молекулы этих веществ становятся бесцветными. Эти соединения используются для обнаружения дегидраз.

*Пероксидазы* играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в растительном организме при дыхании и брожении, т.е. она является дыхательным ферментом. Она способна окислять органические соединения лишь с помощью каких-либо органических перекисей. В растениях перекись водорода образуется под действием оксидаз (полифенолоксидаза, монофенолоксидаза). Пероксидаза вместе с перекисью водорода образует комплексные соединения, в результате чего перекись активируется и приобретает способность действовать как акцептор водорода. Она может окислять полифенолы и некоторые органические амины. Например, под действием пероксидазы и перекиси водорода гидрохинон переходит в интенсивно буро окрашенный хинон:



Фермент *каталаза* относится к классу *оксидоредуктаз*. Он представляет собой железопротеид. Небелковая часть, как у пероксидазы, представлена железопорфирином. Деятельность каталазы в живой клетке сопряжена с активностью флавопротеидов – важнейшего звена электронотранспортной цепи дыхания. Каталаза расщепляет токсичную для живой клетки перекись водорода, образующуюся как побочный продукт деятельности флавопротеидов в пероксисомах. Реакция идет согласно уравнению:



Полагают, что в очень мясистых тканях, лишенных достаточного доступа кислорода, каталаза играет роль поставщика последнего, генерируя его из перекиси водорода.

**Цель работы:** ознакомиться с активностью дыхательных ферментов растений.

**Задачи:**

1. Качественно оценить активность дегидрогеназ в семенах гороха;
2. Провести качественные реакции на пероксидазу в тканях растений;
3. Провести качественные реакции на активность каталазы в тканях растений.

**Материалы и оборудование:** набухшие суточные семена фасоли (гороха), темно-синий водный раствор метиленовой сини, нагретая водяная баня до 25-30°C, пробирки, спиртовки, спички, резиновые пробки для пробирок; клубни картофеля, 1%-ный раствор гидрохинона, 3%-ный раствор перекиси водорода, вода, скальпели, пипетки, пластиковые тарелки; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , песок для растирания ткани, пробирки, цилиндры на 10 мл, фарфоровые ступки с пестиком, воронки, пробочные сверла, держатели и штативы для пробирок, сухие, набухшие и наклюнувшиеся семена ячменя; проростки различных двудольных растений; клубни и корнеплоды.



**Задание 1. Обнаружение дегидрогеназ в семенах гороха.**

*Ход работы:*

1. С семян набухшего гороха (фасоли) снимают кожуру.
2. Часть семян убивают кипячением в течение 10 минут (на спиртовке в пробирке).
3. Затем живые (опытные) и убитые (контрольные) семена помещают в две пронумерованные пробирки и в течение 5-10 минут окрашивают водным раствором метиленовой сини.
4. Окрашенные семена промывают и заливают водой для создания анаэробных условий, так как дегидразы работают в анаэробных условиях.
5. Пробирки закрывают пробками и ставят в термостат или на водяную баню при температуре 25-30°C.
6. Через некоторое время в опытной пробирке семена теряют синюю окраску. Последнее происходит потому, что дегидразы, участвующие в дыхании клеток, отняли и активизировали водород дыхательного материала (окисление дыхательного материала) и затем передали водород метиленовой сини, которая восстановилась и обесцветилась.
7. В контрольной пробирке цвет семян остается синим, т.к. при кипячении семян дегидразы разрушились.
8. Описать результаты опыта и объяснить полученные результаты о работе дегидразы семян исследуемой культуры.

**Задание 2. Обнаружение пероксидазы в растительных тканях.**

*Ход работы:*

1. Из клубня картофеля поперек нарезают 4 пластинки толщиной 3-4 мм и раскладывают на пластиковой тарелке.
2. На срез первой пластинки картофеля (носитель пероксидазы) наносят только воду, на 2-ю только гидрохинон, на 3-ю только  $H_2O_2$ , на 4-ю перекись водорода и гидрохинон.

3. При окислении гидрохинона в хинон происходит интенсивное побурение среза. Слабое побурение среза наблюдается и без нанесения гидрохинона и перекиси водорода, оно не связано с действием пероксидазы, которая проявляет активность только в присутствии перекиси водорода, это происходит в связи с действием полифенолоксидазы, окисляющей полифенолы с участием молекулярного кислорода.

4. Описать в тетради результаты опытов и объяснить наблюдаемые явления.

### **Задание 3. Определение активности каталазы в растительном материале.**

#### *Ход работы:*

1. Из листа растения пробочным сверлом диаметром 1 см сделать 5 высечек, не захватывая крупные жилки. При работе с мясистыми органами растений (клубни, корнеплоды) перед тем, как делать высечки, следует нарезать ткань пластинками толщиной 4-5 мм.

2. Диски растереть в ступке с добавлением небольшого количества воды (до 1 мл). Если ткань жесткая, добавить немного песка.

3. К растертой кашице прилить 5 мл воды тщательно перемешать и профильтровать в чистую пробирку через увлажненный складчатый фильтр.

4. Для работы достаточно 3-4 мл вытяжки фермента.

5. Добавить к вытяжке 2 мл 3% перекиси водорода. В результате разложения перекиси водорода ферментом выделяются пузырьки кислорода, дающие хорошо заметную пену.

6. Описать в тетради результаты опытов и объяснить наблюдаемые явления.

#### **Контрольные вопросы**

1. В чем принципиальное отличие между окислением при горении и окислением дыхательного субстрата при клеточном дыхании?

2. Какой класс ферментов участвует в процессах дегидрирования дыхательного субстрата?

3. Какова роль цитохромной системы и кислорода воздуха при дыхании?

4. В чем заключается роль каталазы в растительных тканях?

### ***Вопросы для текущего контроля***

#### **Коллоквиум 6. Дыхание.**

1. В непроросших семенах льна не обнаружены углеводы. При их прорастании появляется крахмал и растворимые сахара. Каково их происхождение?

2. В непроросших семенах фасоли много крахмала. В прорастающих семенах количество его снижается почти вдвое, но содержание редуцирующих сахаров оказывается незначительным. Почему?

3. Какие запасные вещества преобладают в семенах большинства видов растений, почему?

4. Почему подмороженные клубни картофеля приобретают сладкий вкус?

5. В каких органах дыхание протекает более интенсивно: листьях, цветах, стеблях, почках или в запасающей паренхиме?

6. В каких тканях интенсивность дыхания выше: в тапетуме пыльников или мякоти яблока; в кожуре, глазках или запасающей паренхиме клубней картофеля? Почему?

7. 15 г почек выделили за 30 мин 3 мг  $\text{CO}_2$ . Определить интенсивность дыхания на 1 г сухого веса в час, если известно, что сухое вещество в почках составляет 40%.

8. Сколько  $\text{CO}_2$  выделяет 1 кг семян за 10 суток, если известно, что интенсивность дыхания этих семян равна 0,1 мг  $\text{CO}_2$  на 1 г сухого вещества в час (сухое вещество в семенах составляет 63%)?

9. Вредно ли в помещении содержать декоративные растения, поглощающие кислород, необходимый человеку? Какое количество кислорода поглотят растения общим весом 2 кг в комнате объемом 45 м<sup>3</sup> за 10 ч, если известно, что средняя интенсивность их дыхания 12 мл  $\text{O}_2$  на 1 г в сутки? Доказательство подтвердить расчетом.

10. На свету при 25°C растение интенсивно поглощало  $\text{CO}_2$ . При повышении температуры до 40°C поглощение  $\text{CO}_2$  сменилось его интенсивным выделением. Объясните причину изменения газообмена.

11. Почему для лучшей сохранности овощей в хранилище поддерживается низкая температура?

12. Каков будет состав запасных веществ семян, если их дыхательный коэффициент равен 0,3; 0,8; 1,0?

13. В наклюнувшихся семенах ячменя ДК был равен 0,8. При дальнейшем прорастании семян он поднялся до 1,4. Почему?

14. Почему зерно, заложенное на хранение, должно иметь влажность не выше 12–14%? Что произойдет, если влажность зерна будет выше?

15. Какую роль играет кислород в процессах дыхания?

16. Какое минимальное содержание кислорода во внешней среде не оказывает отрицательного влияния на продуктивность дыхания?

17. Объясните причины накопления спирта в плодах?

18. При каких условиях в семенах накапливается спирт?

19. Может ли накапливаться спирт в корневой системе?

20. Почему растения не могут длительное время находиться в среде бедной кислородом, хотя и не погибают сразу после попадания в анаэробные условия?

21. Как влияет повышение влажности семян на интенсивность их дыхания?

22. Является ли отсутствие высокой ферментативной активности в гомогенате растительной ткани доказательством того, что этот фермент малоактивен и в самом растении?

23. Почему после первых морозов становятся более сладкими и вкусными ягоды рябины, калины и некоторых других растений?

24. Как влияет температура на интенсивность дыхания растений?

## **Лабораторная работа № 10**

### **Влияние внесения биоудобрений на объем корневой системы, общую и рабочую адсорбирующую поверхность корней**

Способ определения общей и рабочей поверхности корней был предложен Д.А. Сабининым и И.И. Колосовым и основан на представлении об адсорбционном характере начального этапа поглощения веществ корнями растений.

Поступление минеральных веществ в клетки корней растений осуществляется в несколько этапов. Благодаря тому, что клетки корневой системы имеют свободное пространство (апопластическое), доступное для диффузии, и клеточные стенки представляют собой ионообменник, осуществляется адсорбция поступающих веществ на их поверхности [11, 21, 22].

Погружение корней в какой-либо раствор приводит к диффузии растворенных веществ по свободному пространству периферических клеток и их адсорбции на поверхности клеток. Адсорбционное насыщение длится в течение нескольких минут и поглощаемое вещество распределяется мономолекулярным слоем на поверхности клетки. Адсорбируя определенное количество тех или иных ионов и освобождая их при изменении рН и величины фиксированного заряда, пектоцеллюлозные оболочки служат ионообменным резервом клетки, особенно при низкой концентрации питательных элементов в среде.

При изучении процесса адсорбции в качестве адсорбируемого вещества возможно использование легкорастворимого в воде красителя (например, метиленового синего), изменение концентрации которого определяют колориметрически. Известно, что 1 мг метиленового синего при полной адсорбции покрывает  $1,1 \text{ м}^2$  поверхности адсорбента. При погружении корней в раствор метиленового синего он через 1,5-2 мин появляется внутри первого слоя клеток. И. И. Колосов установил, что при двукратном полутораминутном погружении корневой системы в 0,0002 н. раствор метиленового синего происходит адсорбционное насыщение как рабочей, так и общей поверхности корневой системы. Если допустить, что при этом поверхность корней равномерно покрывается мономолекулярным слоем адсорбируемого вещества, то можно определить размеры общей адсорбирующей поверхности по изменению концентрации метиленовой синей при первых двух полутораминутных погружениях. При погружении корневой системы в раствор красителя в третий раз, последний будет поглощаться только рабочей частью корневой системы, от которой адсорбированные вещества перемещаются внутрь корня.

**Цель работы:** изучить эффекты биоудобрений показатели объема корневой системы, общей и рабочей адсорбирующей поверхности корней.

**Задачи:**

1. Получить проростки растений в анализируемых условиях (с биоудобрением и без);
2. В анализируемых условиях определить объем корневой системы;
3. Измерить общую и рабочую адсорбирующую поверхность корней;
4. Сформулировать вывод о влиянии биоудобрений на определяемые показатели.

**Материалы и оборудование:** проростки растений, выращенные в почве с добавлением/без добавления биопрепарата типа азотобактерин и т.п., объемомер Д. А. Сабинина и И. И. Колосова, корковая пробка, бюретки, вата, суровые нитки; 0,0002 н. раствор метиленовой сини, дистиллированная вода; салфетки и фильтровальная бумага, бюретки с воронками, стаканы стеклянные, чистые сухие колбочки на 100 мл, пипетки, градуированные на 2-5 мл, кристаллизаторы, карандаши по стеклу, ФЭК.

