

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. А. М. ГОРЬКОГО

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания
к летней полевой практике

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2006

ВВЕДЕНИЕ

Составители:

Г. Г. Борисова, И. С. Киселева, Г. Ф. Некрасова,
Н. Н. Фирсов, Е. В. Храмцова

Ответственный редактор Г. Г. Борисова

Физиология растений – один из классических разделов современной биологии. В рамках этой дисциплины изучаются процессы жизнедеятельности растений и способы управления данными процессами в практических целях.

Растение как целостный организм находится в постоянном взаимодействии с компонентами окружающей среды, т. е. с так называемыми экологическими факторами. Изменение экологических факторов вызывает у растений приспособительные реакции – реакции акклимации или адаптации. Растительный организм может обитать и успешно выживать только в тех условиях, где проявляются все его функции. Особенности физиологии растительного организма лежат в основе распространения растений в ценозах, биомах и биосфере в целом. Познание физиологических основ существования организмов, популяций, видов и надвидовых единиц растительности в конкретных условиях среды является важной задачей как физиологии, так и экологии растений. На стыке этих двух наук появилась новая дисциплина – экологическая физиология (экофизиология) растений.

Экофизиология растений изучает:

- физиолого-биохимические основы географического распределения растений в определенных условиях среды;
- взаимодействие растений с абиотическими и биотическими факторами, в том числе с микробными сообществами;
- механизмы акклимации и адаптации растений при изменении экологических факторов;
- роль растений в глобальных круговоротах элементов и веществ, а также в потоке энергии в биосфере.

Экофизиология растений призвана решать многие прикладные задачи, такие как прогнозирование и моделирование изменений растительности при глобальных климатических изменениях; фитомелиорация и фиторемедиация антропогенно нарушенных территорий; увеличение продуктивности фитоценозов в малых и больших экосистемах и т. д. Вполне закономерной составляющей программы подготовки физиологов растений являются практические занятия по экологической физиологии растений и микробиологии. Летний период – наиболее удобное время для такого практикума, поскольку его можно проводить непосредственно в полевых условиях: на стационарах, биостанциях, опытных станциях, в ботанических садах и др.

В Уральском государственном университете летняя полевая практика по физиологии растений и микробиологии впервые была проведена в 1978 г. Ее инициатор и первый организатор – академик Адольф Трофимович Мокроносов, бывший в ту пору заведующим кафедрой.

Образовательные задачи практики:

- введение студентов в специализацию и их дальнейшая профориентация в области физиологии и биохимии растений и микробиологии;
- освоение студентами некоторых классических и современных полевых и лабораторных методов эколого-физиологических исследований в области физиологии растений и микробиологии;
- обучение студентов методологии постановки эксперимента и развитие у них навыков решения простейших исследовательских задач;
- интеграция полученных ранее знаний по ботанике, цитологии, биохимии и другим дисциплинам.

Воспитательные задачи практики:

- знакомство преподавателей и сотрудников со студентами, распредившимися на кафедру физиологии и биохимии растений;
- ознакомление студентов с традициями кафедры;
- формирование единого коллектива студентов, преподавателей и сотрудников через совместную учебную, научную и хозяйственную деятельность.

Практика традиционно проводится на биостанции УрГУ во второй половине июля, после полевых практик по зоологии и ботанике.

Биостанция УрГУ расположена в междуречье рек Исеть и Сысерть на восточном склоне Среднего Урала. Территория ее относится к подзоне южной тайги. Почвы – подзолистого типа. Основной тип леса – сосняки ягодниковые с небольшим участием *Betula pendula* и единичными *Populus tremula*, разнотравные и орляковые. В пойме реки Сысерть развиты разнотравно-злаковые, осоковые тростниково-лабазниковые луга и древесно-кустарниковые сообщества *Alnus incana*, *Padus avium*, *Salix sp.* В окрестностях биостанции на береговых склонах южной экспозиции господствующее положение занимают представители лугово-степного и степного разнотравья: *Echinops ruthenicus*, *Stipa pennata* и др. Береговые склоны северной экспозиции – место произрастания разнотравно-мелкопапоротниковых сообществ: *Polipodium vulgare*, *Asplenium ruta-muraria*, *Systipteris fragilis*. В петрофильных сообществах широко представлены уральские скально-горно-степные эндемики: *Minuartia helmii*, *Schivereckia podolica* и др. Обилие различных видов растений в окрестностях биостанции, в том числе бореальных и степных элементов, обусловило формирование на этой территории разнообразных эколого-биологических групп растений.

Таким образом, особенности растительности территории близ биостанции позволяют рассматривать ее как удачный полигон для проведения эколого-физиологической практики.

1. ИЗМЕРЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СРЕДЫ ПРИ ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Рост и развитие растений зависят от внешних природных факторов (света, температуры, влажности и др.), которые воздействуют на такие процессы, происходящие в растениях, как фотосинтез, дыхание, транспирация, поглощение химических элементов и передвижение веществ. Для того чтобы понять, как реагируют эти процессы на изменения микроклимата, необходимо измерять отдельные его составляющие в природной среде.

1.1. Солнечная радиация

Энергия солнечного света необходима растениям для фотосинтеза, а также для осуществления фотоморфогенетических и фототропических реакций, обеспечивающих рост и развитие растений. Около 40–45 % излучаемой солнечной энергии приходится на область от 380 до 720 нм. Это видимая часть спектра. Пигменты растений поглощают излучение примерно из этой же части спектра, поэтому ее называют фотосинтетически активной радиацией – ФАР (часто границами ФАР считают более узкую часть спектра – в интервале 400–700 нм).

При изучении роли света в жизни растений обычно учитывают интенсивность радиации (Q), т. е. количество лучистой энергии, выраженное в объективных единицах, падающее на единицу освещаемой поверхности в единицу времени. Интенсивность радиации (ФАР или интегральной) выражают в ваттах на квадратный метр ($\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$), в эргах на квадратный сантиметр в секунду ($\text{эрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), в калориях на квадратный сантиметр в минуту ($\text{кал} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$) и др.

Фотометрическим аналогом интенсивности радиации является освещенность. Освещенность (I) есть отношение светового потока

к величине освещаемой поверхности, по которой он равномерно распределен. Единицей освещенности является люкс (лк) – освещенность, создаваемая источником радиации с силой света в 1 свечу на расстоянии 1 м. Отношения между единицами интенсивности радиации и освещенности представлены в табл. 1.

Таблица 1

Соотношение и приблизительный пересчет единиц света

$\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ *	$\text{Эрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	$\text{Кал} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{мин}^{-1}$	Лк
$4 \cdot 10^{-3}$	4,0	$5,72 \cdot 10^{-6}$	1,0
4,0	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$5,72 \cdot 10^{-3}$	1 000
8,0	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$11,44 \cdot 10^{-3}$	2 000
20,0	$20 \cdot 10^{-3}$	$28,6 \cdot 10^{-3}$	5 000
40,0	$40 \cdot 10^{-3}$	$57,2 \cdot 10^{-3}$	10 000
80,0	$80 \cdot 10^{-3}$	$114,4 \cdot 10^{-3}$	20 000
160,0	$160 \cdot 10^{-3}$	$228,8 \cdot 10^{-3}$	40 000
200,0	$200 \cdot 10^{-3}$	$286 \cdot 10^{-3}$	50 000
400,0	$400 \cdot 10^{-3}$	$572 \cdot 10^{-3}$	100 000

* Для работы со световой кривой (расчета квантового расхода/выхода фотосинтеза) надо учитывать, что $1 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ (общего света) $\approx 1,895 \cdot \text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (ФАР).

Как правило, приборы, используемые для измерения радиации, состоят из различных видов батарей термопар. Батарея термопар представляет собой ряд поочередно спаянных между собой двух разнородных металлов (это может быть, например, спай меди и константана). При разности температур между спаями термопары в батарее возникает напряжение, пропорциональное величине этой разности. При измерении солнечной радиации разность температур создается благодаря тому, что один спай внедряется в металлический зажим, защищенный от действия радиации, а другой находится на облучаемой поверхности. Поверхность датчика в целях предохранения от воздействия ветра и дождя обычно покрывается стеклянным колпачком, прозрачность которого ограничивает спектральную чувствительность областью от 0,3 до 3,0 мкм. По такому принципу устроен, например, пиранометр (или соляриметр) – наиболее доступный прибор в условиях учебного заведения. Освещен-

ность обычно измеряют люксметрами, к которым прилагается инструкция по эксплуатации.

1.2. Температура воздуха, почвы и воды

С температурным фактором связан весь период вегетации растений. Температура растения определяется в основном температурой среды его обитания (воздуха, почвы, воды). В то же время у растений имеются механизмы, отчасти регулирующие температуру их органов. Так, вследствие транспирации температура листьев в жаркие часы дня снижается, и тем самым предотвращается их перегрев. Благодаря дыханию температура отдельных органов растений (например, цветков) может быть выше температуры окружающей среды.

Однако, как правило, температура корней, листьев, стеблей и цветков изменяется почти синхронно с изменением температуры воздуха и почвы (или воды), лишь немного запаздывая.

Температура воздуха и температура почвы – величины чаще всего несовпадающие. Различия между этими показателями носят как сезонный, так и суточный характер. В утренние часы и в первую половину дня температура почвы обычно ниже температуры воздуха, тогда как вечером и ночью наблюдается обратная картина. Температура воды более стабильна в течение суток и медленнее изменяется по сезонам.

Физиологические процессы растений (рост и развитие, фотосинтез, дыхание, поглощение минеральных веществ и др.) имеют определенные температурные границы и некоторый оптимум, отклонение от которого ведет к снижению продуктивности растений. Часто для экологических исследований необходимо знать границы функционирования и температурные потребности растений различных видов.

Температуру измеряют с помощью приборов, действие которых основано на вызываемом ею расширении веществ (обычно жидкости) или на генерации электрического тока и излучения. Жидкостные стеклянные термометры – самые распространенные приборы для определения температуры среды, однако они непригодны для автоматической записи измерений. Для этих целей служат тер-

мографы, действие которых основано на свойстве биметаллической пластины деформироваться при изменении температуры, но эти приборы дают меньшую точность измерений.

Среди жидкостных термометров различают ртутные, со шкалой отрицательных температур не ниже точки замерзания ртути ($-38,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), спиртовые или толуоловые, со шкалой положительных температур не выше точки кипения спирта ($+70\div 75\text{ }^{\circ}\text{C}$). К ртутным относятся максимальные и разностные термометры, большинство технических и химических, прашевые, термометры психрометров, комнатные, водные и др. К спиртовым или толуоловым – все минимальные термометры, большинство комнатных, некоторые почвенные и водные.

Более совершенными являются термоэлементы и терморезисторы. Принцип действия первых основан на явлении термоэлектричества – возникновении разности потенциалов на концах термопар, термоспаи которых помещены в разные температурные условия. В терморезисторах между спаями двух разных металлов возникает электрическое сопротивление, величина которого позволяет судить о величине изменения температуры. Термопары применяют для измерения температуры поверхности листа или тела животных, измерения температуры внутри камеры, где находится растение, и т. д.