**Задание 1. Получение проростков анализируемых растений.** Заблаговременно вырастить растения на обычной почве и на почве с внесенным биоудобрением (дозировка согласно инструкции).

**Задание 2. Определение объема корневой системы.** Определение объема корневой системы, предварительно хорошо отмытой в проточной воде, осуществляют путем погружения ее в мерный цилиндр по количеству вытесненной воды. Метод определения объема корней, разработанный Д.А. Сабининым и И.И. Колосовым, позволяет определять объем с ошибкой не более 5-7%. Объем корней определяют

при помощи специального объемомера (рис. 13). Объем измерительного устройства, состоящего из стеклянного цилиндра 1, нижняя часть которого вытянута в трубку 2, соединенную каучуковой трубкой 3 с градуированной пипеткой 4 (емкость пипетки 1-2 мл, цена деления 0,01-0,02 мл). Чем меньше диаметр цилиндра, тем чувствительней прибор.

*Ход работы:*

1. Стеклянный цилиндр укрепляют в штативе вертикально, а градуированную пипетку – под небольшим углом к горизонтальной поверхности. В прибор наливают воду или раствор, в котором росли растения.

2. Прибор с предварительно промытыми внутренними поверхностями свежеприготовленной хромовой смесью с водой укрепляют в штативе и наливают раствор, в котором росли растения, таким образом, чтобы уровень жидкости в цилиндре был на 2-3 см ниже верхнего края.

3. Измерения объема корней проростков растений необходимо производить в питательном растворе, в котором они росли для устранения ошибки из-за разности в осмотическом давлении. Уровень жидкости в пипетке должен совпадать с началом градуированной части.

4. Из прибора вытесняют пузырьки воздуха.

5. Для определения объема корней растения связывают в пучки суровыми нитками так, чтобы корневые шейки были на одном уровне, и закрепляют в отверстии разрезанной пополам пробки. Работу необходимо выполнять быстро, чтобы корни не подсыхали. Перед погружением корней в цилиндр необходимо дать стечь раствору с корней.

6. Отмечают положение мениска А" в пипетке объемомера и погружают корни в цилиндр. В результате погружения корней в объемомер уровень жидкости в цилиндре повысится, и мениск в пипетке сдвинется до положения В".

7. В последующем удаляют корни из цилиндра и дают воде с них стечь в цилиндр. Если после стекания всей воды уровень ее в пипетке не достигнет вновь положения А", то, не меняя наклона пипетки, воду доливают в цилиндр, пока мениск в пипетке не займет положения А".

8. Приливают в цилиндр воду из бюретки до тех пор, пока мениск в пипетке не займет вновь положения В".

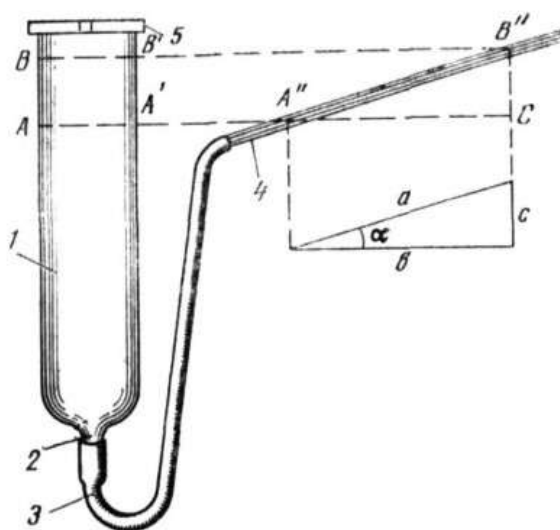


Рис. 13. Прибор для определения объема корней (объемомер), по Д.А. Сабинину и И.И. Колосову: 1 – цилиндрический сосуд с оттянутым концом (2); 3 – каучуковая трубка; 4 – градуированная пипетка; 5 – пробка; AA' – исходный уровень воды в цилиндре; BB' – уровень воды в цилиндре после погружения корней; А" – исходное положение мениска в пипетке, В" – положение мениска в пипетке после погружения корней.

9. Прилитый объем воды равен объему измеряемых корней. Определение повторяют два-три раза и рассчитывают среднюю величину.

10. Результаты определения записывают в тетради в таблицу 9.

Таблица 9

Определение объема корней, мл.

Образец	Повторности измерения				Среднее значение
	1	2	3	4	
Обычная почва					
С биоудобрением					



## **Задание 2. Определение общей и рабочей адсорбирующей поверхности корневой системы.**

*Ход работы:*

1. Корни проростков осторожно просушивают фильтровальной бумагой и последовательно погружают на 1,5 мин в три стакана с метиленовым синим, превышающим объем корней в 10 раз (стаканы пронумеровать).

2. Переносить корни из стакана в стакан следует, не протирая их и не ожидая полного стекания раствора краски. Осторожным поворачиванием корней в стаканах перемешивают раствор.

3. Измеряют оптическую плотность растворов относительно контроля, предварительно разбавленных в 5 раз (5 мл раствора+20 мл воды), с помощью ФЭК при длине волны 630 нм.

4. Проводят 3-4 повторности каждого измерения и вычисляют среднее арифметическое.

5. Далее полученную оптическую плотность умножают на коэффициент 0,287. Зная объем и концентрацию красителя, вычисляют его содержание в стаканах – исходное и после пребывания в них корней.

6. Общую адсорбирующую поверхность находят, умножив 1,1 м на количество мг красителя, поглощенного корнями из первых двух стаканов.

7. Для того чтобы определить рабочую поверхность корня, нужно 1,1 м умножить на количество мг красителя, поглощенного из третьего стакана.

8. Результаты измерений записывают в тетради в таблицу 10, затем по средним значениям вычисляют общую и адсорбирующую поверхность корней. В заключение делают вывод о соотношении общей и рабочей поверхности корней.

Таблица 10

	№ стакана	Обычная почва			С биоудобрением		
		1	2	3	1	2	3
	Объем краски, мл						
Оптическая плотность растворов	Исходная						
	после погружения						
Концентрация растворов, мг/мл	Исходная						
	после погружения						
Количество краски в стаканах, мг	Исходная						
	после погружения						
Поглощено краски, мг							

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое общий объем корней? Какие факторы на него влияют?
2. С чем связаны трудности определения общего объема корней?
3. На чем основано определение общего и адсорбирующего объема корней?

## **Лабораторная работа № 11**

### **Диагностика минерального питания (по Уршпрунгу)**

Упрощенный метод Уршпрунга основан на определении сосущей силы, осмотического и тургорного давления в тканях растения, однако применим для анализа ограниченного числа объектов, состоящих из однородных клеток, например, для крупных паренхиматозных органов со слабо развитыми механическими тканями (клубни, корнеплоды). Диагностика сосущей силы листьев является одним из лучших диагностических средств недостатка воды в растении и используется для определения срока полива растений [19, 21, 22].

Сила, с которой клетка в данный момент поглощает воду, называется сосущей. *Сосущая сила клетки (S)* зависит от ее физиологического состояния и от внешних условий.

В покоящихся семенах и меристематических клетках она обусловлена главным образом давлением набухания коллоидов протоплазмы и пектиновых веществ клеточных оболочек.

В клетках, закончивших рост и имеющих большую центральную вакуоль, сосущая сила в значительной степени определяется величиной *осмотического давления* клеточного сока  $\pi$  и *тургорного давления*  $P$ , которое в свою очередь зависит от эластичности клеточной оболочки и содержания воды в клетке.

Осмотическое давление окружающего раствора ( $\pi$ ) равно:  $\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T$ . Согласно правилу Вант-Гоффа,  $R$  – универсальная газовая постоянная, равная 8,314 Дж/моль·К;  $T$  – абсолютная температура в Кельвинах;  $C$  – изотоническая концентрация раствора,  $M$ ;  $i$  – изотонический коэффициент Вант-Гоффа (так как неэлектролиты не диссоциируют, для сахарозы  $i = 1$ ).

Сосущая сила клетки обычно равна разности осмотического давления клеточного сока и тургорного давления:  $S_{\text{кл.}} = \pi_{\text{кл.сока}} - P$ .

В зависимости от насыщения клетки водой величина тургорного давления будет меняться, соответственно изменится и сосущая сила клетки.

Водообмен между клеткой и окружающей средой определяется соотношением сосущей силы клетки и осмотическим давлением наружного раствора. Поглощение или отдача воды клетками сопровождается изменением как их размеров и веса, так и концентрации окружающего раствора. При погружении кусочка ткани растения в раствор с большим осмотическим давлением вода из клеток поступает в раствор и размеры кусочка уменьшаются ( $P = 0$ , следовательно,  $S = \pi$ ).

Если сосущая сила клеток выше, чем  $\pi$  окружающего раствора, клетки всасывают воду и кусочек ткани увеличивается.

При равенстве сосущей силы ткани и  $\pi$  окружающего раствора между выходом и поступлением воды в клетку устанавливается равновесие, и размеры кусочка ткани не изменяются.

Задача настоящей работы сводится к тому, чтобы из серии растворов найти такой, осмотическое давление которого равнялось бы сосущей силе клеток ткани. Зная, что  $S_{кл.} = \pi_{р-ра}$ , находим  $\pi_{р-ра}$ .

Осмотическое давление раствора ( $\pi_{р-ра}$ ) легко рассчитать, зная его молярную концентрацию. Следует иметь в виду, что в настоящее время для характеристики энергетического уровня молекул воды (их способности диффундировать или испаряться) используется термодинамический показатель – водный потенциал, который для чистой воды принят за нуль ( $\Psi_{H_2O} = 0$ ), а для любого раствора – меньше нуля. При замене осмотических показателей ( $S_{кл.} = \pi_{кл.сока} - P$ ) термодинамическим уравнение примет следующий вид:

$$-\Psi_{H_2O_{кл}} = -\Psi_{п} + \Psi_{р},$$

где  $\Psi_{H_2O_{кл}}$  – водный потенциал клетки;

$\Psi_{п}$  – осмотический потенциал клеточного сока;

$\Psi_{р}$  – гидростатический потенциал.

Из уравнения видно, что осмотический потенциал понижает водный потенциал клетки, а потенциал давления повышает его.

Как правило,  $\Psi_{H_2O}$  клетки отрицателен, и лишь при полном насыщении клетки водой, когда  $\Psi_{р} = \Psi_{п}$ , этот показатель равен нулю.

При погружении растительной клетки в какой-либо раствор водообмен между ними определяется соотношением их водных потенциалов: вода перемещается в сторону более низкого водного потенциала, т.е. в сторону большей сосущей силы.

На практике это означает, что растения извлекают воду из почвы до тех пор, пока сосущая сила корешков может конкурировать с сосущей силой почвы. Поглощение воды происходит тем интенсивнее, чем больше всасывающая сила корня и чем легче корни и почвенная влага приходят в соприкосновение друг с другом.

**Цель работы:** освоить метод диагностики минерального питания по показателям сосущей силы, тургорного и осмотического давления клеток растительных тканей.

**Задачи:**

1. Ознакомиться с понятиями сосущей силы, тургорного и осмотического давления клеток растительных тканей;
2. Подготовить срезы растельной ткани и растворы сахарозы;
3. Провести диагностику.

**Материалы и оборудование:** свежие и подвявшие клубни картофеля, корнеплоды сахарной или столовой свеклы; растворы сахарозы от 0,1 до 0,9М, вода, мерные пробирки, стеклянные стаканчики алюминиевые бюксы, разделочная доска, ножи, лезвия, пинцеты, линейки.

**Задание 1. Приготовление растворов сахарозы.** Приготовить растворы сахарозы следующих концентраций: 0,1М; 0,2М; 0,3М; 0,5М; 0,7М; 0,9М как указано в таблице 11.

*Таблица 11*

**Приготовление растворов сахарозы**

Концентрация раствора, моль/л	На 10 мл раствора	
	1М раствора сахарозы, мл	воды, мл
0,7	7	3
0,6	6	4
0,5	5	5
0,4	4	6
0,3	3	7
0,2	2	8

**Задание 2. Подготовка срезов растительной ткани.** Вырезать из клубня или корнеплода (поперек продольной оси органа) пластинку толщиной 3-4 мм в форме прямоугольника размером 30x40 мм. С помощью лезвия и линейки разрезать подготовленную пластинку на ряд одинаковых полосок величиной 3x40 мм (нарезать полоски следует быстро, не допуская подвядания). Излишки клеточного сока, вытекающие при разрезании ткани, удалить фильтровальной бумагой.

**Задание 3. Проведение анализа.** Погрузить по 3 полоски ткани в растворы сахарозы (погружение должно быть полным), предварительно измерив исходную длину ( $l_0$ , мм). Через 30 минут извлечь полоски из растворов и измерить  $l_0$ . Данные повторностей опыта, средние значения и результаты вычислений записывают в таблицу 12.

Таблица 12

Определение изменения длины полосок тканей при погружении в растворы сахарозы

Концентрация сахарозы, М		0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	
Длина полосок, мм	Исходная $l_0$ , мм							
	через 30 минут ( $l_0$ ), мм	повторность	1					
			2					
			3					
			среднее					
разность до и после погружения в раствор ( $\Delta l$ ), мм								
$\Delta l$ , %								

На основе полученных результатов, построить график зависимости изменения длины полосок от концентрации наружного раствора (на оси абсцисс откладывают концентрации растворов (С), на оси ординат –  $\Delta l$ , %).

**Задание 4. Определение сосущей силы.** Для определения величины сосущей силы клеток растительной ткани ис-

ходят из того, что в изотоническом растворе величина сосущей силы клеток равна осмотическому давлению наружного раствора, которое определяется по уравнению Вант-Гоффа:  $\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T$ . То есть необходимо определить раствор, сосущая сила которого равна сосущей силе данной ткани. Для этого нужно рассчитать сосущую силу ткани по сосущей силе раствора. Поскольку полоски находились в растворах достаточно продолжительное время и размеры их перестали меняться, то можно считать, что сосущая сила их уравнилась с осмотическим давлением окружающего раствора, т.е.  $S_{тк.} = \pi_{р-ра}$ , поэтому ее легко вычислить по формуле:  $S_{тк.} = i \cdot C \cdot R \cdot T$ .

**Задание 5. Определение значения  $\pi$  клеточного сока.**

В растворах меньшей концентрации полоски ткани будут иметь более низкие значения  $\pi$ , которые уменьшаются обратно пропорционально длине полосок ткани. Принимаем, что для самой короткой полоски  $P = 0$  (характерно полное отсутствие тургора), тогда, исходя из формулы  $S = \pi - P$ ,  $\pi_1 = S_1$ . Для остальных полосок:  $\pi_1 \cdot L_1 = \pi_n \cdot L_n$ , откуда  $\pi_n = \pi_1 \cdot L_1 / L_n$ .

**Задание 6. Определение тургорного давления.** Имея все значения  $S$  и  $\pi$ , можно рассчитать значения  $P$  для исследованных полосок ткани по формуле:  $P = \pi - S$ .

Результаты вычислений в заданиях 4-6 заносят в таблицу 13.

*Таблица 13*

Вычисление сосущей силы, тургорного и осмотического давления в исследуемых тканях

Концентрация сахарозы, М	L (длина полосок ткани через 30 минут), мм	S (сосущая сила клеток), Па $S=c \cdot R \cdot T$	$\pi$ (осмотическое давление клеточного сока), Па	$P = \pi - S$ (тургорное давление), Па

**Задание 7.** Построение графика, отражающего зависимость между осмотическим давлением, сосущей силой и тургорным давлением ткани. Используя в качестве образца рис. 14, на оси абсцисс (в масштабе 1см : 1мм) откладывают значения длины полосок ткани в порядке возрастания; на оси ординат – значения  $\pi$ , а затем  $P$  для соответствующих полосок. Откладывать значения  $S$  нет необходимости, так как на графике они представляют собой отрезки  $\pi_1 - P_1$ . Соединив точки  $\pi$  и  $P$  линиями, получаем график зависимости  $\pi$ ,  $S$  и  $P$ .

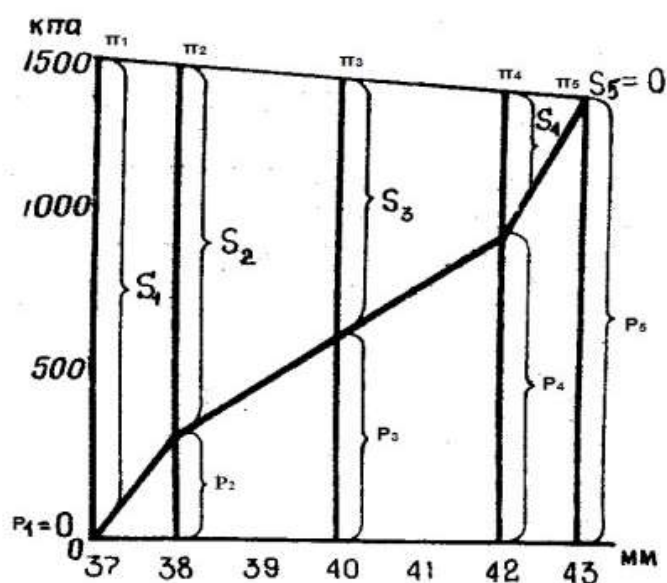


Рис. 14. График зависимости между сосущей силой, осмотическим и тургорным давлением растительных клеток, по-разному насыщенных водой

Проанализировать полученные результаты. Сформулировать выводы: а) объяснить причину изменения длины полосок в растворах разных концентраций; б) на основании графика определить концентрации растворов, где клетки находятся в состоянии полного тургора, частичного тургора и его отсутствия (т.е. необходимо отметить гипертонические, гипотонические и изотоническую концентрацию наружного раствора по отношению к концентрации клеточного сока растительной ткани); в) определить взаимозависимость трех величин (сосущей силы, осмотического и тургорного давления)



и объяснить, от какого показателя,  $\pi$  или  $P$ , зависит в большей степени изменение сосущей силы отрезков ткани.

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое сосущая сила (водный потенциал)?
2. Какие значения приобретает сосущая сила по мере насыщения клетки водой?
3. В чем суть метода определения сосущей силы растительных тканей по Уршпрунгу?
4. С какой целью можно использовать показатель сосущей силы в сельскохозяйственной практике?

## **Лабораторная работа № 12**

### **Диагностика минерального питания культурных растений рефрактометрическим методом**

Клеточный сок – водный раствор различных органических и неорганических веществ. Его осмотическое давление (осмотический потенциал) зависит от концентрации и степени диссоциации этих веществ. Осмотическое давление клеточного сока определяет способность клетки «насосывать» воду из внешнего раствора. Соответственно, определяя концентрацию клеточного сока и потенциального осмотического давления, можно оценить потребность в поливе и т.д. [9, 10, 18, 19].

Рефрактометрический метод позволяет быстро и точно определить концентрацию клеточного сока и потенциальное осмотическое давление. Он очень удобен для работы в полевых условиях. Метод основан на учете показателя преломления света клеточным соком.

**Цель работы:** освоение рефрактометрического метода определения концентрации клеточного сока и потенциального осмотического давления в тканях культурных растений.

#### **Задачи:**

1. Получить клеточный сок культурных растений;

2. Провести рефрактометрическую диагностику минерального питания.

**Материалы и оборудование:** листья растений (желательно взять растения, относящиеся к трем разным группам – мезофитам, гигрофитам, ксерофитам), ручной пресс или ступка с пестиком, марля, ножницы, фильтровальная бумага, пипетки, рефрактометр.

**Задание 1. Получение клеточного сока.** При помощи ступки и пестика получают сок из двух-трех листьев исследуемых растений, предварительно завернутых в кусочек марли. Марлю отжимают в чистую посуду.

### **Задание 2. Работа с рефрактометром.**

*Ход работы:*

1. На нижнюю поверхность призмы рефрактометра (рис. 15) наносят две капли исследуемого сока и прижимают верхней поверхностью призмы.

2. Прибор направляют на свет и вращением винта на тубусе добиваются четкого изображения в окуляре вертикальной шкалы с делениями, обозначающими содержание сахара в растворе (в %).

3. Деление шкалы, через которое проходит горизонтальная граница между светлым и темным полями, соответствует концентрации сахара в клеточном соке испытуемого растения.

4. Для каждого варианта делают не менее трех определений. При переходе от одного варианта к другому призму для очистки ее от предыдущего раствора протирают сначала влажной, а затем сухой фильтровальной бумагой.

5. По значениям в Приложении 1 находят величину потенциального осмотического давления (кПа), соответствующую найденной концентрации клеточного сока.

6. Результаты записывают в таблицу 14, делают вывод о различиях потенциального осмотического давления у рас-

тений разных экологических групп и приспособительном значении этих различий.

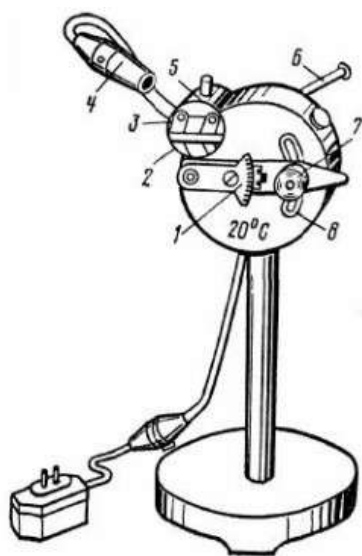


Рис. 15. Лабораторный рефрактометр: 1 – компенсатор; 2 – окно для отраженного света; 3 – система призм; 4 – осветитель; 5 – окно для проходящего света; 6 – корпус термометра; 7 – окуляр; 8 – прорезь.

Таблица 14

Определение потенциального осмотического давления  
рефрактометрическим методом

Вариант опыта	Концентрация клеточного сока, %	Потенциальное осмотическое давление, кПа
мезофит (три измерения) и среднее показание рефрактометра		
гигрофит (три измерения) и среднее показание рефрактометра		
ксерофит (три измерения) и среднее показание рефрактометра		

**Контрольные вопросы**

1. В чем суть рефрактометрического определения концентрации клеточного сока и потенциального осмотического давления?
2. Как можно использовать этот показатель в диагностике минерального питания растений?
3. В чем заключается удобство использования рефрактометрического определения концентрации клеточного сока и потенциального осмотического давления?

## Лабораторная работа № 13

### Физиологически кислые и щелочные соли

Растения обладают избирательной поглотительной способностью и потребляют больше тех элементов, которые им необходимы. В результате этого неиспользованные растениями ионы, нейтральные вне сферы деятельности корневой системы, могут приводить к изменению pH среды, если в ней выращиваются растения. В зависимости от преимущественного поглощения растениями из солей катионов или анионов их делят на физиологически кислые и физиологически щелочные соли [9-11].

Соли, из состава которых в больших количествах поглощаются анионы, чем катионы –  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и в результате происходит подщелачивание, являются **физиологически щелочными**.

Соли, из которых растения в больших количествах используют катион, чем анион –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  и в результате подкисляется раствор, называются **физиологически кислыми**.

Кальциевая, натриевая и калийная селитры являются физиологически щелочными удобрениями, так как при их внесении растения преимущественно используют анион  $\text{NO}_3^-$ , а остающиеся неиспользованными катионы натрия, кальция или калия образуют основания ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ) и сдвигают реакцию почвенного раствора в щелочную сторону. Физиологическая щелочность калийной селитры, кроме того, обусловлена гораздо более высоким содержанием в ней калия, чем азота, при этом в почве остаются неиспользованными ионы калия и почвенный раствор подщелачивается. Благодаря нейтрализующему действию нитратные азотные удобрения эффективны на кислых дерново-подзолистых почвах.