При измерении температуры любой среды (воздушной, почвенной или водной) необходимо соблюдать следующие правила:

- тип термометра (амплитуда температур, размеры и форма прибора, точность его показаний и т. д.) выбирается в соответствии с задачами предстоящих измерений;

- при измерении в субстрат необходимо погружать не только резервуар термометра, но и весь капилляр с жидкостью;

- измеряя температуру воздуха, нужно следить за тем, чтобы термометр был укрыт от прямого воздействия лучей солнца, тепла нагревательных приборов и от конвекционных потоков;

- при измерении температуры термометр выдерживают не менее 2–30 мин. в соответствии с типом термометра, его размерами и величиной тепловой инерции;

- термометр держат как можно дальше от резервуара, причем лучше за противоположный конец, чтобы не нагревать прибор руками;

– при работе со специальными термометрами (почвенный, прачевой, технический и др.), а также с термоэлементами и терморезисторами крайне важно учитывать требования, указанные в паспорте соответствующего прибора.

1.3. Влажность почвы

Для нормального роста и развития растений почва должна содержать оптимальное количество воды и воздуха.

Оптимальные условия для большинства культурных растений создаются в том случае, когда почва содержит 50–55 % воды от объема почвенных пор.

Требования растений к водному режиму почв в течение вегетационного периода изменяются и зависят от фазы их развития. Растения страдают как от недостатка, так и от избытка влаги. Чем моложе растение, тем сильнее оно реагирует на избыток и недостаток влаги в почве. Создание и поддержание оптимального водного режима почвы имеет большое значение для нормальной жизнедеятельности растений, что в конечном итоге отражается на их продуктивности.

Ход работы

Для определения влажности почвы берут в предварительно взвешенный сушильный стаканчик (почвенный бюкс) приблизительно 10–15 г почвы с нужной глубины, взвешивают ее на технических весах с точностью до 0,01 г. Затем бюкс с открытой крышкой ставят в сушильный шкаф и сушат при 105 °С в течение 6 ч, после чего бюкс с почвой вынимают из сушильного шкафа, быстро закрывают крышкой и помещают в эксикатор для охлаждения. Остывшую почву взвешивают. Все результаты взвешиваний и расчетов фиксируют в таблице (табл. 2).

Таблица 2

Форма записи результатов определения влажности почвы

№ бюкса	Масса пустого бюкса, г	Масса бюкса с сырой почвой, г	Масса бюкса с почвой после высушивания, г	Потеря от высушивания, г	Масса абсолютно сухой почвы, г	Влажность почвы, %

Влажность почвы выражают в процентах к массе абсолютно сухой почвы и определяют по следующей формуле:

$$W = (B - C) \cdot 100 / (C - A),$$

где W – влажность почвы, %; B – масса бюкса с сырой почвой, г; C – масса бюкса с почвой после высушивания, г; A – масса пустого бюкса, г.

Материалы и оборудование

1. Почвенный бур (или лопатка) для отбора почвенных образцов.
2. Сушильные стаканчики (почвенные бюксы).
3. Технические весы.
4. Сушильный шкаф.

1.4. Величина рН воды и почвы

Водородный показатель выражают величиной рН, представляющей собой десятичный логарифм концентрации ионов водорода, взятый с обратным знаком; рН определяют в интервале от 1 до 14.

Величина рН воды

Как правило, рН природных вод находится в пределах от 6,5 до 8,5 и зависит от соотношения концентраций свободного диоксида углерода и бикарбонат-иона. Более низкие значения рН могут наблюдаться в кислых болотных водах. Летом при интенсивном фотосинтезе рН может повышаться до 9,0. На величину рН влияет содержание карбонатов, гидроксидов, солей, подверженных гидролизу, гуминовых веществ и т. д. Данный показатель является индикатором загрязнения открытых водоемов при выпуске в них кислых или щелочных сточных вод.

В результате происходящих в воде химических и биологических процессов и потерь углекислоты рН воды может быстро изменяться, и этот показатель следует определять сразу же после отбора пробы, желательно на месте отбора.

Для определения рН воды применяют специальные индикаторы, а также приборы – рН-метры со стеклянными электродами. Измерение рН цветных растворов и суспензий индикаторным способом невозможно.

Электрометрический (потенциометрический) метод определения рН воды отличается большой точностью (до 0,02), он позволяет проводить исследование практически в любой воде независимо от ее окраски, мутности, концентрации в ней солей.

Метод основан на измерении разности потенциалов, возникающих на границах между внешней поверхностью стеклянной мембраны электрода и исследуемым раствором, с одной стороны, и внутренней поверхностью мембраны и стандартным раствором – с другой. Внутренний стандартный раствор стеклянного электрода имеет постоянную концентрацию ионов водорода, поэтому потенциал на внутренней поверхности мембраны не меняется. Измеряемая разность потенциалов определяется потенциалом, возникающим на границе внешней поверхности электрода и исследуемого раствора. Пределы линейной зависимости потенциала электрода от рН обусловлены свойствами стеклянного электрода. Результат определения не зависит от окраски раствора, его мутности, наличия в нем взвеси, присутствия свободного хлора, окислителей или восстановителей, повышенного содержания солей. Влияние температуры компенсируется специальным устройством, смонтированным в прибор.

Для измерения рН можно использовать потенциометры (рН-метры) различных марок. Стеклянные электроды этих приборов калибруют по буферным растворам.

Материалы и оборудование

1. Эталонные растворы, дистиллированная вода.
2. Стаканчики объемом 200 мл, фильтровальная бумага.
3. рН-метр.

Величина рН почвы

Для нормальной жизнедеятельности растений требуется определенный уровень кислотности почвы, зависящий от многих природных и антропогенных факторов. Величина рН – важнейший показатель состояния почвы, отражающий воздействие на нее кислых осадков, процессов выщелачивания, засоления, известкования, применения кислых удобрений и т. д. Величина рН не только характеризует степень деградации почвы, но и определяет меры, необходимые для восстановления ее плодородия.

В зависимости от величины рН водной суспензии почв их можно разделить на кислые (рН от 1 до 5); слабокислые (рН от 5,5 до 6,5); нейтральные (рН от 6,5 до 7,0); слабощелочные (рН от 7,0 до 8,0) и щелочные (рН от 8,0 и выше).

Ход работы

Определение рН проводят в фильтрате или, что более правильно, в суспензии до фильтрования вытяжки. Для этого в стакан помещают 2–3 г почвы и добавляют 10 мл дистиллированной воды. Необходимо хорошо встряхнуть полученную суспензию и дать ей отстояться. Величину рН в суспензии определяют с помощью рН-метра. При отсутствии рН-метра можно использовать индикаторную бумагу: полоску бумаги вводят в надосадочную жидкость и через 2–3 с сравнивают ее цвет со шкалой значений рН.

Материалы и оборудование

1. Дистиллированная вода.
2. Стаканчики объемом 50 мл, индикаторная бумага.
3. рН-метр.

1.5. Содержание кислорода в воде

Растворенный кислород находится в природной воде в виде молекул O_2 . На концентрацию кислорода в воде влияют две группы противоположно направленных процессов: одни ее увеличивают, а другие уменьшают.

К группе процессов, обогащающих воду кислородом, относятся:

- абсорбция кислорода из атмосферы;
- выделение кислорода водной растительностью в ходе фотосинтеза;
- поступление в водоем дождевых и снеговых вод, которые обычно пересыщены кислородом.

К группе процессов, уменьшающих содержание кислорода в воде, относятся реакции потребления его на окисление органических веществ:

- биологическое окисление (дыхание растительных и животных организмов, расход кислорода на окисление органических веществ микроорганизмами);
- химическое окисление (Fe^{2+} , Mn^{2+} , NO_2^- , NH_4^+ , CH_4 , H_2S).

Содержание кислорода в водах различных классов загрязнения

Класс качества воды	Уровень загрязненности воды	Насыщенность воды кислородом, %	Концентрация в воде кислорода, мг/дм ³	
			летом	зимой
I	Очень чистая	95	9	14–13
II	Чистая	80	8	12–11
III	Умеренно загрязненная	70	7–6	10–9
IV	Загрязненная	60	5–4	5–4
V	Грязная	30	3–2	5–1
VI	Очень грязная	0	0	0

Кроме того, уменьшение содержания кислорода в воде может происходить вследствие выделения его в атмосферу из поверхностных слоев, но только в том случае, если вода при данной температуре и данном давлении окажется перенасыщенной кислородом.

Концентрация кислорода определяет величину окислительно-восстановительного потенциала и в значительной мере – направление и скорость процессов химического и биологического окисления органических и неорганических соединений. Кислородный режим оказывает глубокое влияние на жизнь водоема. Например, минимальное содержание растворенного кислорода, обеспечивающее нормальное развитие рыб, составляет около 5 мг О₂/дм³. Понижение его до 2 мг/дм³ вызывает массовую гибель (замор) рыб.

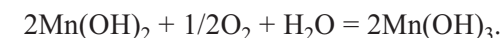
В соответствии с требованиями к составу и свойствам воды водоемов у пунктов питьевого и санитарного пользования содержание растворенного кислорода в пробе, отобранной до 12 ч дня, не должно быть ниже 4 мг/дм³ в любой период года; для водоемов рыбохозяйственного назначения концентрация растворенного в воде кислорода не должна быть ниже 4 мг/дм³ в зимний период (при ледоставе) и 6 мг/дм³ – в летний.

Данные о содержании кислорода в поверхностных водах I–VI класса качества в зимнее и летнее время приведены в табл. 3.

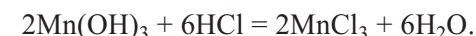
Определение содержания кислорода в поверхностных водах проводится с целью оценки условий обитания гидробионтов, в том числе растений и микроорганизмов, а также косвенной характеристики продукционного процесса в водоемах. Концентрация кислорода в воде существенна для аэробного дыхания и является индикатором биологической активности в водоеме.

Кислород – это важный экологический фактор, влияющий на развитие гидробиоты. В связи с этим определение концентрации кислорода в воде является обязательным условием при проведении мониторинга состояния водных экосистем. Величина содержания кислорода в воде зависит от природных и антропогенных факторов. Недостаток кислорода приводит к заморным явлениям в зимний период, а также к массовому отмиранию водорослей и эвтрофикации водоемов. Концентрация в воде растворенного кислорода может характеризовать самоочищающую способность водоема.

Сущность метода определения концентрации растворенного в воде кислорода (метод Винклера) заключается в том, что гидрат закиси марганца в щелочном растворе окисляется за счет растворенного в воде кислорода с образованием гидрата окиси марганца:



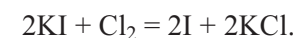
После растворения в соляной кислоте гидрат окиси марганца образует хлорный марганец:



Хлорный марганец легко распадается с выделением свободного хлора:



В присутствии йодистого калия свободный хлор выделяет из него эквивалентное количество йода:



Следовательно, два атома йода эквивалентны одному атому кислорода. Количество выделившегося йода определяется титрованием гипосульфитом.

Ход работы

1. Вода из водоема берется с соответствующей глубины батометром Руттнера. При наполнении склянок к крану батометра присоединяют резиновую или стеклянную трубку, которая опускается

через горлышко до дна склянки. Обязательно нужно следить, чтобы пузырьки воздуха не проскакивали через воду. Воде дают перелиться через верх склянки так, чтобы сменилось 2–3 объема. Склянки для анализа берут примерно равной вместимости (120–140 мл).

2. Как только склянка заполнится водой, в нее тотчас же вносят по 0,5 мл раствора сернокислого марганца и щелочного раствора йодистого калия. Склянку закрывают притертой пробкой так, чтобы под ней не осталось пузырьков воздуха, и тщательно перебалтывают содержимое. Нерастворившимся частицам дают осесть, для чего требуется около 30 мин.

3. После этого в склянку добавляют 1 мл серной или соляной кислоты, закрывают склянку пробкой и тщательно перебалтывают содержимое так, чтобы осадок полностью растворился.

4. Берут 50 мл полученной жидкости и определяют количество выделившегося йода титрованием гипосульфитом в присутствии крахмала до обесцвечивания раствора.

Концентрация растворенного кислорода в миллиграммах на литр определяется по формуле

$$x = 0,16 \cdot F \cdot n \cdot 1000 / (V_1 - V_2),$$

где F – поправка на титр 0,02 N гипосульфита; n – количество 0,02 N раствора гипосульфита, пошедшего на титрование, мл; V_1 – объем воды в склянке, мл; V_2 – объем взятых реактивов, мл.

Практика показывает, что если объемы склянок, взятых для серийных определений кислорода, разнятся не более чем на 20 мл, т. е. варьируются в пределах от 120 до 140 мл, то можно титровать не всю жидкость, находящуюся в склянке, а только часть ее – 50 или 100 мл, поскольку ошибка в вычислениях из-за неравности объемов не превышает 0,25 %. Массовые расчеты результатов очень упрощаются и могут проводиться при 50-миллилитровом объеме титруемой жидкости по следующей формуле:

$$x = 0,16 \cdot F \cdot n \cdot 1000 / 49,6 = 3,22 \cdot F \cdot n.$$

Материалы и оборудование

1. Раствор хлористого или сернокислого марганца (42,5 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ или 48 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл).

2. Щелочной раствор йодистого калия (70 г KOH или 50 г NaOH и 15 г KI растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл).

3. Химически чистая соляная кислота, разведенная дистиллированной водой в отношении 1 : 1 по объему, или химически чистая серная кислота, разведенная дистиллированной водой в отношении 1 : 3 по объему.

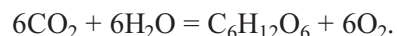
4. 0,02 N раствор гипосульфита натрия, приготовленный путем разбавления 0,2 N раствора $Na_2S_2O_3$ (каждый миллилитр 0,02 N раствора $Na_2S_2O_3$ эквивалентен 0,16 мг кислорода).

5. Штатив, бюретка, мерные колбы объемом 25 мл, электронные весы, воронка.

2. ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСИНТЕЗА

Фотоавтотрофия, или фотосинтез, – одна из важнейших функций растительного организма, процесс образования органического вещества из неорганических соединений (CO_2 и воды) при использовании энергии солнечного света, улавливаемого зеленым пигментом хлорофиллом. Фотосинтез свойствен не только растениям, но и другим организмам, таким, например, как цианобактерии, зеленые, пурпурные и гелиобактерии.

Оксигенная фотоавтотрофия сопровождается выделением кислорода. Таким образом, фотосинтез обеспечивает растение энергией, осуществляет его углеродное питание, продуцирует кислород. В масштабах биосферы глобальная роль фотосинтеза растений проявляется в создании первичной биологической продуктивности, в трансформации внешнего для Земли источника энергии – солнечного света в энергию химических связей живого вещества, в обеспечении кислородом всех аэробных организмов, в поддержании газового состава атмосферы (главным образом соотношения концентраций O_2 и CO_2). Суммарное уравнение фотосинтеза таково:



Количественная оценка фотосинтетической деятельности растений может производиться по количеству поглощенного CO_2 или выделенного O_2 и состоит в определении интенсивности фотосинтеза, под которой понимают скорость поглощения CO_2 (или выделения O_2) единицей поверхности листа (или единицей массы фотосинтезирующего органа) за единицу времени. Традиционным является расчет интенсивности фотосинтеза в миллиграммах CO_2 на квадратный дециметр в час ($\text{мг} \cdot \text{дм}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$). Учет поглощенного CO_2 или выделенного O_2 можно производить газометрическими, радиометрическими или полярографическими методами. В полевых исследованиях чаще используют первые два.

Газометрическое определение интенсивности фотосинтеза выполняют с использованием инфракрасного газоанализатора (ИКГ)

«Inflalyt-4» (Германия) и установки «проточного» (открытого) типа путем регистрации изменения концентрации CO_2 в потоке газа, проходящего через камеру с фотосинтезирующим листом. Камера термостатируется и освещается лампами ДРЛ. Для интактных (не отделенных) листьев используется камера-прищепка, для изолированных листьев – стационарные камеры.

Радиометрическое определение интенсивности фотосинтеза производят на отделенном от растения листе.

Для изучения экологических аспектов фотосинтеза в качестве объектов используют растения разных экологических групп (гидрофиты, мезофиты, ксерофиты или сциофиты и гелиофиты) или растения разных типов экологических стратегий.

2.1. Лист как специализированный орган фотосинтеза

Все биологические объекты характеризуются строгим соответствием между их структурой и функцией. Особенности внутреннего строения листа как специализированного органа фотосинтеза позволяют эффективно проводить свет к реакционным центрам фотосистем и углекислый газ к центрам карбоксилирования.

В зависимости от условий освещения типичных мест обитания растения разделяют на три группы: гелиофиты – светолюбивые растения, произрастающие в условиях полного солнечного освещения; сциофиты – растения затененных местообитаний; теневыносливые виды – растения, способные хорошо переносить сильное затенение, но произрастающие и при полной освещенности.

Условия увлажнения также могут накладывать отпечаток на внутреннее строение листа. Особенно ярко это проявляется у гидрофитов – вторичноводных высших растений.

Из группы гелиофитов в качестве объектов исследования можно взять пижму обыкновенную (*Tanacetum vulgare*) и полынь (*Artemisia sp.*), из культурных видов – мягкую пшеницу (*Triticum aestivum*) и кукурузу (*Zea mays*). Из группы сциофитов подойдут дрок красильный (*Genista tinctoria*), подмаренник северный (*Galium boreale*), черника (*Vaccinium myrtillus*). Из числа гидрофитов реко-

мендуется использовать такие растения, как ряска (*Lemna minor*) и водокрас (*Hydrocharis morsus ranae*).

Ход работы

Приготавливаются поперечные срезы листьев C_3 - и C_4 -растений. Срезы рассматриваются под микроскопом и зарисовываются. Отмечаются все структуры листа (эпидермис, мезофилл, сосудисто-проводящие пучки, устьица, межклетники и т. д.). У каждого представителя гелиофитов, сциофитов и гидрофитов подсчитывается число хлоропластов в палисадной и губчатой клетке (не менее 10 повторностей) у C_3 -растений и в клетках мезофилла и обкладки у C_4 -растений.

Измерения проводят на закончивших рост листьях среднего яруса главного побега растений. Для исследований берут сделанные бритвой или сверлом высечки из средней части листа сбоку от главной жилки.

Растения, адаптированные к произрастанию в разных условиях, различаются по типу строения мезофилла. Для видов с C_3 -фотосинтезом характерны дорсовентральный, изолатеральный (изопалисадный) и гомогенный типы строения, для C_4 -видов – анатомическое строение Kranz-типа (рис. 1).

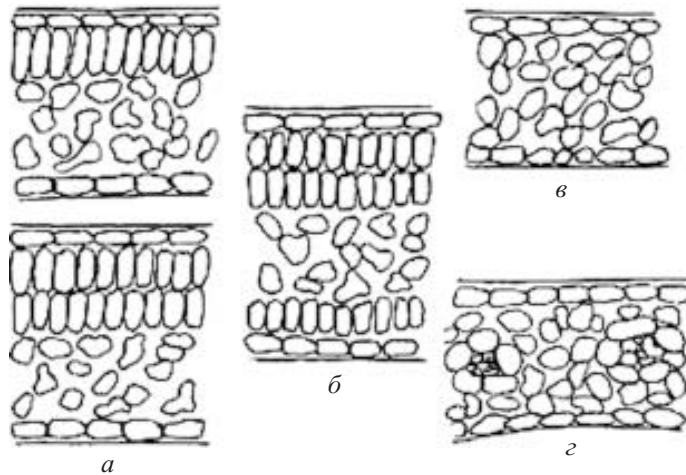


Рис. 1. Типы строения мезофилла:

а – дорсовентральный; б – изолатеральный; в – гомогенный; г – Kranz-тип

В полевых условиях поперечные срезы делают вручную с помощью бритвы и пенопласта (вместо пенопласта можно использовать паренхимные ткани клубня картофеля) (рис. 2). Во избежание разрушения тканей срезы листьев необходимо сразу же поместить в каплю изотонического раствора (трис-НСI-сорбитовый буфер с $pH = 7,4$). Полученные срезы используют для определения типа строения мезофилла и измерения толщины листа и мезофилла. Подсчитывается число слоев клеток палисадного и губчатого мезофилла.

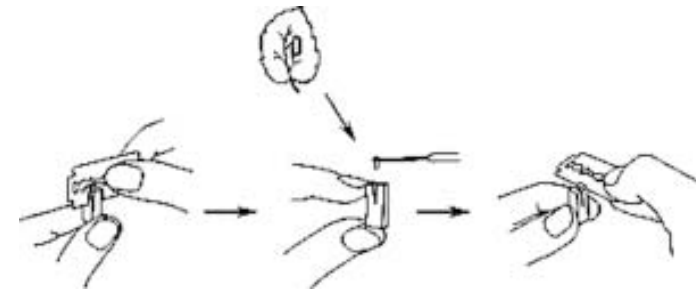


Рис. 2. Приготовление поперечного среза

Толщину листа и мезофилла измеряют на срезах листьев в 10 повторностях с помощью окуляр-микрометра (рис. 3). Необходимо помнить о том, что шкала окуляр-микрометра является условной и полученные данные будут зависеть от увеличения микроскопа, при котором проводят измерения. Пересчет полученных показаний

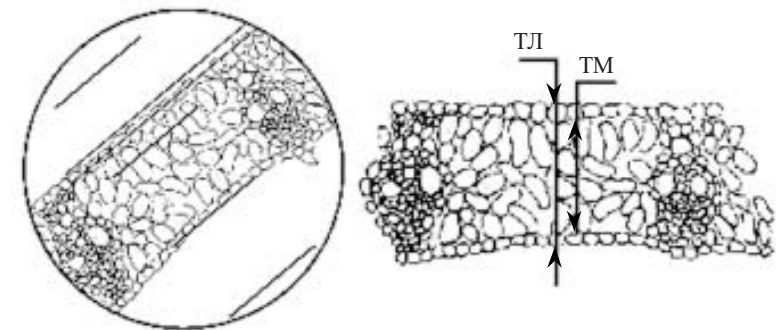


Рис. 3. Измерения с помощью окуляр-микрометра:

ТЛ – толщина листа; ТМ – толщина мезофилла

(в микрометрах) осуществляют по пропорции после определения цены деления окуляр-микрометра с помощью объект-микрометра.

Число устьиц подсчитывают в поле зрения микроскопа при одном и том же увеличении на препаратах верхнего и нижнего эпидермиса. Для пересчета количества устьиц на 1 см² листовой поверхности нужно измерить диаметр поля зрения микроскопа и рассчитать его площадь по формуле вычисления площади круга ($S = \pi r^2$).

Далее следует составить сводную таблицу показателей мезоструктуры листа у исследуемых растений (табл. 4), сделать вывод о влиянии условий произрастания на внутреннее строение фототрофных тканей и отметить, какое значение имеют обнаруженные особенности строения листа (внешнего и внутреннего) для осуществления фотосинтетической функции.