Наиболее типичными представителями физиологически кислых солей являются аммонийные азотные удобрения – сульфат аммония и хлористый аммоний. При их внесении растения преимущественно используют катион аммония, а остающиеся анионы образуют кислоты (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), подкисляя почву. Физиологически кислым удобрением является и аммонийная селитра, за счет более энергичного поступления в корневую систему NH<sub>4</sub><sup>+</sup> по сравнению с NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Однако следует иметь в виду, что при определенных условиях не только не проявляется преимущество аммиачного питания над нитратным, но нитратное питание может быть лучшим. Это наблюдается при кислой реакции среды, недостатке в ней кальция и наличии достаточного количества молибдена, марганца, участвующих в восстановительных процессах нитратов в растениях, а также при внесении азотных удобрений в рядки при посеве сельскохозяйственных культур. Использование аммонийных азотных удобрений может вызвать аммиачное отравление молодых проростков растений, особенно у культур с мелкими семенами, которые содержат малый запас углеводов.

Аммонийный азот удобрений в почве может подвергаться нитрификации с образованием азотной кислоты и ее солей – нитратов. В результате подкисляющее действие удобрения на почву, вызванное избирательным поглощением растениями аммония, усиливается за счет образования азотной кислоты при нитрификации некоторой части аммонийного азота или ослабляется при последующем образовании солей азотной кислоты. Поскольку нитрификация происходит при участии микроорганизмов, аммонийные удобрения являются не только физиологически, но и биологически кислыми [7, 14, 23].

**Цель работы:** установить влияние деятельности корней на изменение рН почвенного раствора.

### Задачи:

1. Получить рассаду анализируемых культурных растений;
2. Измерить величину рН питательных растворов до посадки растений;
3. Измерить величину рН питательных растворов после семидневного выращивания в них рассады культурных растений;
4. Сформулировать вывод о причинах сдвига рН в растворах разных солей.

**Материалы и оборудование:** рассада ячменя (пшеницы), полоски индикаторной бумаги, растворы солей  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,0366 г/л),  $\text{NaNO}_3$  (0,0137 г/л).

**Задание 1. Определение исходного значения рН растворов хлорида аммония и нитрата натрия.** Налить по 1 мл растворов в фарфоровые тигельки и добавить 1 каплю индикатора. Сравнить окраску раствора с окраской цветной шкалы и определить рН.

**Задание 2. Посадка ячменя (пшеницы) в питательные растворы.** Затем налить в одну пробирку раствор хлористого аммония, в другую – азотнокислого натрия. Снабдить пробирки этикетками. Высадить в каждую пробирку по три растения ячменя. Через 7 дней снова определить рН раствора в каждой пробирке. Результаты определений оформить в виде таблицы 15.

Таблица 15

Влияние роста растений  
на изменение рН химически нейтральных солей.

Растение	Раствор соли	Величина рН растворов	
		В начале	Через 7 дней после посадки растений
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
	$\text{NaNO}_3$		

Сформулируйте вывод о причинах сдвига рН в растворах разных солей.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие соли являются физиологически кислыми или щелочными и почему?
2. На каких типах почв следует применять физиологически щелочные удобрения, и как они будут действовать?
3. В чем заключается особенность аммиачного питания?
4. Каковы возможные превращения аммонийного азота в почве?
5. Каковы особенности азотного нитратного питания?

## **Лабораторная работа № 14**

### **Изучение антагонизма ионов калия и кальция в ходе минерального питания растений**

Важную роль в поступлении ионов в клетку играет факт взаимодействия их между собой. При несбалансированном соотношении элементов в питательном растворе некоторые ионы могут влиять на транспорт других ионов. Антагонизм ионов можно наблюдать как на этапе поступления, так и на различных стадиях метаболизма. Например, повышение концентрации  $Rb^+$  во внешнем растворе снижает поступление  $K^+$  и наоборот;  $Cl^-$  и  $Br^-$  также действуют как взаимные антагонисты. По характеру взаимодействия ионов различают следующие эффекты – антагонизм, синергизм и аддитивность [9, 10, 21, 22].

*Антагонизм* – это явление, когда один ион уменьшает или устраняет действие другого. Например, отдельные соли могут оказывать пагубное действие на клетки растений, тогда как их смесь оказывается безвредной. Противодействие ионов можно объяснить влиянием их на проницаемость плазмалеммы, гидратацию белков цитоплазмы, а также конкуренцией за места связывания на поверхности плазматических мембран и клеточных стенок переносчиками и активными центрами ферментов. Например, увеличение концентрации

одновалентных катионов в цитоплазме вызывает увеличение гидратации ее компонентов, в частности, полипептидных комплексов, в то время как повышение концентрации двухвалентных катионов индуцирует обратный эффект, а именно уменьшение оводненности составляющих ее структурных элементов.

Иногда поглощение того или иного иона может предотвратить вредные влияния, обусловленные избыточным поглощением другого иона. Например, токсичное действие  $Mn^{2+}$  можно снять  $Mg^{2+}$ .

$K^+$  и другие одновалентные катионы имеют тенденцию уменьшать вязкость цитоплазмы и увеличивать текучесть и проницаемость мембран, тогда как двухвалентные катионы, например  $Ca^{2+}$ , оказывают противоположное влияние. Из-за таких антагонистических взаимодействий для корректировки дефицита отдельных минеральных веществ под растения обычно вносят смеси солевых растворов, а не отдельные соли.

*Синергизм* действия компонентов смеси состоит в том, что одна из солей усиливает действие другой, поэтому физиологический эффект солевой смеси превышает сумму эффектов компонентов смеси. Такие явления могут носить характер как отрицательного, так и положительного действия. Некоторые токсически действующие соли усиливают этот эффект в смеси с одной или несколькими солями. При положительных эффектах действие смеси солей оказывает благоприятное усиленное влияние на те, или иные физиологические процессы.

*Аддитивность* действия компонентов смеси наблюдается, если эффект равен сумме действия отдельных компонентов. Это имеет место в явлениях осмоса. Осмотическое давление солевой смеси равно сумме парциальных осмотических давлений солей, входящих в смесь.



**Цель работы:** изучить явление антагонизма ионов калия и кальция в тканях культурных растений.

**Задачи:**

1. Провести культивирование зерен в растворах хлоридов калия и/или кальция;
2. Оценить влияние солей на изменение длины надземной части и корешков;
3. Сформулировать вывод о характере совместного влияния данных солей.

**Материалы и оборудование:** наклюнувшиеся зерна пшеницы, бидистиллированная вода, растворы 0,1 М КСl и 0,09 М CaCl<sub>2</sub> (оба раствора должны быть приготовлены из химически чистых солей на бидистиллированной воде); фарфоровые чашки, чашки Петри, градуированные на 10 мл пипетки, ножницы, пинцеты, фильтровальная бумага, карандаши по стеклу, миллиметровая бумага.

**Задание 1. Культивирование зерен в растворах.** В фарфоровую чашку поместить 30 одинаковых наклюнувшихся семян пшеницы, предварительно 3-4 раза промытых в бидистиллированной воде. В три чашки Петри вложить на дно вырезанную по размеру фильтровальную бумагу и разложить на ней пинцетом (брать руками зерна нельзя!) по 10 отобранных ранее семян. Пронумеровать чашки карандашом по стеклу. Налить в 1-ю чашку 15 мл раствора КСl, во 2-ю – 15 мл раствора CaCl<sub>2</sub>, в 3-ю – 3 мл раствора КСl и 2 мл раствора CaCl<sub>2</sub>. Закрыть чашки крышками и оставить при комнатной температуре на 7-8 дней.

***Важно!!!** Через каждые два дня проветривать чашки, открывая крышки на несколько секунд.*

**Задание 2. Измерение длины надземной части и корешков.** Через неделю измерить длину надземной части и корешков (у каждого экземпляра определить размер самого

длинного корня), вычислить средние величины. Результаты наблюдений оформить в виде таблицы 16 и сделать выводы о совместном влиянии калия и кальция на рост растений.

*Таблица 16*

**Влияние ионов на длину корней и надземной части**

Вариант опыта	Длина надземной части, см	Длина корней, см
Контроль (водопроводная вода)		
KCl		
CaCl <sub>2</sub>		
KCl + CaCl <sub>2</sub>		

***Контрольные вопросы***

1. В чем особенность антагонизма, синергизма и аддитивного действия ионов при минеральном питании? Приведите примеры.
2. Как учитываются эти эффекты при внесении удобрений?

**Лабораторная работа № 15**

**Тканевая диагностика азотного нитратного питания**

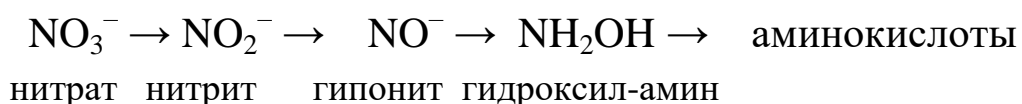
Тканевая диагностика питания растений предусматривает определение содержания нитратов, фосфатов, сульфатов, калия, магния и других элементов питания в тканях или вытяжках из растений [11, 17].

В полевых условиях тканевую диагностику проводят с помощью портативных приборов – переносных лабораторий. Это позволяет осуществлять экспресс-анализ содержания нитратов, фосфатов и калия в сырых растительных образцах по методу В.В. Церлинг и для определения спелости зерна. Для этих же целей можно использовать переносную экспресс-лабораторию – полевую сумку К.П. Магницкого.

Для быстрого обнаружения нитратов можно использовать реакцию с дифениламином, который в присутствии иона

$\text{NO}_3^-$  образует синюю анилиновую краску. По интенсивности посинения можно приблизительно судить о количестве нитратов в исследуемом объекте.

Соли азотной кислоты (нитраты), поглощаемые корнями из почвы, восстанавливаются в растении до аммиака через ряд этапов, каждый из которых катализирует особый фермент (нитратредуктаза, нитритредуктаза, гипонитритредуктаза и гидроксиламинредуктаза). Аммиак связывается кетокислотами ( $\alpha$ -кетоглутаровой, щавелевоуксусной и пировиноградной), образуя в процессе восстановительного аминирования первичные аминокислоты – глутаминовую, аспарагиновую и аланин. Другие аминокислоты образуются путем трансаминирования или ферментативного превращения одних аминокислот в другие:



При достаточном содержании растворимых углеводов и высокой активности соответствующих ферментов перечисленные биохимические процессы происходят в корнях. Однако часть нитратов (нередко весьма значительная) может пройти через паренхиму корня в неизменном виде. В этом случае нитраты попадают в сосуды ксилемы и поднимаются с восходящим током к листьям, где и происходит их восстановление. Для восстановления нитратов требуется АТФ, образующаяся в процессе окислительного фосфорилирования или фотофосфорилирования. Определение содержания нитратов в соке, отжатом из стеблей или черешков, позволяет судить о восстановлении нитратов в корнях: чем меньше обнаруживается ионов  $\text{NO}_3^-$  в соке, тем полнее проходит этот процесс в клетках корня. Сопоставление содержания нитратов в черешках и листовых пластинках дает представление о нитратредуктазной активности клеток мезофилла.

**Цель работы:** освоение метода качественного выявления нитратов с дифениламином в культурных растениях одного вида, произраставшие в разных условиях (на солнце и в тени, до и после подкормки минеральными удобрениями и т. п.).

**Задачи:**

1. Провести визуальную диагностику азотного нитратного питания по Гофферу и методом Меллера – Арнольда;
2. Сформулировать влияние изучаемых условий на азотное нитратное питание.

**Материалы и оборудование:** растения, выращенные на питательном растворе или в почве, 1%-ный раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте в капельнице (хранить в темноте; капельницу поставить на крышку чашки Петри, чтобы предотвратить попадание на стол капель этой едкой жидкости), вода, ножницы, белая фарфоровая тарелка, стеклянные палочки, фильтровальная бумага.

*Приготовление дифениламинового реактива:* растворить на холоду в 10 мл серной кислоты 100 мг дифениламина.