Таблица 4

Основные показатели мезоструктуры листа

Вид растения	Тип строения мезофилла	Число слоев клеток		Число устьиц в эпидермисе, тыс./см ²		Число хлоропластов в клетке, шт.	Толщина, мкм	
		палисада	губки	верхнем	нижнем		листа	мезофилла

Материалы и оборудование

1. 70 %-й этанол, трис-НСl-сорбитовый буфер с рН = 7,4 (для доведения рН раствора до 7,4 к 5 мл Н₂О добавляют 30,4 мг триса, 320 мг сорбита и 1 мл 1 N HCl; рН проверяется с помощью индикаторной бумаги). Необходимо помнить, что трис-НСl-сорбитовый буфер следует хранить в холодильнике не более двух суток.

2. Микроскоп, окуляр- и объект-микрометр.

3. Препаровальная игла, предметные и покровные стекла, бритвы, пробочные сверла, фарфоровые чашки, стеклянная палочка, салфетки марлевые, фильтровальная бумага.

2.2. Определение содержания фотосинтетических пигментов

Хлорофиллы – это фотосенсибилизаторы, основные фотосинтетические пигменты растений. Они входят в состав реакционного центра фотосистемы I и фотосистемы II, в состав светособирающих комплексов. У всех растений, высших и низших, имеется хлорофилл «а». У всех высших растений и зеленых водорослей кроме хлорофилла «а» в хлоропластах присутствует хлорофилл «b». Хлорофилл «а» всегда содержится в большем количестве, чем хлорофилл «b». Кроме хлорофиллов у высших растений в хлоропластах находятся другие фотосинтетические пигменты, выполняющие функции добавочных и входящие в структуру светособирающих комплексов, – каротиноиды. В зависимости от условий освещения соотношение хлорофиллов «а» и «b», а также концентрация других фотосинтетических пигментов – каротиноидов – могут быть неодинаковыми и свидетельствовать об обеспеченности листьев светом или об их принадлежности к светолюбивым или теневыносливым растениям.

Объектами исследования являются наземные растения из группы сциофитов и гелиофитов, листья плавающих и погруженных гидрофитов.

Ход работы

Поскольку хлорофиллы и каротиноиды – в основном липофильные соединения, их извлечение из листьев растений лучше производить с помощью смеси полярных и неполярных растворителей, в частности 80 %-м водным раствором ацетона. Пигменты извлекают из усредненной пробы 10–20 листьев каждого вида растений. Для приготовления экстракта пигментов из полностью сформированных здоровых листьев пробочным сверлом высекают диски, сырая масса которых составляет приблизительно 50–100 мг. Использование листовых высечек удобно тем, что можно точно определить и вес, и площадь образца листьев. Если листья узкие или мелкие и пробочным сверлом образец взять невозможно, берут навеску массой 50–100 мг, желательно без черешков и крупных жилок. Листовые высечки помещают в ступку, добавляют толченое стекло или

кварцевый песок, немного CaCO_3 для предотвращения феофитинизации хлорофиллов, 1–2 мл 80 %-го ацетона и тщательно растирают. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку. Ступку ополаскивают 1–2 мл 80 %-го ацетона и сливают его в пробирку; эту операцию следует повторить 2–3 раза. Центрифугированием при 8 000 об/мин в течение 10 мин. отделяют надосадочную жидкость от осадка. Супернатант сливают в мерную колбу объемом 25 мл, осадок дважды промывают и центрифугируют. Экстракты объединяют и доводят 80 %-м ацетоном до метки. Экстракт от осадка можно также отделить фильтрованием через стеклянный фильтр с помощью вакуумного насоса или фильтрованием через складчатый фильтр. Экстракцию проводят как можно быстрее, желательно на холоде и при затенении.

Содержание хлорофиллов «а», «b» и каротиноидов определяют в одном экстракте, измерив оптическую плотность вытяжки (D) на спектрофотометре при длинах волн 440,5, 649 и 665 нм. Концентрация пигментов в вытяжке рассчитывается по формулам, которые предложили Vernon (1960) для хлорофиллов (C_a , C_b , C_{a+b}) и Wettstein (1957) для каротиноидов ($C_{\text{кар}}$).

$$C_a = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649} \text{ (мг/л)}.$$

$$C_b = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665} \text{ (мг/л)}.$$

$$C_{a+b} = 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649} \text{ (мг/л)}.$$

$$C_{\text{кар}} = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268 C_{a+b} \text{ (мг/л)}.$$

Содержание хлорофиллов «а» и «b» и каротиноидов пересчитывают на единицу поверхности листа в миллиграммах на квадратный дециметр или на единицу массы в миллиграммах на грамм сырой массы. Вычисляют отношения C_a/C_b и $(C_a + C_b)/C_{\text{кар}}$.

Результаты представляют в виде таблицы или диаграммы.

В выводах объясняют различия в концентрации и соотношении пигментов у разных видов растений в зависимости от условий их произрастания.

Материалы и оборудование

1. Кварцевый песок, 80 %-й раствор ацетона.
2. Ступки, пестики.
3. Центрифуга.

2.3. Зависимость фотосинтеза от интенсивности радиации

Зависимость ассимиляции CO_2 (A) от интенсивности солнечной радиации графически выражается в виде световой кривой (Q) (рис. 4). Поскольку исследователи не всегда имеют соответствующие приборы для измерения радиации, то обычно для получения световой кривой используют градиент освещенности (измеряя ее люксметром), а затем по примерному соотношению единиц света (см. табл. 1) переводят интенсивность светового потока в интенсивность радиации, выраженную в микромолях на квадратный метр в секунду ($\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) или в других единицах радиации (см. табл. 1).

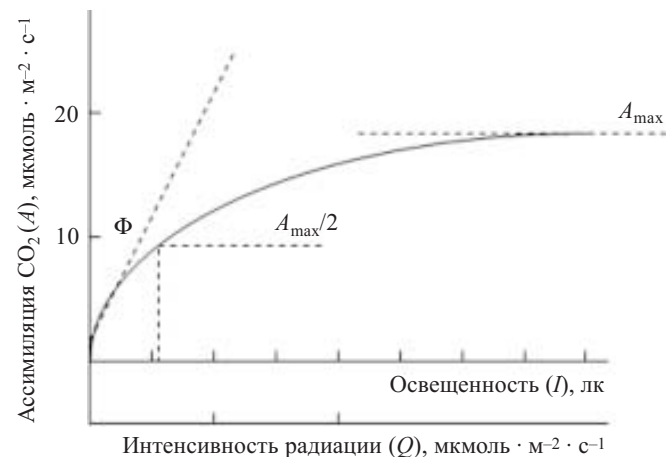


Рис. 4. Схема построения и расшифровки световой кривой [15, с. 159]

Ответная реакция ассимиляции CO_2 на изменение интенсивности радиации описывается кривой, состоящей из двух фаз. Первая фаза – линейный участок кривой – относится к тому диапазону ФАР, в котором фотосинтез лимитируется фотохимическими реакциями и отвечает линейным возрастанием показателя фиксации углекислоты на увеличение радиации. Вторая фаза – постепенное уменьшение наклона кривой по мере возрастания потока радиации. Кривая вы-

ходит на плато, когда интенсивность ассимиляции CO_2 максимальна при насыщении светом (A_{max}). С этого периода скорость поглощения CO_2 лимитируется темновыми (ферментативными) реакциями хлоропластов. Параметры световой кривой позволяют рассчитать некоторые существенные характеристики фотосинтетического аппарата любого растительного объекта:

- величину потенциального фотосинтеза при насыщающей интенсивности радиации (A_{max});
- интенсивность радиации, обеспечивающую полунасыщение фотосинтеза ($A_{\text{max}}/2$) (определяется графически);
- квантовый выход фотосинтеза (Φ), или эффективность использования света в ходе фотосинтеза, т. е. число фиксированных молей CO_2 в расчете на 1 моль квантов света, поглощенных листом. Начальный наклон световой кривой можно охарактеризовать как кажущийся максимальный квантовый выход. Слово «кажущийся» использовано потому, что оценка основана на действии падающего, а не поглощенного света. Истинный максимальный квантовый выход фотосинтеза можно определить, если учесть отраженный и пропущенный листом свет.

Поскольку с увеличением интенсивности радиации (Q) свет играет все меньшую роль как фактор, ограничивающий фотосинтез, максимальный квантовый выход может быть измерен только в том случае, когда фотосинтез строго ограничен светом и пропорционален Q , т. е. на начальном наклоне световой кривой.

Ход работы

Техника получения световой кривой заключается в следующем. Производится измерение интенсивности фотосинтеза по фиксации $^{14}\text{CO}_2$ при заданных интенсивностях света (радиации). Используется установка для определения реального фотосинтеза при 0,03 % CO_2 в проточной системе. Источник света (лампа ДРЛ-500) должен перемещаться на кронштейне так, чтобы, меняя расстояние между лампой и фотосинтетической камерой с листьями, можно было создавать заданную освещенность в диапазоне от 0,5 до 50 клк.

Измерения производят последовательно при освещенности 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10; 20; 50 клк в условиях постоянной температуры. Каждый раз, установив лампу в нужное положение по люксметру, помещают в камеру листья (можно двух-трех разных растений

одновременно) и проводят световую преадаптацию листьев в течение 5 мин. Это необходимо для того, чтобы кинетические процессы механизма фотосинтеза стабилизировались на уровне, соответствующем потоку энергии.

После этого измеряют фотосинтез включением потока $^{14}\text{CO}_2$ (концентрация 0,03 %, удельная радиоактивность 80 МБк · л⁻¹ $^{14}\text{CO}_2$, скорость потока 1,5 л · мин⁻¹). Длительность экспозиции в $^{14}\text{CO}_2$ – 5 мин. Затем листья фиксируют в парах кипящего этанола и проводят следующее измерение при более высокой освещенности. Повторность в опыте – трехкратная.

Интенсивность фотосинтеза в каждой экспериментальной точке и каждой повторности определяют после радиометрии сухих порошков листьев и выражают (через стандартный препарат) в микромолях CO_2 на квадратный метр в секунду (мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). После статистической обработки по результатам строят световую кривую и определяют вышеуказанные характеристики.

Материалы и оборудование

1. Этиловый спирт для фиксации образцов.
2. Установка для определения фотосинтеза в проточной системе с $^{14}\text{CO}_2$.
3. Термостат.
4. Плитка для нагрева спирта.
5. Радиометр для измерения радиоактивности.
6. Торсионные весы.
7. Секундомер.

2.4. Зависимость фотосинтеза от температуры

Работа проводится способом, аналогичным описанному выше, с той лишь разницей, что варьирующим фактором является температура, а не свет. Камера для поддержания в ней заданной температуры подключается к термостату.

Ход работы

Измерение интенсивности фотосинтеза проводят при температурах от 0 до +50 °С с интервалом в 5° в диапазоне от 0 до +20 °С

и от +30 до +50 °С. В диапазоне от +20 до +30 °С – с интервалом в 2°. В качестве термостатирующей жидкости в термостате используют воду с добавлением глицерина до 20 %.

По результатам измерений строят температурные кривые фотосинтеза (график зависимости интенсивности фотосинтеза от температуры). Определяют точки экстремума и оптимальные температуры для изученных видов.

В выводах объясняют возможные причины найденных видовых различий.

Материалы и оборудование

Те же, что и для получения световой кривой.

2.5. Суточный ход фотосинтеза

Для этой работы удобно использовать листья культурных растений с опытной делянки (например, листья пшеницы, картофеля и др.), листья древесных растений (дуба, березы и др.) разной экспозиции.

Ход работы

Работа предполагает слежение за основными абиотическими условиями в течение суток, поскольку интенсивность фотосинтеза определяется в данном случае при естественном освещении, влажности и температуре. Измерения этих параметров среды и интенсивности фотосинтеза проводятся через каждые 3 ч, с 6 ч до 21 ч включительно.

Результаты работы представляют в виде графиков. Характер суточного изменения интенсивности фотосинтеза сопоставляют с изменением микроклиматических условий (освещенности, температуры, влажности).

В выводах объясняют наблюдаемые изменения интенсивности фотосинтеза в течение суток.

Материалы и оборудование

Те же, что и для получения световой кривой.

3. ИЗУЧЕНИЕ ВОДНОГО РЕЖИМА И КОРНЕВОГО ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ

3.1. Водный режим растений

Все физиологические процессы в растении нормально протекают лишь при оптимальном его обеспечении водой. Водный баланс растения определяется соотношением между поглощением и отдачей воды. Вода в растение поступает благодаря работе двух концевых двигателей: нагнетающего корневого и присасывающего листового.

Деятельность нижнего концевого двигателя, состоящая в активном поглощении воды корневой системой, проявляется в «плаче» и гуттации растений. Силу, поднимающую воду вверх по сосудам, называют корневым давлением. Корневое давление играет большую роль в поглощении растением воды при подземном прорастании и в весеннее время до распускания листьев. В ночные часы корневое давление ликвидирует возникший за день водный дефицит.

Работа верхнего концевого двигателя обусловлена испарением воды с поверхности листа (транспирацией). Она основана на использовании в качестве источника энергии солнечной радиации и регулируется автоматически. У хорошо облиственных растений присасывающая сила транспирации во много раз превосходит силу корневого давления.

Растения, обитающие в воде (гидрофиты), регулируют постоянство состава внутренней среды с помощью механизмов защиты от избыточного поступления воды, которую они поглощают всей поверхностью. Первичными гидрофитами являются водоросли. Водные цветковые растения (вторичные гидрофиты, происходящие от наземных форм) совмещают свойства настоящих гидрофитов со свойствами, присущими высшим наземным растениям.

Наземным растениям, непрерывно испаряющим воду, необходим уравновешенный водный баланс, поэтому механизмы его регуляции направлены на защиту от избыточной потери воды. Однако

они неодинаковы у растений разных экологических групп. В зависимости от способности адаптировать водный обмен к колебаниям водоснабжения по Г. Вальтеру различают две группы растений: пойкилогидрические и гомойогидрические.

Пойкилогидрические растения (бактерии, сине-зеленые водоросли, низшие зеленые водоросли, грибы, лишайники и др.) приспособились переносить значительный недостаток воды без потери жизнеспособности. При этом у них снижается интенсивность обмена веществ, клетки равномерно сжимаются. Увеличение количества воды в среде приводит к возобновлению активного метаболизма в клетках пойкилогидрических растений. По характеру изменения показателей водного режима (интенсивность транспирации, осмотическое давление, содержание воды) в течение суток эти растения относятся к гидролабильным, так как у них значительно колеблется уровень содержания воды и испарения.

Гомойогидрические растения (наземные папоротникообразные, голосеменные, цветковые) составляют большинство обитателей суши. Они обладают тонкими механизмами регуляции устьичной и кутикулярной транспирации, а также корневой системой, обеспечивающей поставку воды. В связи с этим даже при значительных изменениях влажности среды у гомойогидрических растений не наблюдается резких колебаний содержания воды в клетках, в которых, как правило, развита вакуолярная система. При этом клетки не способны к обратимому высыханию.

Точная регуляция поставок и трат воды этими растениями устраняет возможность значительных колебаний уровня содержания воды в тканях, осмотического давления и транспирации. Эти показатели характеризуют гидростабильный тип водного режима данной группы растений. Стабилизации водного режима у многих видов способствуют запасы воды в корнях, стеблях, запасающих органах и т. д. Гомойогидрические растения делятся на три экологические группы.

1. Гигрофиты (тонколистные папоротники, некоторые фиалки, калужница и др.), произрастающие в условиях повышенной влажности и/или недостаточной освещенности. Теневыносливые гигрофиты с почти всегда открытыми устьицами имеют гидатоды, через которые они выделяют избыток воды в капельно-жидком состоянии. Гигрофиты плохо переносят почвенную и воздушную засуху.

2. Ксерофиты (молочай, алоэ, кактусы, полынь, ковыль и др.) преобладают в местностях с жарким и сухим климатом и хорошо приспособлены к существованию в условиях атмосферной и почвенной засухи.

3. Мезофиты (лиственные деревья, лесные и луговые травы, большинство культурных растений и т. д.) по способности регулировать водный режим занимают промежуточное положение между гигрофитами и ксерофитами.

Степень оводненности растительных тканей

Содержание воды в растительных тканях представляет собой исключительно изменчивую и динамическую величину. Оно сильно различается у разных видов, в различных частях растений, претерпевающая сезонные и суточные изменения в одних и тех же тканях. Изменения обуславливаются возрастом ткани, доступностью почвенной влаги и соотношением величин поглощения воды и транспирации.

Степень оводненности – важный показатель водного режима растений. С содержанием воды связаны концентрация клеточного сока, водный потенциал отдельных органов растения, отношение его к почвенной и атмосферной засухе.

Содержание влаги в растительных тканях обычно вычисляют в процентах сухой или сырой массы. В листьях большинства растений средней полосы в зависимости от погодных условий и этапов онтогенеза воды содержится 65–82 % сырой массы.

Ход работы

Количество воды и сухого вещества в листьях определяют весовым методом. Берут только нормально развитые, зеленые, не имеющие явных следов повреждения и подсыхания листья. Каждое определение выполняют в трехкратной повторности при навеске сырых листьев не менее 5 г.

Сначала определяют массу абсолютно сухого бюкса. Для этого чисто вымытый бюкс с крышкой, установленной вертикально, помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 100–105 °С. Через 1 ч бюкс вынимают тигельными щипцами и оставляют открытым на 30 мин. для охлаждения, затем закрывают крышкой

и взвешивают на аналитических весах. После взвешивания бюкс опять ставят в сушильный шкаф на 20–30 мин., охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Если масса бюкса не изменится, то в него можно помещать пробу.

Бюкс с растительным материалом взвешивают на аналитических весах, помещают на 5 ч в сушильный шкаф, нагретый до 105 °С, затем охлаждают в эксикаторе (бюкс должен быть открыт) и вновь взвешивают. Однако 5 ч для удаления всей влаги из растения бывает недостаточно, поэтому бюксы после взвешивания открывают и помещают в сушильный шкаф при той же температуре. Охлажденные в эксикаторе бюксы снова взвешивают. Так повторяют до тех пор, пока масса бюкса с материалом не приобретет постоянную величину.

Вычитая из массы исходного растительного материала массу высушенного материала, получают массу воды во взятой навеске. Содержание воды в навеске рассчитывают в процентах сырой и сухой массы материала.

Материалы и оборудование

1. Бюксы, щипцы, эксикатор.
2. Аналитические весы.
3. Сушильный шкаф.

Суточный ход транспирации

Основная часть воды испаряется через устьица растений. Интенсивность транспирации тем выше, чем больше количество устьиц в единице поверхности листа и чем больше степень их открытости. На интенсивность транспирации влияют условия минерального питания растений, обеспеченность водой, интенсивность освещения и многие другие факторы. Через устьица также осуществляется газообмен CO_2 и O_2 .

Периодичность суточного хода транспирации наблюдается у всех растений, но кривые, отражающие фактическую транспирацию, сильно отличаются у разных видов и у одного вида в неодинаковых погодных условиях.

У деревьев, теневыносливых растений, многих злаков (гидростабильные виды) с совершенной регуляцией устьичной транспи-

рации испарение воды достигает максимума до установления максимума дневной температуры. В полуденные часы транспирация снижается и вновь может увеличиваться в предвечерние часы при снижении температуры воздуха. Такой ход транспирации приводит к незначительным суточным изменениям осмотического давления и содержания воды в листьях. У видов, способных переносить резкие изменения содержания воды в клетках в течение дня (гидростабильные виды), наблюдается одновершинный суточный ход транспирации с максимумом в полуденные часы. В обоих случаях ночью транспирация минимальна.

Колебания интенсивности транспирации отражают изменения степени открытости устьиц в течение суток. Закрывание устьиц в полдень может быть связано как с увеличением уровня CO_2 в листьях при повышении температуры воздуха (из-за усиления дыхания и фотодыхания), так и с возможным водным дефицитом, возникающим в тканях при высокой температуре, низкой влажности воздуха, особенно в ветреную погоду. Как отмечалось, это приводит к увеличению концентрации абсцизовой кислоты и закрытию устьиц. Снижение температуры воздуха во второй половине дня способствует открыванию устьиц и усилению фотосинтеза.

Для определения интенсивности транспирации в полевых условиях наиболее удобен и доступен метод быстрого взвешивания (метод Л. А. Иванова). Основан он на учете изменения массы срезанного транспирирующего листа за короткие промежутки времени, что дает возможность наблюдать транспирацию при том состоянии насыщения листа водой, в каком он находился на растении. Интервал между взвешиваниями не должен превышать 5 мин., так как при более длительной экспозиции уменьшается содержание воды в листе и снижается интенсивность транспирации. Для быстрого взвешивания используют торсионные весы.

Ход работы

Перед началом работы устанавливают торсионные весы и проверяют «нулевую» точку. Выбранный для исследования лист быстро отделяют от растения и сразу же взвешивают. Таким же образом взвешивают листья одного и того же яруса с 10 растений. Через 5 мин. после взвешивания первого листа повторно взвешивают все

листья в первоначальном порядке. Убыль в массе листьев за время между первым и вторым взвешиваниями показывает, сколько воды испарилось за этот период. Все расчеты выполняют по суммарной массе 10 листьев. Интенсивность транспирации рассчитывают в миллиграммах испарившейся воды на грамм сырой массы листьев в час ($\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$).

Для определения суточной динамики транспирации исследования проводят с 6 ч утра до 21 ч вечера с интервалом в 3 часа.

С целью выявления особенностей транспирации у растений разных экологических групп в связи с микроклиматическими условиями среды их обитания и особенностями строения листа параллельно определению транспирации измеряют температуру воздуха, его абсолютную влажность и освещенность.

На основании полученных результатов делают выводы об особенностях транспирации у растений разных экологических групп в зависимости от микроклиматических условий среды их обитания.

Материалы и оборудование

1. Ножницы, чашки Петри.
2. Торсионные весы.

Состояние устьиц

Устьица могут располагаться на обеих сторонах листа (амфи-стоматический лист), только на нижней или только на верхней стороне листа.

Устьичные движения обуславливаются рядом причин: действием света, изменением водности тканей, температуры, концентрации углекислого газа в межклетниках и др. В условиях недостаточного водообеспечения происходит гидроактивное закрывание устьиц, причем они начинают постепенно закрываться еще до проявления каких-либо внешних признаков водного дефицита. Следовательно, степень открытости устьиц может служить физиологическим показателем для определения обеспеченности растений водой.

Определение состояния устьиц методом инфильтрации (по Молишу) основано на способности жидкостей, смачивающих клеточные оболочки, проникать через открытые устьичные щели в ближайшие межклетники, вытесняя из них воздух. При инфильтрации

межклетников соответствующие участки листа становятся прозрачными.

В качестве инфильтрующих растворов берут органические жидкости, обладающие различной вязкостью и неодинаковой способностью смачивать клеточные стенки и поэтому по-разному проникающие через устьичные отверстия в межклетники: относительно легко проникает ксилол, труднее – бензол, еще труднее – спирт. Разная способность этих жидкостей проникать в устьичные щели дает возможность определить степень открытости устьиц.