**Задание.** По Гофферу (Hoffer, 1930), помещают на белую тарелку кусочки черешка и листовой пластинки какого-либо растения. Разминают эти кусочки стеклянной палочкой (палочку каждый раз споласкивать чистой водой и вытирать) и обливают раствором дифениламина в крепкой серной кислоте. Через 1,5 минуты определяют окраску ткани, оценив ее по 3-х балльной шкале (1 балл: отсутствие окраски – недостаток азота; 2 балла: светло-голубая окраска – достаточно азота; 3 балла: синяя окраска – избыток азота).

По методу Меллера - Арнольда (1929), в углубление палетки помещают несколько капель сернокислого раствора дифениламина. Конец только что срезанного стебля растения опускают в раствор дифениламина и отмечают в баллах интенсивность и быстроту появления в тканях стебля на плос-

кости среза синей окраски, придерживаясь шкалы, приведенной в таблице 17.

*Таблица 17*

Шкала для выявления нитратов по Меллеру-Арнольду

Балл	Интенсивность окраски	Внесение азотных удобрений в почву
4	Конец стебля в растворе дифениламина синий	Неэффективно
3	Срез стебля темно-синий	Мало эффективно
2	Проводящие пучки темно-синие	Эффективно
1	Проводящие пучки вначале темно-синие, а затем становятся красными и коричневыми	Сильно эффективно
0	Весь срез сразу окрашивается в красный или коричневый цвет	Сильно эффективно

Определение проводят не менее как с 10-кратной повторностью и затем выводят средний балл.

Кранц, Нельсон и Бёрхат (Krantz, Nelson a. Burhart, 1948) рекомендуют проводить определение прямо в поле, не срезая растение, а надсекая либо главную жилку у основания листа, либо узел соломины; на надрез наносят 1-2 капли 1%-ного раствора сернокислого дифениламина. Степень посинения ткани указывает на степень обеспеченности нитратами. Оценку они дают по 5-балльной восходящей шкале: 0 или 1 – нитратов нет или почти нет, азотное голодание (отметить, имеются ли также симптомы азотного голодания); 2 – нитратов очень мало, следы; 3 – нитратов мало, они присутствуют в небольших количествах лишь в главных жилках вторых и третьих листьев и отсутствуют в других частях растения; 4 – среднее количество нитратов, они присутствуют в средних жилках листьев на уровне молодого початка (например, в кукурузе) и нигде выше; 5 – много нитратов, они обнаруживаются в главных жилках листьев выше уровня початка (у кукурузы). Такой порядок определения нитратов авторами проверен, кроме кукурузы, также на сое и хлопчатнике.

Гоффер и Кранц предлагают этот способ и для других полевых культур.

Сформулировать выводы о превращениях нитратов в исследуемых условиях и нитратредуктазной активности листьев исследуемых растений.

#### ***Контрольные вопросы***

1. С помощью каких приборов проводят тканевую диагностику минерального питания растений?
2. В чем суть химической реакции нитратов с дифениламином?
3. Какова метаболическая судьба почвенных нитратов в тканях растения?
4. Каким образом локализуются почвенные нитраты в растении?

## **Лабораторная работа № 16**

### **Тканевая диагностика фосфорного питания культурных растений**

Содержание фосфора в растениях составляет лишь 0,2 % на сухую массу, при этом роль фосфора в растениях чрезвычайно разнообразна: принимает участие в фосфорилировании белков, синтезе нуклеиновых кислот и других органических соединений, играет ключевую роль в передаче энергии и т.д. Практически нет таких физиологических функций, в которых бы фосфорная кислота и ее соединения не принимали бы непосредственного участия. Отмечаются значительные колебания содержания фосфора в вегетативных органах и высокая стабильность в репродуктивных. Небольшое количество фосфора содержится в крахмале.

Соли ортофосфорной кислоты – главный источник фосфора для растений. Преобладающее значение в фосфорном питании растений имеет анион  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

Адекватное снабжение растений фосфором необходимо в первую очередь для нормального развития корневой системы [11, 17]. Фосфор как элемент минерального питания спо-

собен реутилизоваться, т. е. повторно использоваться растением. Фосфор, в отличие от азота, войдя в клетку в виде кислотного остатка фосфорной кислоты, так и включается в органические соединения. В таком виде он включается в органические соединения и переходит из одного соединения в другое при их взаимных превращениях, не претерпевая при этом никаких окислительно-восстановительных изменений. Весь фосфорный обмен растений сводится к образованию связей между остатком ортофосфорной кислоты и молекулой того или иного органического вещества.

При большом количестве в почве и энергичном поглощении часть ионов не успевает перерабатываться растением и может быть обнаружена в клеточном соке. Это указывает на высокую обеспеченность растений фосфором. Недостаток в почве указанных ионов снижает их количество в клеточном соке, что ведет к снижению продуктивности растений.

При содержании подвижных фосфатов менее 10 мг в 100 г почвы растения испытывают недостаток фосфора, при содержании 10-20 мг степень нуждаемости растений в фосфорных удобрениях оценивается как средняя, если содержание фосфатов больше 20 мг, считается, что растения достаточно обеспечены фосфором. В ряду растений овощные – корнеплоды – зерновые снижается потребность в доступных фосфатах.

**Цель работы:** ознакомиться с методом колориметрической и полуколичественной тканевой диагностики фосфорного питания растений.

**Задачи:**

1. Провести диагностику фосфорного питания путем колориметрического определения содержания фосфатов в листьях культурных растений;
2. Провести тканевую полуколичественную диагностику фосфорного питания;

3. Сделать вывод о потребности анализируемых растений в фосфорных удобрениях.

**Оборудование и материалы:** листья культурных растений, выращенных на почве с различным содержанием фосфатов, реактив Кирсанова,  $\text{KН}_2\text{PО}_4$ , бензидин, насыщенный уксуснокислый натрий, оловянные палочки, чашки Петри, стеклянные палочки.

*Приготовление реактива Кирсанова:* растворить при осторожном нагревании 1 г  $(\text{NH}_4)_2\text{MбO}_4$  в 20 мл воды, охладить и добавить 20 мл  $\text{HCl}$  и 160 мл воды.

### **Задание 1. Колориметрическое определение фосфатов.**

*Ход работы:*

1. Кусочки черешков листьев (1 г) раздавить их стеклянной палочкой, добавить 2–3 капли реактива и смешать его с соком, выдавленным из ткани.

2. При этом необходимо произвести растирание оловянной палочкой для насыщения раствора хлористым оловом (или добавить три капли раствора хлористого олова в качестве восстановителя).

3. Довести объем до 3 мл.

4. Через 5-10 минут оценить светопоглощение на колориметре с красным фильтром.

5. Оценка концентрации ионов в клеточном соке производится по калибровочной шкале.

6. Построение калибровочной шкалы осуществляют следующим образом. 0,1917 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе емкостью 1 л, доводят водой до метки, перемешивают и получают раствор с содержанием 0,1 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$  в 1 мл. Он используется как запасной. Далее из него путем разбавления получают рабочий раствор с содержанием 0,01 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$  в 1 мл. Из рабочего раствора готовят серию эталонных растворов. Берут 10



мерных колб емкостью 50 мл и в каждую из них наливают бюреткой указанные ниже количества рабочего раствора  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  (см. таблицу 18) с содержанием 0,01 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$  в 1 мл.

Таблица 18

Приготовление эталонных растворов  $\text{P}_2\text{O}_5$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Количество мл рабочего раствора	0,5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Содержание $\text{P}_2\text{O}_5$	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25

Из каждого эталонного раствора берут аликвоту 3 мл и проводят окрашивание по той же схеме, что и для исследуемых растворов, так же определяют светопоглощение, результаты заносят в таблицу 19.

Таблица 19

Светопоглощение эталонных растворов

Содержание $\text{P}_2\text{O}_5$	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
Светопоглощение										

7. Калибровочный график вычерчивают, откладывая на оси ординат величины оптической плотности эталонных растворов, а на оси абсцисс - концентрацию этих растворов, после чего проводят прямую от начала координат через пересечение перпендикуляров, восстановленных из отложенных на оси абсцисс и на оси ординат точек.

8. Измерив оптическую плотность анализируемого раствора, находят на оси ординат точку, соответствующую данному значению оптической плотности, ведут из нее линию, и опускают из нее перпендикуляр на ось абсцисс. По точкам пересечения отсчитывают концентрацию определяемого вещества в данном растворе и пересчитывают на кг сырой массы.

9. Результаты представляют в виде графика, таблиц, расчетов с выводом о содержании фосфатов в тканях анализируемых растений.

**Задание 2. Полуколичественное определение фосфатов в срезах растений с их локализацией по тканям.** Фосфаты определяют путем получения отпечатка среза того или иного органа растения на фильтровальной бумаге, предварительно пропитанной раствором молибдата аммония (реактив 1) и высушенной. Лучше пользоваться прямым поперечным срезом стебля или черешка листа. Если растение не сочное (например, соломина злаковых), то на срезанный конец следует нанести каплю молибдата или на мгновение коснуться этим срезом капли раствора молибдата аммония, налитого на стекло или в чашечку.

*Ход работы:*

1. Срез растения прямо перпендикулярно (как печать) прижимают к центру небольшого (2 см в диаметре) плотного обеззоленного фильтра, не содержащего фосфорной кислоты, пропитанного раствором молибдата аммония.

2. Дав просохнуть отпечатку, на него последовательно (после просыхания каждой капли ранее нанесенного реактива) наносят по 1 капле раствора бензидина (реактив 2) и насыщенного раствора уксуснокислого натрия (реактив 3).

3. После этого появляется синяя окраска всех участков отпечатка среза на фильтровальной бумаге, где была выделена из растения фосфорная кислота. При аккуратном проведении всех операций легко удастся получить картину локализации неорганических соединений фосфора по сосудам, тканям и клеткам растения.

4. Результаты представляют в виде графика, таблиц, расчетов с выводом о содержании фосфатов в тканях анализируемых растений.

5. Анализируя интенсивность окрашивания полученных срезов, в тетради делают вывод о нуждаемости анализируемых растений в фосфоре по данным из таблицы 20.

*Реактивы:* 1. Раствор молибденовокислого аммония: 5 г молибденовокислого аммония растворяют в 100 мл холодной воды и добавляют 35 мл азотной кислоты (уд. веса 1,2). При появлении желтого осадка реактив требуется обновить.

2. Раствор бензидина: 0,1 г бензидина растворяют в 10 мл концентрированной уксусной кислоты, приливают 10 мл насыщенного водного раствора уксуснокислого натрия (реактив 3) и 50 мл дистиллированной воды. Реактив со временем теряет чувствительность и через 1-2 месяца его следует обновлять.

3. Насыщенный водный раствор уксуснокислого натрия. Для определения потребности в фосфорных удобрениях пользуются шкалой, как указано в таблице 20.

*Таблица 20*

Шкала для определения неорганического фосфора в срезах тканей растений (по Цетерлинг).

Балл	Окраска отпечатка среза на фильтровальной бумаге	Потребность растения в фосфорных удобрениях
5	Отпечаток всего среза темно-синий, отпечаток сосудистых пучков иссиня-черный	Не нуждается
4	Отпечаток всего среза синий, отпечаток сосудистых пучков темно-черный	Не нуждается или слабо нуждается
3	Отпечаток всего среза светло-синий, а сосудистых пучков – синий	Средне нуждается
2	Отпечаток всего среза серо-голубой, а сосудистых пучков – немного темнее	Нуждается
1	Отпечаток всего среза слабо серо-голубой, а сосудистых пучков – серо-голубой	Сильно нуждается
0	Нет синей окраски ни в тканях, ни в сосудистых пучках	Очень сильно нуждается

### **Контрольные вопросы**

1. Какую физиологическую роль выполняет фосфор в растениях?
2. В какой форме поступает фосфор в клетки корней растений?
3. На какой реакции основан метод определения фосфора в растениях?
4. Как меняется потребность в фосфатах у разных представителей культурных растений?
5. Какой диапазон концентраций подвижных фосфатов должен быть в почве, чтобы можно было предположить достаточную обеспеченность или дефицит?

## **Лабораторная работа № 17**

### **Тканевая диагностика калийного питания растений**

Калий принадлежит к элементам, безусловно, необходимым для растений. Большая его часть в растении находится в клеточном соке. В растении калий распределен неравномерно: его больше в тех органах и тканях, где интенсивно идут обмен веществ и деление клеток, много калия в пыльце.

Значение калия в жизни растений велико: он способствует нормальному течению фотосинтеза, усиливая отток углеводов из пластинки листа в другие органы. Калий, хотя и не входит в состав ферментов, но активизирует работу многих из них. Этот элемент увеличивает оводненность коллоидов протоплазмы благодаря более сильной способности растения под его влиянием удерживать воду, оно легче переносит кратковременные засухи, чем при недостатке калия [11, 17].

При более интенсивном накоплении углеводов в растениях в условиях хорошего калийного питания повышается содержание сахара, повышается осмотическое давление клеточного сока, а, следовательно, и зимостойкость культур. Применение калийных удобрений также приводит к увеличению накопления сахаров в корнеплодах свеклы и других культур, крахмала – в клубнях картофеля.

К другим важным физиологическим функциям относится влияние калия на образование и превращение белковых молекул, синтез аминокислот. При недостатке калия замедляется заключительный этап синтеза белка и ускоряется распад белковых молекул. Повышение уровня калийного питания способствует интенсивному поступлению азота в растение и накоплению в нем органических азотистых соединений. Влияние калия на фосфорный обмен проявляется раньше, чем на белковый.

При недостатке калия замедляется образование макроэргических соединений (процесс накопления и передачи энергии) и снижается содержание фосфора в нуклеотидах, но происходит накопление последнего в неорганической форме. Поэтому при остром недостатке калия в питании урожай сельскохозяйственных растений резко снижается. Растения потребляют калия больше, чем фосфора, но не все одинаково относятся к его недостатку в питательном растворе. Значение обеспеченности растений калием усиливается при их аммиачном питании – больше образуется белков, лучше усваивается азот.

Внешние признаки калийного голодания проявляются в побурении краев листьев и появлении на них ржавых крапинок. Старые листья желтеют, ткань постепенно отмирает, особенно по краям. Развивается так называемый краевой «ожог». При сильном калийном голодании побурение охватывает почти всю пластинку листа. Эти признаки обнаруживаются у растений, когда содержание в них калия понижается в 3-5 раз по сравнению с нормальным. При недостатке калия затягиваются развитие культур и их созревание, рост растений угнетается, побеги и стебли развиваются слабо, часто растения преждевременно погибают. Калийное голодание усиливается при избыточном внесении в почву кальция и магния и при известковании кислых почв.

Все сельскохозяйственные культуры очень нуждаются в калийных удобрениях на торфянистых, песчаных и супесчаных почвах. Высокоэффективны эти удобрения также на поймах, дерново-подзолистых серых лесных почвах, красноземах и на северных черноземах лесостепи. На перечисленных типах почв калийные удобрения применяют в сочетании с азотными и фосфорными. Лишь торфяники, поймы и луга иногда получают только калийные удобрения.

Черноземы мощные, обыкновенные и южные лучше других почв обеспечивают растения калием. Поэтому в степной зоне калийные удобрения вместе с фосфорными или азотно-фосфорными вносят под культуры, потребляющие много калия. Зерновые, бобовые и травы, возделываемые без навоза, также должны получать калий.

В зоне сухих степей и на сероземах калийные удобрения применяют только при орошении.

Все промышленные калийные удобрения легко растворимы в воде, быстро взаимодействуют с почвой и сильно адсорбируются ее коллоидами. Этим предотвращается заметное передвижение калия в почве и его вымывание из нее. Значительное влияние на передвижение калия оказывает и реакция почвы. Калий адсорбируется слабее на кислых почвах, почвы со щелочной реакцией не только задерживают калий, но и фиксируют его, закрепляют в необменной форме. Вступая в поглощающий комплекс почвы, калий вытесняет в раствор эквивалентное количество других катионов, в первую очередь кальция. В кислых почвах в обмен на ионы калия почвенный раствор обогащается ионами водорода, алюминия и марганца, неблагоприятно действующими на растения. Поэтому на кислых почвах систематическое внесение калийных солей должно сочетаться с внесением извести.

Количество калия в усвояемой культурами форме значительно колеблется даже в пределах одного поля. Если ко-

личество доступного калия в обменном и водорастворимом состоянии не превышает в почве 7-10 мг на 100 г, то сельскохозяйственные растения считаются им слабо обеспечены. В таких случаях эффективность калийных удобрений, как правило, высокая.

**Цель работы:** ознакомиться с методом полуколичественного определения калия на срезах растений.

**Задачи:**

1. Подготовить пробы для анализа;
2. Провести реакцию на калий с дипикриламином;
3. Сделать вывод о нуждаемости анализируемых растений в калийных удобрениях.

**Материалы и оборудование:** ткани исследуемых культурных растений, раствор дипикриламидата магния (3 г дипикриламида и 1,3 г окиси магния растворяют в 100 мл воды и через 15-20 часов фильтруют; обращаться осторожно, так как раствор может вызвать слабый ожог кожи), раствор HCl, стеклянная пластинка размером 10x30 или на 40 см, кружки плотной обеззоленной фильтровальной бумаги («синяя лента» или «белая лента»).

**Задание 1. Подготовка проб.** Калий определяют по реакции с дипикриламином (по Полуэктову, 1933).

*Ход работы:*

1. На стеклянную пластинку размером 10x30 или 40 см раскладывают кружки (диаметром 2 см) плотной, обеззоленной фильтровальной бумаги («синяя лента» или «белая лента»).

2. В центр такого кружка кладут поперечный срез толщиной в 1 мм стебля, или черешка листа, или другой части растения.

3. Срез придавливают на бумаге пестиком, сделанным из стеклянной палочки.

4. После этого срез сдвигают на бумаге в сторону от пятна.

5. Если растение сочное, то можно сделать отпечаток поперечного среза так, как это было описано при определении фосфора.

### **Задание 2. Определение содержания калия.**

*Ход работы:*

1. Наносят на пятно и на срез по одной капле сначала раствора дипикриламиномата магния (реактив 1), а затем HCl (реактив 2). Дипикриламиномат калия красно-оранжевого цвета, нерастворим в HCl, тогда как дипикриламиномат магния разлагается под действием HCl, выделяя дипикриламмин желтого цвета.

2. Анализ цвета проб после обработки реактивами проводят по шкале, представленной в таблице 21.

3. В тетради делают вывод о содержании калия в исследуемых растениях и об их потребности в калийных удобрениях.

*Таблица 21*

Шкала для определения калия в срезах тканей растений по Цетерлинг

Балл	Окраска пятна на фильтровальной бумаге от среза растений	Потребность растения в калийных удобрениях
5	Красно-суриковая	Не нуждается
4	Красно-оранжевая	Слабо нуждается
3	Оранжевая	Средне нуждается
2	Желто-оранжевая	Нуждается
1	Соломенно-желтая	Сильно нуждается
0	Лимонно-желтая	Очень сильно нуждается

#### **Контрольные вопросы**

1. Укажите локализацию ионов калия в растении.
2. В чем заключается роль калия в клетках растения и как, соответственно, сказывается, внесение калийных удобрений?
3. Как связан калиевый обмен с азотным и фосфорным питанием?
4. Каковы внешние признаки калийного голодания и каковы его последствия?
5. Охарактеризуйте потребность растений в калии на разных типах почв.

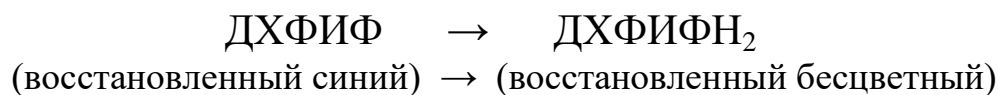


## Лабораторная работа № 18

### Функциональная диагностика питания растений по фотосинтетической активности хлоропластов

Функциональная диагностика растений позволяет оценивать не содержание отдельных элементов в тканях растений, а потребность в них. Принцип функциональной диагностики заключается в оценке уровня фотохимической активности суспензии хлоропластов средней пробы листьев [8-10, 21, 22]. Фотохимическая активность определяется последовательно в 2 этапа, до добавления элемента питания и после него. Если при добавлении определенного элемента питания фотохимическая активность суспензии хлоропластов возрастает, отмечается недостаток этого элемента, при падении – избыток, отсутствие изменений говорит об оптимально уровне обеспеченности.

Фотосинтетическая активность хлоропластов заключается в высвобождении кислорода в присутствии окислителя (акцептора электронов) в ходе так называемой реакции Хилла. Природный акцептор электронов – НАДФ заменяют другими окислителями (они получили название окислителей Хилла), например голубым красителем ДХФИФ (2,6-дихлорфенолиндофенол), который обесцвечивается после восстановления:



**Цель работы:** ознакомиться с методом функциональной диагностики питания растений по фотосинтетической активности хлоропластов.

#### **Задачи:**

1. Выделить хлоропласты из анализируемых растений методом центрифугирования в градиенте сахарозы;
2. Провести реакцию Хилла в контрольных пробах и в пробах с добавлением элемента минерального питания;

3. Сделать вывод о нуждаемости анализируемых растений в элементах минерального питания.

**Материалы и оборудование:** листья культурных растений, выращенных при дефиците/избытке/достаточной обеспеченности элемента питания; 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,0 (среда для выделения); раствор ДХФИФ (реакционная среда); растворы сахарозы; ножницы, предварительно охлажденная ступка с пестиком, марля, воронки для фильтрования, водяная баня со льдом и солью, стеклянные палочки, пробирки, центрифужные пробирки, центрифуга.

**Задание 1. Подготовка градиентов сахарозы.** Подготовьте два градиента сахарозы в 50 мл центрифужных пробирках.

*Ход работы:*

1. Внесите 5 мл 60% раствора сахарозы в нижнюю часть каждой пробирки, затем слой 5 мл 50% сахарозы, потом 10 мл 40% сахарозы в каждую пробирку. Слои должны отличаться друг от друга. (Подсказка: при добавлении каждого слоя сахарозы наконечник не касается поверхности жидкости, необходимо приливать медленно по стенке, не перемешивая слои сахарозы).

2. Кончиком пипетки Пастера аккуратно перемешайте поверхности слоев 50% и 40%.

3. Добавьте слой 5 мл 30% сахарозы сверху градиента.

4. Храните градиент на льду, пока вы готовите образец ткани. Понадобится по две пробирки с градиентом на каждые 20 мл среды для выделения.

**Задание 2. Подготовка гомогенатов тканей растения.**

**Важно!!!** Вся посуда и среда выделения должны быть охлажденными

*Ход работы:*

1. Навеску листьев гороха (4 г) измельчить ножницами в ступке, погруженной в лед.

2. Залейте в ступку охлажденную среду для выделения (20 мл).

3. Быстро разотрите листья в ступке.

4. Положите в воронку 4 слоя марли, смочив холодной средой выделения.

5. Профильтруйте гомогенат через воронку в цилиндр.

6. Соберите края марли вместе и тщательно отожмите в цилиндр.

7. Цилиндр должен находиться в воде со льдом.

### **Задание 3. Выделение хлоропластов.**

*Ход работы:*

1. Нанесите слой 10 мл фильтрата на вершину каждого из градиентов.

2. Разделите содержимое цилиндра поровну в две центрифужные пробирки и центрифугируйте 1 минут при 1000 об/мин, затем увеличьте скорость до 3000 об/мин и центрифугируйте еще 10 мин.

3. По окончании в градиенте появляются две зеленые полосы. Зеленая полоса к нижней части трубки представляет собой фракцию, содержащую неповрежденные хлоропласты.

4. Слейте надосадочную жидкость.

5. Налейте в одну пробирку 2 мл среды выделения и ресуспендируйте осадок с помощью стеклянной палочки.

6. То же повторить со второй центрифужной пробиркой.