Ход работы

Состояние устьиц исследуют у растений, находящихся и в темноте, и на свету. Для этого на соседние участки нижней стороны листа последовательно наносят спирт, бензол, ксилол. Выдерживают лист в горизонтальном положении до полного исчезновения капель, которые могут либо испариться, либо проникнуть внутрь листа, и рассматривают его в проходящем свете. Если жидкость проникла в межклетники листа, то на нем появляются прозрачные пятна.

Результаты опыта заносят в таблицу (табл. 5). Знаком «плюс» – в таблице отмечают проникновение жидкости, знаком «минус» – отсутствие инфильтрации. На основании полученных данных делают заключение о степени открытости устьиц исходя из того, что при инфильтрации только ксилолом они открыты слабо, при инфильтрации ксилолом и бензолом – средне, при инфильтрации бензолом и спиртом – сильно.

Т а б л и ц а 5

Результаты изучения состояния устьиц у растений

Условия опыта (вариант)	Проникновение жидкости			Степень раскрытия устьиц
	Спирт	Бензол	Ксилол	

Материалы и оборудование

1. Спирт, бензол, ксилол.
2. Ножницы, чашки Петри.

Водоёмкость, водообеспечение и водный дефицит

Недостаток влаги в почве и воздухе нарушает у растений водообмен. Снижение оводненности тканей изменяет состояние биологических клеток, что приводит к повреждению тонкой структуры протопласта, существенным сдвигам в состоянии и деятельности всех ферментных систем и, как следствие, к нарушению обмена веществ. Уменьшение содержания воды в растении вызывает резкое снижение продуктивности фотосинтеза; интенсивность дыхания возрастает, но нарушается сопряжение окисления и фосфорилирования, в результате чего снижается энергетическая эффективность дыхания.

Показателями напряженности водного режима растений служат водный дефицит и дефицит относительной тургесцентности тканей. В обоих случаях сравнивают содержание воды в растительной ткани с количеством ее в той же ткани, находящейся в состоянии полного тургора.

В природных условиях полное насыщение листьев водой практически не наблюдается. В большинстве случаев водный дефицит у растений колеблется в пределах от 10 до 35 %.

Этот показатель хорошо коррелирует с показателем водообеспеченности растений и может быть использован для характеристики водного режима.

Ход работы

Если объекты имеют крупные листья, то целесообразно подготовить высечки, сделанные пробочным сверлом. У растений с мелкими листьями листовая пластинка используется целиком.

Перед началом работы устанавливают торсионные весы и проверяют «нулевую» точку. После этого 5 листьев или 5 листовых высечек быстро отделяют от растения, сразу же взвешивают, помещают на поверхность воды в закрытую чашку Петри и оставляют для насыщения тканей водой на 2 ч. Листья или высечки просушивают снаружи фильтровальной бумагой и снова взвешивают. После определения массы тканей, насыщенных водой, определяют массу абсолютно сухой ткани, поместив материал в сушильный шкаф. Работу выполняют в трех повторностях. Результаты исследования заносят в таблицу (табл. 6).

Таблица 6

Результаты определения водоёмкости, водообеспечения и водного дефицита

Вид растения	Исходная масса (A), мг	Масса через 2 ч (C), мг	Сухой вес (D), мг	Водоёмкость (G), %	Водообеспечение (I), %	Водный дефицит (K), %

Водоёмкость – это процентное содержание воды в 100 г насыщенной водой ткани:

$$G = (C - D) \cdot 100 / C.$$

Водообеспечение – это содержание воды в исходной ткани в процентах к содержанию воды в насыщенном листе:

$$I = (A - D) \cdot 100 / (C - D).$$

Водный дефицит – это дефицит воды в тканях в процентах к полному запасу воды в насыщенном листе:

$$K = (C - A) \cdot 100 / (C - D).$$

Для тех же объектов одновременно определяют состояние устьиц инфильтрационным методом Молиша.

Материалы и оборудование

1. Фильтровальная бумага.
2. Ножницы, чашки Петри.
3. Торсионные весы.

Водоудерживающая способность растений

В регулировании водообмена растений значительную роль играют водоудерживающие силы, которые обусловлены в основном содержанием в клетке осмотически активных веществ и способностью коллоидов к набуханию.

Водоудерживающая способность клеток зависит от условий выращивания растений, в частности от минерального питания, от гранулометрического состава почв и т. д.

Способность растений разных видов и сортов выносить обезвоживание можно определить, используя эксикаторный метод, предложенный П. А. Генкелем.

Объектами исследования являются растения разных экологических групп, различающиеся по способности удерживать воду.

Ход работы

Из листьев бритвой вырезают полоски длиной 3–4 см, помещают в бюксы и выдерживают в течение 23 ч в эксикаторе над серной кислотой (1 : 1). Затем из каждой полоски готовят по одному срезу эпидермиса, окрашивают нейтральным красным (1 : 5 000) и плазмолизируют 1 М раствором сахарозы. Подсчитывают число живых клеток (плазмолизованных) в поле зрения микроскопа. По каждому срезу подсчет ведут в двух полях зрения. Результаты опыта записывают в таблице (табл. 7).

Таблица 7

Результаты оценки водоудерживающей способности листьев

Вариант	Количество плазмолизованных клеток, % от общего количества клеток	Вывод

Материалы и оборудование

1. Серная кислота, нейтральный красный (1 : 5 000), 1 М раствор сахарозы.
2. Ножницы, лезвия бритвы, эксикаторы, предметные и покровные стекла.

Транспирационный коэффициент

При выращивании сельскохозяйственных культур большое значение имеет эффективность использования воды растениями, показателем которой служит транспирационный коэффициент – количество воды, расходуемое растением на создание единицы массы сухого вещества. На величину транспирационного коэффициента влияют условия минерального питания, обеспеченность водой, интенсивность освещения и многие другие факторы, поэтому продуктивное использование воды растением можно повысить за счет оптимальных параметров его водоснабжения и питания.

Величиной, обратной транспирационному коэффициенту, является продуктивность транспирации, выражаемая количеством грам-

мов сухой биомассы, образуемой при расходе каждых 1 000 г воды. Продуктивность транспирации у растений в умеренном климате колеблется от 1 до 8 г (в среднем 3 г) на 1 000 г израсходованной воды, а транспирационный коэффициент – от 125 до 1 000 (в среднем около 300, т. е. около 300 г воды расходуется на накопление 1 г сухих веществ). Следовательно, на синтез веществ своего тела растение использует лишь 0,2 % пропускаемой воды, остальные 99,8 % тратятся на испарение.

Значительное влияние на эффективность использования воды оказывают условия выращивания растений: чем лучше минеральное питание и влагообеспечение растений, тем выше урожай и меньше расход воды на создание единицы массы.

Показатели продуктивности использования воды обычно определяют за вегетационный период, однако следует иметь в виду, что в течение онтогенеза они меняются.

Ход работы

Определение транспирационного коэффициента и затрат воды в продукционном процессе у растений можно проводить как с использованием растений, выращиваемых в сосудах, так и с использованием растений, возделываемых на опытно-экспериментальном участке.

Для работы в песчаной культуре на питательной смеси Хогланда – Снайдерса (0,5 нормы) выращивают трех- и пятидневные растения. Для этого может быть использована яровая пшеница или другие растения из семейства злаковых. Подбирают по шесть сосудов с выравненными растениями каждого срока посева.

Из трех сосудов аккуратно извлекают трехдневные растения, из других трех – пятидневные, отмывают их корни от песка, просушивают фильтровальной бумагой и определяют начальную массу воздушно-сухого материала в каждом сосуде отдельно. Для этого растения измельчают и в открытых коробочках из кальки помещают в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105 °С, при этой температуре происходит полная инактивация всех ферментов, что предотвращает последующие изменения сухой массы. Затем материал высушивают на воздухе или в сушильном шкафу при 60 °С и взвешивают на технических весах с точностью до второго знака.

Растения в оставшихся шести сосудах (три – с трехнедельными растениями, три – с пятинедельными) нумеруют, поливают через дренажную трубку и в течение недели учитывают количество израсходованной ими воды.

Правильный учет возможен только при исключении испарения влаги корнеобитаемой средой. Для этого поверхность песка заливают расплавленным парафином, который, затвердев, дает непроницаемый для воды слой. Через неделю определяют воздушно-сухую массу растений в каждом сосуде. Работу выполняют в той же последовательности, что и при первом наблюдении.

При использовании в качестве объектов культур, выращиваемых на опытном участке, подбирают 6 растений одного сорта и одного возраста, выравненных по величине. Для этого рекомендуется использовать картофель. Три растения извлекают из почвы, отмывают корни, просушивают фильтровальной бумагой и определяют начальную массу воздушно-сухого материала. Оставшиеся три растения поливают, исключив испарение влаги корнеобитаемой средой путем мульчирования поверхности почвы, и в течение недели учитывают количество израсходованной растениями воды. Через неделю определяют воздушно-сухую массу этих растений. На основании данных о количестве израсходованной растениями воды и накопленного за этот период сухого вещества вычисляют продуктивность транспирации и транспирационный коэффициент.

Материалы и оборудование

1. Питательная смесь Хогланда – Снайдерса.
2. Сосуды для растений.
3. Технические весы.
4. Сушильный шкаф.

3.2. Синтетическая функция корня и суточный ход «плача»

Еще в ранних работах Д. Н. Прянишникова, а затем Д. А. Сабина и А. Л. Курсанова показано, что при усвоении растениями аммонийного и нитратного азота происходит быстрое включение его в амиды. Установлено, что углеводы, синтезированные в листь-

ях, поступают в корни и здесь подвергаются многоступенчатым превращениям. Через пировиноградную кислоту они включаются в окислительные превращения цикла ди- и трикарбоновых кислот. Кислоты цикла Кребса претерпевают аминирование и амидирование за счет поглощенных корнями источников азота. Основными ферментами являются глутаматсинтаза, глутаминсинтаза, глутаматдегидрогеназа, аланиндегидрогеназа и ряд аминотрансфераз (рис. 5).

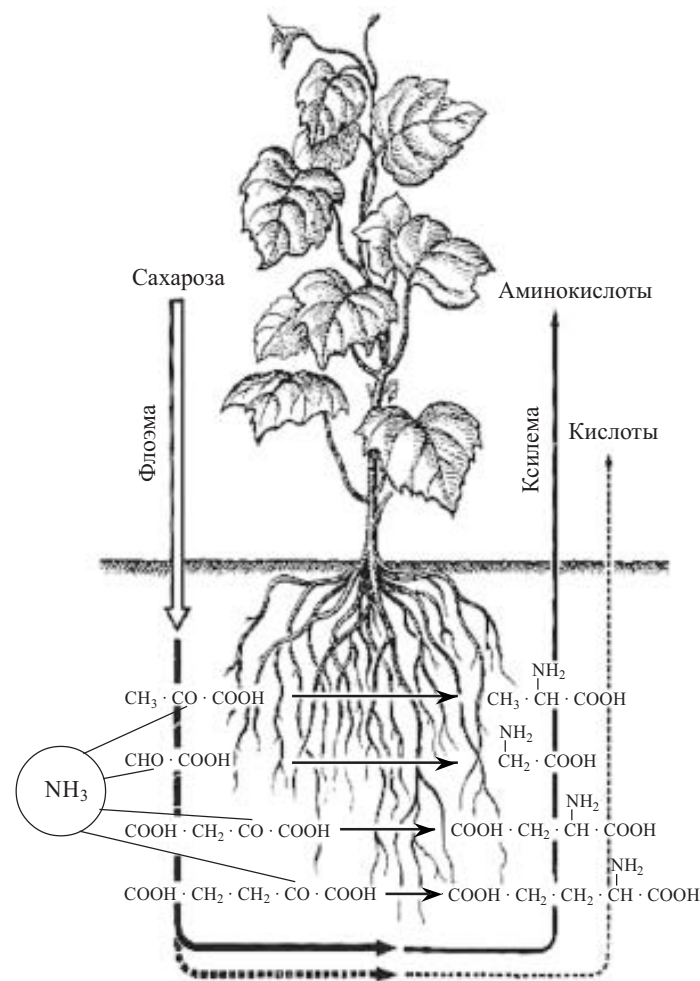


Рис. 5. Круговорот веществ через корни [3, с. 552]

Самым доступным и наглядным в полевых условиях методом изучения синтетической функции корня является сбор и качественный анализ пасоки. Пасоккой называют ксилемный сок, поступающий из корней в надземную часть растения под действием корневого (осмотического) давления и содержащий ионы, органические и неорганические вещества. Корневое давление (нижний концевой двигатель ксилемного сока) обладает большой силой – у декапитированного растения пасока продолжает поступать на поверхность среза стебля в течение 1–2 суток. Это явление называют «плачем».