7. Объем довести до 10 мл и на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром (640-680 нм) определить светопоглощение, разбавить суспензию до показаний 0,26, что соответствует концентрации хлорофилла 10мкг/мл.

8. Полученную суспензию хлоропластов держать на льду в темноте и использовать для изучения реакции Хилла.

**Задание 4. Измерение фотосинтетической активности хлоропластов.** Осуществляется колориметрическим ме-

тодом с использованием красного светофильтра (640-680 нм). Раствор ДХФИФ должен быть комнатной температуры.

*Ход работы:*

1. Вначале измеряют оптическую плотность суспензии хлоропластов в пробе (0,5 мл суспензии хлоропластов + 5 мл раствора ДХИФХ), затем кювету с суспензией 20-30 секунд освещают источником света и вторично измеряют оптическую плотность. Разность между первым и вторым измерениями составляет значение активности хлоропластов.

2. В следующую пробу вносят исследуемый элемент питания и также определяют активность хлоропластов. в суспензию добавляют исследуемый элемент в концентрации  $10^{-4}$ - $10^{-10}$  М (расчеты приведите согласно таблице 22) и устанавливают потребность растения в нем по увеличению, а избыток – по уменьшению фотохимической активности в сравнении с данными контрольного измерения.

3. Активность, одинаковая с контролем, свидетельствует об оптимальной концентрации элемента.

4. Результаты определения фотосинтетической активности записывают в таблицу 23, формулируют вывод о потребности растения в элементах питания.

*Таблица 22*

Количество элемента питания для внесения в суспензию хлоропластов (объем смеси – 3 мл).

Элемент/соль	Навеска для приготовления 10 мл маточного раствора, г, с концентрацией элемента $10^{-6}$ М	Воздействующая доза, М	Сколько мл добавить к суспензии хлоропластов объемом 3 мл?
<b>P</b> ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )		$10^{-6}$ М	
<b>N</b> ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )		$10^{-6}$ М	
<b>K</b> (KCl)		$10^{-6}$ М	
<b>S</b> ( $\text{MgSO}_4$ )		$10^{-6}$ М	

Таблица 23

## Определение фотосинтетической активности хлоропластов

	Светопоглощение		Активность хлоропластов = (после – до)
	До	После засвечивания	
Контроль (без добавления элемента)			
С добавлением элемента			

**Контрольные вопросы**

1. Чем функциональная диагностика питания растений отличается от тканевой?
2. В чем заключается принцип функциональной диагностики питания по фотосинтетической активности хлоропластов?
3. Что представляет собой реакция Хилла?

**Лабораторная работа № 19****Моделирование потребности растений в минеральных элементах при гидропонном выращивании**

Гидропоника представляет собой способ выращивания растений на искусственных средах без почвы. Питание растения получают из питательного раствора, окружающего корни. Это позволяет регулировать условия выращивания растений – создавать режим питания для корневой системы, полностью обеспечивающий потребности растений в питательных элементах, концентрацию углекислого газа в воздухе, наиболее благоприятную для фотосинтеза, а также регулировать температуру воздуха и корнеобитаемого пространства, влажность воздуха, интенсивность и продолжительность освещения. Создание оптимальных условий для роста и развития растений обеспечивает получение очень высоких урожаев, лучшего качества и за более короткие сроки [5, 17, 18, 19]. Выращивание растений этим способом менее трудо-

емко, чем в почвенной культуре, вода и питательные вещества расходуются экономнее. Подача питательного раствора легко автоматизируется. В условиях гидропоники практически отпадает борьба с сорняками.

С другой стороны, при гидропонном выращивании относительно легко моделировать ситуации дефицита/избытка элементов минерального питания и установить их влияние на рост и развитие растения при хорошо контролируемых неизменных других факторах [5]. Каждый из элементов питания, поглощаемый растением, выполняет в растении определенную физиологическую роль. Соответственно при избытке/недостатке элемента изменяется внешний вид растения. Хотя изменение морфологии из-за дефицита элемента питания не является строго специфичным, по совокупности таких признаков можно выявить признаки голодания растения по элементам питания.

**Цель работы:** освоение техники гидропонного культивирования растений, изучение влияния калия, азота и фосфора на морфометрические характеристики проростков злаковых культур.

**Задачи:**

1. Провести гидропонное культивирование растений в средах с полным набором элементов минерального питания и в средах с исключением одного из элементов;
2. Изучить морфометрические признаки при культивировании на указанных питательных средах;
3. Ознакомиться с визуальными признаками голодания по калию, азоту и фосфору;
4. Сформулировать вывод о влиянии калия, азота и фосфора на морфометрические характеристики проростков злаковых культур.

**Материалы и оборудование:** среда Кнопа полная и с исключением элементов питания; соли  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,

KCl, CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 10-14-дневные проростки злаковых растений; стеклянные банки на 0,5 л с крышками; стеклянные трубочки.

**Задание 1. Приготовление питательных сред.** В качестве субстрата применяют дистиллированную воду или химически чистый песок. Как питательную смесь для водных культур чаще всего используют смесь Кнопа (г/л):

- 1) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 1,0 г или Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 1,44 г;
- 2) KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,25 г;
- 3) KCl – 0,125 г;
- 4) MgSO<sub>4</sub> – 0,25 г или MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,51 г;
- 5) FeCl<sub>3</sub> – 0,0125 г.

Для приготовления питательной смеси Кнопа требуется сделать навески солей и растворить их в 1 л дистиллированной воды. Однако при многократных приготовлениях такого раствора удобнее сделать растворы солей, исходная концентрация которых во много раз больше требуемой. Чаще всего берут концентрацию в 100 раз большую, так называемый «маточный раствор». Затем соответствующий объем концентрированного раствора, а именно 10 мл, доводят до 1 л дистиллированной водой.

Чтобы выяснить влияние минеральных элементов на рост и развитие растений, применяют смесь Кнопа с исключением отдельных макроэлементов. Пример расчета при исключении калия из среды: KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> заменяют солью NaН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, сохраняя постоянное количество фосфора. Для этого рассчитывают содержание фосфора в 0,25 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (x), а затем количество NaН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, где будет столько же фосфора, сколько в 0,25 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (y).

Аналогичные расчеты проводят для приготовления питательных смесей с исключением азота и фосфора. При исключении фосфора вместо KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> берут KCl, а при исключении азота вместо Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> добавляют CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O.

**Задание 2. Изучение эффектов дефицита отдельных элементов питания.** Опыт проводится по следующей схеме: *вариант 1* – контроль (дистиллированная вода); *вариант 2* – НРК (полная питательная смесь); *вариант 3* – НР (смесь без калия); *вариант 4* – НК (смесь без фосфора); *вариант 5* – РК (смесь без азота).

Приготовленные растворы, а также дистиллированную воду налить в стеклянные банки объемом 250-500 мл. На каждую банку следует надеть чехол из светонепроницаемой бумаги, а затем обернуть белой и закрыть капроновой крышкой с отверстиями. Через отверстия крышки пропустить корни растений так, чтобы корневая система достигла питательного раствора, а листья располагались над поверхностью крышки. Проростки должны быть одинакового размера. В одно из отверстий крышки вставить стеклянную трубку для аэрации раствора. Банки промаркировать, обозначив на них номер группы студентов, фамилии, вариант опыта, и оставить на 2-3 недели. В течение всего эксперимента контролировать уровень питательной смеси в банке и рН раствора. В случае значительного изменения реакции в питательную смесь добавить пипеткой 0,1 н HCl или 0,1 н NaOH до оптимального рН.

При необходимости доливать питательный раствор. Для снабжения корневой системы кислородом рекомендуется ежедневное продувание питательного раствора воздухом в течение двух минут.

**Задание 3. Оценка морфометрических показателей. Анализ наблюдений.** В конце эксперимента (через 7-14 дней) определить морфометрические показатели, характеризующие контрольные и опытные растения, отметить интенсивность окраски листьев, наличие признаков хлороза и некроза.



Результаты опыта записать в таблицу 24.

Таблица 24

Результаты роста злаковых проростков  
на различных питательных средах

вариант опыта	Длина, см		Листья		объем корней, см <sup>3</sup>	Масса проростка, г		Внешний вид
	надземная часть	корень	Число	площадь, см <sup>2</sup>		сырая	абсолютно сухая	

Сравнить наблюдаемые морфометрические показатели с признаками голодания по элементам питания, указанными в Приложении 2, сделать вывод о значении изученных элементов для роста и развития растений.

**Контрольные вопросы**

1. Что такое гидропоника?
2. В чем преимущество гидропонного выращивания культурных растений?
3. Что такое визуальные признаки голодания у растений и на каких органах они могут проявляться?
4. Охарактеризуйте внешние признаки голодания по калию, азоту и фосфору.

**Вопросы для текущего контроля**

**Коллоквиум 7. Минеральное питание растений.**

1. Каковы физиологические основы применения удобрений?
2. У растения, выращенного на почве с двойной дозой нитратов, определяли содержание их в корне, стебле и листьях с помощью дифениламина. Какие выводы о превращении нитратов можно сделать, если: а) ни в одном из органов нитраты не обнаружены; б) обнаружены в корне, в большом количестве в стебле и отсутствуют в листьях; в) не обнаружены в корне, в небольшом количестве обнаружены в стебле и листьях.
3. У растений с углеводным типом обмена (ячмень) и белковым (люпин), выращенных на одинаковом нитратном фоне в почве, с

помощью дифениламина обнаружено различное содержание нитратов. Более высоким оно оказалось у люпина. Почему?

4. Зависит ли интенсивность восстановления нитратов в растении от развития его листовой поверхности? Почему? Какова эта зависимость?

5. Какие листья, верхние или нижние, проявляют более выраженные симптомы голодания по азоту, калию, фосфору? Почему?

6. Как объяснить хлороз растений на почве с большим содержанием извести?

7. В каких сочетаниях лучше использовать  $KNO_3$ ,  $K_2SO_4$ ,  $KCl$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $Ca(NO_3)_2$  в качестве источников азота и калия?

8. В какой форме усваиваются из почвы N, P, K, Mg, Ca, Cu, Fe, B, Mo? В состав каких структур и химических соединений клетки они входят? В каких процессах участвуют? Назвать физиологические нарушения, вызванные недостатком этих элементов. Каковы внешние признаки страдания растений при их недостатке?

9. Какие соединения, соли или хелаты железа, лучше вносить при недостатке последнего в почве?

10. Какие меры для устранения хлороза растений надо принять, если в почве имеется достаточное количество соединений железа, но в недоступном для растений состоянии?

11. При выяснении питательных достоинств почвы на одну делянку внесли калийное удобрение, на вторую – фосфорное, на третью – азотное, четвертую – не удобряли (контроль). Наиболее высоким урожай оказался на третьей делянке, несколько ниже – на первой, а на второй делянке и в контроле был одинаковым. Каких элементов не хватает в данной почве? Почему?

12. При использовании  $Ca_3(PO_4)_2$  в качестве фосфорного удобрения под люпин и гречиху отмечается значительное повышение урожая, тогда как внесение этого удобрения под злаки эффекта не дает. Почему?

13. Почему при внесении в почву  $(NH_4)_2SO_4$  усвоение фосфатов злаками заметно улучшается?

14. Как поставить опыт, доказывающий наличие кислых корневых выделений у некоторых растений? Назвать эти растения.

15. Внесение азотных удобрений в жаркое сухое лето дало по сравнению с контрольными делянками не повышение, а некоторое снижение урожая. Почему?

16. Почему органические удобрения рекомендуется вносить в больших дозах и задолго до посева?

17. Как объяснить резкое улучшение усвоения фосфора овсом при внесении в почву сернокислого аммония?

18. Как вырастить растение без почвы? Какие условия при этом необходимо соблюдать?

19. Относится ли натрий к числу необходимых для растений элементов? Как это доказать?

20. Охарактеризуйте пути транспорта органических и минеральных веществ.

21. Кусочки черешка листовой пластинки исследуемого растения были помещены на тарелку, размяты стеклянной палочкой и облиты раствором дифениламина в серной кислоте (реактив на нитрат-ион). Черешок дал интенсивное синее окрашивание, а листовая пластинка – очень слабое. Как объяснить полученные результаты.