Ход работы

1. Сбор пасоки

Вечером накануне постановки опыта и утром в день постановки опыта растения обильно поливают. Утром (в 8 ч) стебель опытного растения срезают острым скальпелем на уровне 3–5 см от почвы. На пенек возможно быстро надевают мягкую резиновую трубку с прикрепленной к ней изогнутой стеклянной трубкой, конец которой опускают в пробирку с 1–2 каплями толуола (антисептика) для сбора пасоки (рис. 6). В стеклянную трубку наливают немного дистиллированной воды (фиксированное количество). Если вода первое время будет впитываться в пенек, ее надо добавлять в стеклянную трубку до тех пор, пока этот процесс не прекратится.

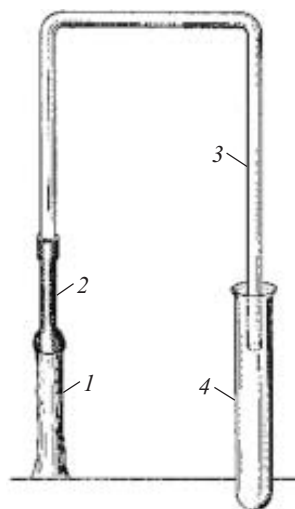


Рис. 6. Схема сбора пасоки:

1 – пенек стебля растения; 2 – резиновая трубка;
3 – стеклянная трубка; 4 – пробирка для сбора пасоки

Пасоку сливают из пробирки в течение дня трижды: в 12 ч, в 18 ч и в 22 ч. Каждый раз измеряют объем пасоки, чтобы затем оценить количество пасоки, выделенной в разное время суток. Пасоку после сбора сразу выпаривают в фарфоровых чашках на водяной бане.

Иногда используют другой, более простой, способ сбора пасоки. На поверхность среза стебля (на пенек) помещают небольшой «фитилек» треугольной формы из фильтровальной бумаги, смоченный дистиллированной водой. Острый конец его направляют в пробирку, воткнутую в почву рядом со стеблем. Всю эту настроенную для сбора пасоки систему накрывают кристаллизатором и притеняют травой или тканью. Пасоку собирают и выпаривают по вышеописанной схеме.

2. Изучение аминокислотного состава пасоки

Наиболее простой метод исследования аминокислотного состава пасоки – бумажная хроматография. Для этого предварительно размечают лист хроматографической бумаги по схеме, приведенной на рис. 7.

Далее необходимо подготовить образцы пасоки для нанесения на хроматографическую бумагу. Для этого поочередно каждый образец растворяют в 0,1 N растворе HCl в отношении 1 : 100 (т. е. в 100 раз меньшем объеме, чем исходный объем пасоки, взятой для выпаривания) и помещают на хроматограмму.

Образцы наносят на одну половину хроматограммы (см. рис. 7) в объеме 0,01; 0,02 и 0,03 мл. На вторую половину наносятся «свидетели» аминокислот: растворы аланина, аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, серина, пролина, фенилаланина. Эти аминокислоты обнаруживают в пасоке чаще других. Для приготовления растворов «свидетелей» используют стандартные порошки чистых аминокислот. На часовое стекло помещают 2–3 кристалла аминокислоты размером с маковое зерно и растворяют в 1–2 каплях 0,1 N раствора HCl. Затем в этот раствор обмакивают гладкий конец стеклянной палочки и легко касаются им стартовой линии хроматограммы, где обозначена данная аминокислота. Эту процедуру повторяют для каждой из выбранных аминокислот, меняя часовые стекла или тщательно промывая их после каждой аминокислоты.

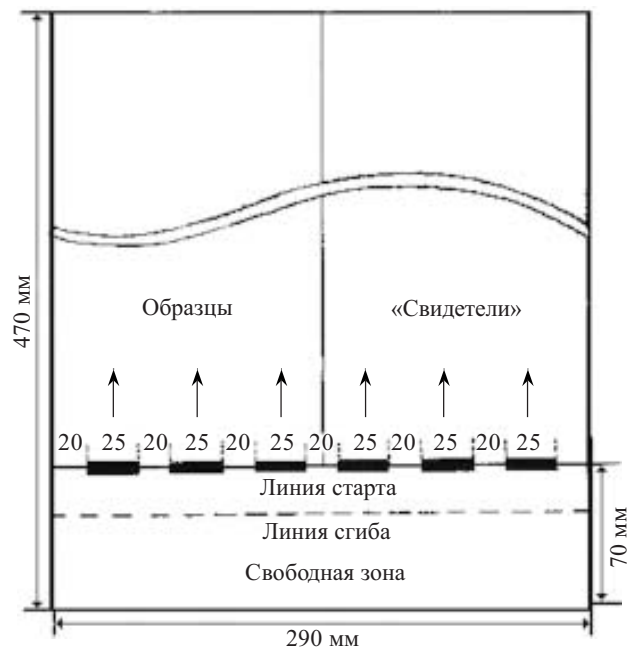


Рис. 7. Схема размещения образцов и «свидетелей» аминокислот на хроматограмме. Широкими полосками отмечены места нанесения пятен

Для того чтобы расположить несколько аминокислот на небольшом расстоянии на стартовой линии, следует совместить их по 2–3 в одном пятне. В соответствии с коэффициентом распределения (R_f) группировать аминокислоты можно следующим образом: 1 – аланин, аспарат, глутамат; 2 – фенилаланин, глутамин, серин; 3 – аспарагин, пролин.

После нанесения на хроматограмму всех пятен их подсушивают на воздухе, а затем проводят хроматографическое разделение восходящим или нисходящим током растворителя. В качестве растворителя используют смесь *n*-бутанола, муравьиной кислоты и воды в соотношении 75 : 13 : 12.

Завершив хроматографическое разделение, хроматограмму хорошо просушивают на воздухе, затем проявляют раствором нингидрина с уксуснокислым кадмием. Для этого хроматограмму опрыскивают из пульверизатора раствором нингидрина, просушивают

на воздухе, а затем прогревают в термостатированном сушильном шкафу при 80 °С в течение 5–10 мин. Можно выдержать хроматограмму после обработки нингидрином на воздухе и при обычной температуре, но более длительное время (в течение 2–3 ч).

Идентификацию аминокислот проводят по R_f и «свидетелям». После расшифровки записывают реакции возможных путей синтеза обнаруженных аминокислот, сравнивают аминокислотный состав пасоки в разные часы суток у одного растения и у растений с разной метаболической направленностью (например, у бобовых, тыквенных, амарантовых, пасленовых).

Материалы и оборудование

1. Набор аминокислот, 0,1 N HCl.
2. Бутиловый спирт, муравьиная кислота, дистиллированная вода.
3. Раствор нингидрина, полученный путем смешивания 100 мг уксуснокислого кадмия, 10 мл воды, 5 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл ацетона и 1 г нингидрина.
4. Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.
5. Хроматографическая бумага (лучше марки «Быстрая»).
6. Часовые стекла, стеклянные палочки, ножницы, линейка.
7. Пипетки на 0,1, 1,0 и 5,0 мл, стеклянные и резиновые трубки, пробирки объемом 10–15 мл, колба стеклянная объемом 200 мл, мерные цилиндры объемом 25 и 100 мл.
8. Камера для хроматографирования (ее можно заменить широким батарейным стаканом высотой не менее 50 см, если разделение будет вестись восходящим током).

4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИОННОГО ПРОЦЕССА РАСТЕНИЙ

Продукционный процесс растений – это процесс создания ими органического вещества или биомассы, результат согласованного функционирования всех органов растения. Основу продукционного процесса составляет фотосинтез, в ходе которого из неорганических веществ (CO_2 и H_2O) при использовании энергии света в растении синтезируются органические вещества. Результатом продукционного процесса растений является создание первичной биологической продуктивности.

Первичную биологическую продуктивность всей биосферы оценивают в 150–200 млрд т органического вещества в год.

Первичной биологической продуктивностью экосистемы называют образование биомассы в единицу времени единицей фитоценоза и выражают в граммах на квадратный метр почвы в сутки ($\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$). При этом учитывают сухую массу растений.

Биологический урожай растений в ценозе – это сухая масса растений (часто только их надземных органов) данного ценоза в определенный момент времени, часто в конце вегетационного сезона. Ее измеряют в килограммах на квадратный метр ($\text{кг}/\text{м}^2$) или в центнерах на гектар (ц/га).

Хозяйственная продуктивность и хозяйственный урожай – это масса хозяйственно-ценных органов и частей растений, образованная единицей ценоза, соответственно, за единицу времени или к концу вегетации растений. Отношение хозяйственно-ценного урожая к биологическому урожаю, выраженное в процентах, называют *коэффициентом хозяйственной эффективности* – $K_{\text{хоз}}$.

Для оценки продукционного процесса в естественных и агрофитоценозах используют следующие количественные показатели.

1. *Скорость роста* характеризует изменение ростовых параметров растения/ценоза во времени. Различают абсолютную скорость роста (АСР) и относительную (ОСР).

АСР в граммах в сутки ($\text{г}/\text{сут}$) определяют как прирост биомассы за единицу времени:

$$\text{АСР} = (M_2 - M_1) / (t_2 - t_1),$$

где M – сухая масса, г; t – время, сут.

ОСР в граммах на граммы в сутки ($\text{г} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) – прирост биомассы за единицу времени в расчете на единицу биомассы:

$$\text{ОСР} = (M_2 - M_1) / [0,5 \cdot (M_1 + M_2) \cdot (t_2 - t_1)],$$

где M – сухая масса, г; t – время, сут.

Этот параметр удобно использовать в сравнительных исследованиях.

2. *Чистая продуктивность фотосинтеза (ЧПФ)*, измеряемая в граммах на квадратный метр в сутки ($\text{г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$), или скорость чистой ассимиляции растения или ценоза, определяется как отношение прироста сухой биомассы растений за единицу времени в расчете на единицу поверхности листьев:

$$\text{ЧПФ} = (M_2 - M_1) / [0,5 \cdot (S_1 + S_2) \cdot (t_2 - t_1)],$$

где M – сухая масса растений, г; S – площадь листьев, м^2 ; t – время, сут.