22. К соку, отжатому из стебля, черешка и листовой пластинки, добавили раствор дифениламина в концентрированной серной кислоте. Ни один из перечисленных объектов не дал посинения, несмотря на то, что почва, на которой выращивалось растение, была богата нитратами. Сделать вывод на основе полученных результатов.

23. Как объяснить уменьшение содержания нитратов в листьях при выставлении растения на яркий свет?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лабораторном практикуме изложен материал лабораторных работ по отдельным разделам почвенной микробиологии и физиологии растений. Раздел 1 посвящен практическим аспектам определения активности почвенных микроорганизмов, играющих важную роль в плодородии почв, минеральном питании растений, обеспечивающих взаимодействие в системе «почва-удобрение-культурные растения», а также участвующих в разложении загрязняющих почву соединений. В разделе 2 внимание уделено особенностям роста и минерального питания растений, практическая оценка которых позволяет корректно разрабатывать рекомендации по поливу и внесению минеральных удобрений при развитии растений и формировании урожая.

Использование лабораторного практикума позволит обучающимся рассматривать процесс применения удобрений в сельскохозяйственной практике комплексно – как с точки зрения микробиологии почв, так и с пониманием основ физиологии растений.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Антропогенные почвы : учебное пособие для вузов / М. И. Герасимова, М. Н. Строганова, Н. В. Можарова, Т. В. Прокофьева. – 2-е издание, исправленное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 237 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/537772> (дата обращения: 08.04.2024).
2. Афанасьева, Н. Б. Введение в экологию растений : учебное пособие для вузов / Н. Б. Афанасьева, Н. А. Березина ; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова. – Москва : МГУ, 2011. – 800 с.
3. Биология почв : учебное пособие для вузов / Ю. В. Корягин, Н. В. Корягина, А. Н. Арефьев, Е. Г. Куликова. – Москва : Юрайт, 2024. – 415 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/543585> (дата обращения: 08.04.2024).
4. Веретенников, А. В. Физиология растений : учебник / А. В. Веретенников. – 3-е издание. – Москва : Академический Проспект, 2006. – 480 с. – (Учебники для ВУЗов) (Gaudeamus).
5. Винаров, А. Ю. Агрехимия: системный анализ и компьютеризация принятия решений оптимального выбора биодобавок для роста растений : учебное пособие для вузов / А. Ю. Винаров, В. В. Челноков, Е. Н. Дирина. – 3-е издание, переработанное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 199 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/540527> (дата обращения: 08.04.2024).
6. Емцев, В. Т. Микробиология : учебник для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 8-е издание, исправленное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 428 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/535757> (дата обращения: 08.04.2024).
7. Емцев, В. Т. Сельскохозяйственная микробиология : учебник для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – Москва : Юрайт, 2024. – 197 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/538634> (дата обращения: 08.04.2024).
8. Комов, В. П. Биохимия : учебник для вузов / В. П. Комов ; редактор В. Н. Шведова. – 4-е издание, исправленное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2023. – 684 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/519746> (дата обращения: 08.04.2024).
9. Кузнецов, В. В. Физиология растений : учебник для вузов : в 2 томах. Том 1 / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – 4-е издание, переработанное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 437 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/535709> (дата обращения: 08.04.2024).
10. Кузнецов, В. В. Физиология растений : учебник для вузов : в 2 томах. Том 2 / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – 4-е издание, переработанное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 459 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/537375> (дата обращения: 08.04.2024).
11. Маркарова, Е. Н. Физиология корневого питания растений / Е. Н. Маркарова ; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова. – Москва : МГУ, 1989. – 103 с.
12. Нетрусов, А. И. Экология микроорганизмов : учебник для бакалавров / А. И. Нетрусов. – 2-е издание. – Москва : Юрайт, 2022. – 267 с. – (Бакалавр. Академический курс). – URL: <https://urait.ru/bcode/508952> (дата обращения: 02.04.2024).
13. Омелянский, В. Л. Краткий курс общей и почвенной микробиологии / В. Л. Омелянский. – Москва : Юрайт, 2023. – 173 с. – (Антология мысли). – URL: <https://urait.ru/bcode/542543> (дата обращения: 02.04.2024).

14. Панфилова, О. Ф. Физиология растений с основами микробиологии : учебник и практикум для вузов / О. Ф. Панфилова, Н. В. Пильщикова. – 2-е издание, исправленное. – Москва : Юрайт, 2024. – 183 с. – URL: <https://urait.ru/bcode/544842> (дата обращения: 02.04.2024).
15. Пильщикова, Н. В. Физиология растений с основами микробиологии : учебник / Н. В. Пильщикова. – Москва : Мир, 2004. – 184 с.
16. Практикум по микробиологии : учебное пособие / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук [и др.] ; редактор А. И. Нетрусов. – Москва : Академия, 2005. – 608 с.
17. Программирование урожая садовых культур : учебник и практикум для вузов / В. И. Копылов, Н. И. Копылов, С. И. Скляр, В. Н. Сторчоус ; редактор В. И. Копылов. – Москва : Юрайт, 2024. – 349 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/543428> (дата обращения: 02.04.2024).
18. Савина, О. В. Биохимия растений : учебное пособие для вузов / О. В. Савина. – 2-е издание, исправленное и дополненное. – Москва : Юрайт, 2024. – 227 с. – (Высшее образование). – URL: <https://urait.ru/bcode/541878> (дата обращения: 02.04.2024).
19. Сальников, А. И. Практикум по физиологии и биохимии растений : учебное пособие / А. И. Сальников, И. Л. Маслов ; Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д. Н. Прянишникова. – Пермь : Пермская ГСХА, 2014. – 300 с.
20. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии : учебное пособие / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 5-е издание, переработанное и дополненное. – Москва : Дрофа, 2004. – 256 с. – (Высшее образование).
21. Фаминцын, А. С. Обмен веществ и превращение энергии в растениях : в 2 частях. Часть 1 / А. С. Фаминцын. – Москва : Юрайт, 2024. – 241 с. – URL: <https://urait.ru/bcode/539769> (дата обращения: 02.04.2024).
22. Фаминцын, А. С. Обмен веществ и превращение энергии в растениях : в 2 частях. Часть 2 / А. С. Фаминцын. – Москва : Юрайт, 2024. – 354 с. – URL: <https://urait.ru/bcode/540213> (дата обращения: 02.04.2024).
23. Фарниев, А. Т. Почвенная микробиология : учебное пособие для вузов / А. Т. Фарниев, А. Х. Козырев, А. А. Сабанова. – 2-е издание, стереотипное. – Санкт-Петербург : Лань, 2024. – 140 с. – URL: <https://e.lanbook.com/book/387326> (дата обращения: 02.04.2024).
24. Физиология растений: метод. пос. / Сост. Л.И. Бухарина, О.В. Любимова. – Ижевск. ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2009 – 59 с.
25. Юрин, В.М. Минеральное питание, физиология стресса и адаптации растений : учеб.-метод. пособие / В. М. Юрин [и др.]. – Минск : БГУ, 2014. – 103 с.

**Приложение 1**

**Показатели, концентрация  
и осмотическое давление растворов сахарозы [25]**

Показатель шкалы рефрактоме тра	Концентрация		Осмотическ ое давление	Показатель шкалы рефрактомет ра	Концентрац ия		Осмотическ ое давление
	% по массе	моль			% по массе	моль	
1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	0,00	0,000	0,0	4,0	38	40	107,4
1	03	01	2,0	1	42	42	112,4
2	07	02	4,0	2	45	43	114,5
3	11	03	6,1	3	49	44	117,5
4	14	04	9,1	4	52	45	120,5
5	18	05	12,2	5	55	46	122,6
6	21	06	13,2	6	59	47	125,6
7	25	07	18,3	7	63	48	128,6
8	28	08	19,4	8	66	49	130,7
9	32	09	21,3	9	70	50	133,7
1,0	35	10	26,3	5,0	73	51	136,7
1	39	11	28,4	1	76	52	138,8
2	42	12	31,4	2	80	53	141,8
3	46	13	34,4	3	83	54	144,8
4	49	14	36,5	4	87	55	146,9
5	53	15	39,5	5	90	56	149,9
6	56	16	42,5	6	93	57	152,9
7	60	17	44,6	7	97	58	155,0
8	63	18	47,6	8	2,00	59	158,0
9	66	19	50,6	9	03	60	161,1
2,0	70	20	53,7	6,0	07	61	163,1
1	73	21	56,7	1,	10	62	166,1
2	77	22	58,7	2	14	63	169,1
3	80	23	61,8	3	17	64	172,2
4	84	24	63,8	4	21	65	175,2
5	87	25	66,8	5	24	66	178,3
6	90	26	69,9	6	27	67	180,3
7	94	27	71,9	7	31	68	183,3
8	97	28	74,9	8	34	69	185,4
9	1,00	29	78,0	9	38	70	187,4
3,0	04	0,030	81,0	7,0	41	71	190,4
1	07	31	83,1	1	47	72	193,4
2	11	32	85,1	2	48	73	196,5
3	14	33	88,1	3	51	74	199,6
4	18	34	90,2	4	55	75	201,6
5	21	35	93,2	5	58	76	204,6
6	24	36	96,2	6	61	77	207,7
7	27	37	98,3	7	65	78	209,7
8	31	38	101,3	8	68	79	211,7
9	35	39	104,3	9	72	80	213,7

## Приложение 2

### Визуальные признаки голодания растений по элементам питания [24]

Элемент	Симптомы недостаточности
N	Слабый рост, карликовость, склероморфизм. Отношение побеги/корни сдвинуто в пользу корней. Преждевременное пожелтение более старых листьев, их некротические концы.
P	Задержка цветения, отсутствие роста фиолетовая окраска листьев и стеблей, тенденция к скручиваю и перевертыванию листьев.
K	Белые и бурые пятна, рваный край листа, дырки, отверстия в листе, краевой ожог в листьях.
S	Сходны с симптомами азотной недостаточности. Отставание в росте растений. Листья от бледно-зеленой до кремовой и желтой окраски. Отсутствует характерный признак азотистого голодания – пожелтение всего растения.
Mg	Белые или желтые пятна на листьях сливаются, лист буреет и отмирает. При глубоком дефиците листья узкие, по цвету – красные, оранжевые, пурпурные. Наблюдается слабый рост и межжилковый хлороз старых листьев.
Ca	Гофрированные, сморщенные листья с некротическими зонами. Отсутствие верхушечных почек. Нарушение роста, связанного с делением и растяжением клеток. Ослизнение корней.
Fe	Бледно-желтая окраска ткани листьев между жилами молодых листьев, жилки остаются зелеными. Хлороз. Малая мощность растения, неурожай. Старые листья поражаются сходным образом позже.
Mn	Однородная желтизна старых и молодых листьев, а также верхушечной почки. На ранних стадиях – угнетение роста и межжилковый хлороз. На поздних стадиях межжилкового хлороза нет.
B	Отмирание верхушечных почек, закрученные, деформированные листья. Черная гниль у корнеплодов свеклы, моркови, полые кочерыжки капусты.
Zn	Ярко-желтая окраска всей поверхности листьев и зеленый цвет жилок. Желтые полосы на листьях злаков. Мелколистность верхушечных побегов. «Розеточность», «желтуха», «пятнистость листьев», «мелколистность» - признаки дефицита Zn.
Cu	Бледно-желтая окраска листьев или полосатые закрученные листья. Вдоль краев листьев хлороз с последующим некрозом.
Mo	Узкие, длинные, скрученные листья, выемки на листовой пластинке, хлороз сложных листьев, включая черешок.
Na	Растения не испытывают недостатка. Избыток проявляется в виде неоднородной пестроты, некроза верхушек листьев, краев и тканей между жилками.
Cl	Из видимых симптомов – увядание растения. Остальные специфичны для отдельных видов растений. Дефицит встречается редко.