3. *Листовой индекс (ЛИ)* – отношение суммарной площади листьев растений (выраженной в квадратных метрах) в ценозе к площади почвы (выраженной также в квадратных метрах), на которой они произрастают:

$$\text{ЛИ} = S_{\text{листв}} / S_{\text{поч}}$$

4. *Ассимиляционный потенциал растения/ценоза* – производное суммарной площади листьев растения/ценоза и длительности их функционирования. Определяется как площадь, описываемая кривой роста суммарной поверхности листьев в течение вегетации растения/ценоза. Единица измерения – квадратный метр в сутки ($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$).

Образованное в ходе продукционного процесса органическое вещество распределяется в растениях в разные органы в зависимости от их видовой специфики, стадии жизненного цикла, условий среды. Характер распределения органических веществ в растении определяет такой параметр, как структура биомассы растений и ряд морфологических индексов.

Структуру биомассы понимают как совокупность признаков, характеризующих относительную долю разных органов в массе целого растения, которая выражается в виде индекса. Например,

$$\text{Индекс листьев} = M_{\text{лист}} / M_{\text{раст}},$$

где M – сухая масса, г.

Индекс стеблей, корней и генеративных органов определяется аналогично. Эти признаки наряду с параметрами роста и морфологическим индексом (показатель, прямо пропорциональный высоте и латеральному размеру растения) позволяют не только характеризовать особенности продукционного процесса растений, но и проводить первичное определение типов экологических стратегий растений, поскольку продукционный процесс растений в условиях, типичных для вида, всегда оптимизирован.

Согласно концепции Раменского – Грайма, все местообитания растений можно дифференцировать по степени проявления стрессоров, нарушений и конкуренции. Стрессоры – это факторы среды, вызывающие в конечном итоге торможение роста растений и снижение продуктивности. К ним относят, например, водный дефицит, недостаток минеральных элементов, постоянное затенение и пр. Нарушения – это факторы, вызывающие полное или частичное уничтожение биомассы растений: механические повреждения, вспашка, поедание животными, затопление и т. д. Конкуренция возникает у растений, обитающих на одной территории, имеющих сходные экологические потребности и стремящихся максимально использовать ресурсы внешней среды (например, при высоком содержании азота в почве растения формируют большую листовую поверхность, что приводит к возникновению конкуренции за свет). По характеру типичного местообитания, занимаемого видом, различают три типа первичных экологических стратегий растений.

1. Конкуренты (виоленты, *S*-стратеги) обитают в местах с благоприятным сочетанием факторов внешней среды и низкой частотой их нарушений.

2. Рудералы (эксплеренты, *R*-стратеги) произрастают в местообитаниях с благоприятным сочетанием внешних факторов, но частым их нарушением.

3. Стресс-толеранты (пациенты, *S*-стратеги) встречаются в местах с выраженным действием стрессоров и низкой частотой его нарушений.

Помимо первичных экологических стратегий выделяют вторичные – переходные – формы: конкурентно-рудеральный (*CR*-стратегии), конкурентно-стресс-толерантный (*CS*-стратегии), смешанный (*CSR*-стратегии), стресс-толерантно-рудеральный (*SR*-стратегии, встречаются крайне редко).

Каждый тип экологических стратегий характеризуется особой структурой биомассы и определенными продукционными свойствами.

4.1. Особенности продукционного процесса у культурных растений разных видов

Объектами исследования в данном случае являются редис, ячмень или пшеница, картофель и другие культурные растения в период формирования у них хозяйственно важных органов.

Ход работы

В первый день на делянках отмечают по 20 растений, относящихся к исследуемым видам, находящихся на одной стадии развития, имеющих сходный облик и сходные морфометрические параметры. По 10 растений каждого вида выкапывают, стараясь полностью извлечь корневую систему и систему подземных побегов. Подземные органы тщательно и аккуратно отмывают. Каждое растение разделяют на листья, стебли, генеративные органы, подземные органы. Весовым методом определяют площадь листьев каждого растения. Для этого пробочным сверлом из листьев высекают 20–30 дисков определенной площади, помещают их в фарфоровые чашки и высушивают в сушильном шкафу при температуре 70 °С до постоянной массы, а затем взвешивают. Далее вычисляют соотношение между сухой массой дисков, выраженной в миллиграммах, и их площадью, выраженной в квадратных сантиметрах (мг/см²). Этот параметр называется удельной поверхностной плотностью листьев (УППЛ). Используя величину УППЛ и величину сухой мас-

сы фракции листьев (M), выраженной в миллиграммах, определяют суммарную площадь листьев, выраженную в квадратных сантиметрах, по формуле: $S = M / \text{УППЛ}$.

Аналогично высушивают и взвешивают другие органы растения. Результаты записывают. Рассчитывают средние значения массы органов и площади листьев и стандартные отклонения для каждого вида.

Через пять суток оставшиеся 10 растений каждого вида подвергают такому же анализу. На основании полученных результатов рассчитывают биомассу и параметры продукционного процесса: АСР и ОСР, ЧПФ, общую и хозяйственную продуктивность, хозяйственный урожай и коэффициент хозяйственной эффективности. Полученные данные используют для расчета морфологических индексов растений и структуры их биомассы. Результаты представляют в виде таблиц или гистограмм.

В выводах объясняют наблюдаемые различия.

Материалы и оборудование

1. Пробочное сверло, фарфоровые чашки.
2. Весы торсионные и технические.
3. Сушильный шкаф.

4.2. Параметры продукционного процесса у разных фитоценозов

Ход работы

В разных фитоценозах (луг, остепненный склон, орляковая ассоциация соснового леса и др.) закладывают по 6 площадок размером 1 м² каждая. В первый день работы на трех площадках фитоценоза каждого типа производят укос растений. Листья отделяют от нелистовых органов. Взвешивают листья и остальные части растений для определения веса сырой биомассы ($M_{\text{сыр}}$). В лабораторных условиях из усредненной пробы листьев берут образцы для определения УППЛ и расчета суммарной площади листьев (см. 4.1). По 100 г листьев и нелистовых органов растений с каждой площадки высушивают в сушильном шкафу при температуре 70 °С и определяют вес сухой биомассы ($M_{\text{сух}}$). Рассчитывают соотношение сы-

рая/сухая биомасса (I) по формуле: $I = M_{\text{сыр}}/M_{\text{сух}}$. Используя это соотношение, определяют сухую массу растений на каждой площадке по формуле: $M_{\text{сух}} = M_{\text{сыр}}/I$. Результаты, полученные по каждой из трех площадок в пределах одного ценоза, усредняют. Через 5–7 дней проводят аналогичную работу на следующих трех площадках в каждом фитоценозе. Полученные результаты используют для расчета листового индекса ценоза, его продуктивности и биологического урожая. Данные представляют в виде таблиц или гистограмм. Проводят сравнение разных фитоценозов по продуктивности.

В выводах объясняют возможные причины различий продукционного процесса в разных фитоценозах.

Материалы и оборудование

1. Технические весы.
2. Сушильный шкаф.

4.3. Структура биомассы у растений разных экологических стратегий

Для работы выбирают растения разных экологических стратегий, по три хорошо развитых особи в фазе цветения-плодоношения. Например, борщевик сибирский (*Heracleum sibiricum*) – С-стратег, местообитание – пойменный луг; марь белая (*Henopodium album*) – R-стратег, местообитание – сельхозугодья; минуарция Гельма (*Minuartia helmii*) – S-стратег, местообитание – остепненный склон. Можно выбрать другие виды растений, если известно, к какому типу экологических стратегий оно принадлежит.

Ход работы

Растения выкапывают, стараясь полностью извлечь корневую систему или подземные побеги, и помещают в ведро с водой. В лабораторных условиях их подземные органы тщательно и аккуратно отмывают. Растения разделяют на отдельные части: листья, стебли, генеративные органы и подземные органы. Все части растений взвешивают (каждую из трех повторностей – отдельно!). Для определения соотношения сырая/сухая биомасса фиксированная навес-

ка (5–10 г) каждого образца помещается в фарфоровую чашку для высушивания до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 70 °С в течение 5–6 ч. После высушивания образцы снова взвешивают и определяют соотношение сырая/сухая биомасса, которое используют для расчета сухой массы органов каждого растения. Для определения площади листьев используют весовой метод (см. 4.1). Данные заносят в таблицу (табл. 8).

Таблица 8

*Морфометрические показатели растений
разных экологических стратегий*

Вид, местообитание растения	Масса органов, г				Масса растения, г	Площадь листьев, м ²
	Листья	Стебли	Генеративные органы	Подземные органы		

Рассчитывают параметры структуры биомассы для каждого вида растений: индексы листьев, стеблей, подземных и генеративных органов, соотношение надземных и подземных органов. Результаты представляют в виде таблиц или рисунков. Проводят сравнение растений разных экологических стратегий по этим признакам.

В выводах объясняют возможные причины найденных различий.

Материалы и оборудование

1. Фарфоровые чашки.
2. Технические весы.
3. Сушильный шкаф.

4.4. Дендрохронологические показатели древесных растений

Дендрохронология представляет собой научную дисциплину, объектом изучения которой являются методы датировки исторических событий и природных явлений путем анализа годовых колец древесины. Раздел дендрохронологии, посвященный реконструк-

ции и прогнозированию климатических условий по годовым кольцам древесины, называют дендроклиматологией.

В рамках данной полевой практики знакомство с проведением дендрохронологических исследований осуществляется на материале биологической станции.

Ход работы

Для проведения исследований нужно выбрать несколько достаточно толстых (не менее 15 см в диаметре) стволов деревьев и сделать с них спилы. Наиболее подходящими являются стволы хвойных деревьев, у которых годовые кольца просматриваются четко. В качестве исходного материала можно использовать бревна из старых построек, древесину, приготовленную для строительства, а также свежие пни, оставшиеся после рубки деревьев.

Спилы делают обычной пилой, высотой не более 5–8 см. Желательно один образец приготовить из ствола с точной датой спила дерева. Это поможет в дальнейшем осуществить временную привязку при построении дендрохронологического графика.

После изготовления спилов их поверхность необходимо подготовить для точного определения ширины годовых колец. Достигается это прорезанием острым ножом полоски шириной 5–10 мм от центра спила к его периферии. Если древесина сухая и плотная, полоску такой же ширины и длины получают путем обработки спила наждачной шкуркой. В любом случае на подготовленной таким образом полоске должны четко просматриваться годовые кольца.

Вначале определяется возраст дерева, из которого изготовлен спил, для чего просто подсчитывают количество годовых колец. Нужно иметь в виду, что истинный возраст дерева, как правило, больше (на 5 лет и более), чем обнаруживаемое число годовых колец. Это связано с тем, что годовые кольца первых лет жизни деревьев могут быть разрушены; имеет также значение то, из какой части ствола изготовлен спил. Совершенно очевидно, что наиболее представительен спил из комлевой части ствола, поскольку верхняя часть его прожила меньшее количество лет.

Измерение ширины годовых колец проводят следующим образом. С помощью делителя (он входит в комплект чертежной гонимали) отмечается ширина кольца: одна игла его ставится в пре-

дыдущее углубление, а вторая – в середину следующего годичного кольца. Полученное расстояние между двумя иглами делителя измеряется штангенциркулем с возможно большей точностью. Измерение можно производить и непосредственно штангенциркулем, но в этом случае он должен быть специально заточен.

На основании полученных замеров строится график прироста древесины по годам. При этом на оси абсцисс откладываются годы, а на оси ординат – годовой прирост в миллиметрах. Если имеется образец с точной датой спила дерева, график будет иметь точную дату привязки. Так, если спил изготовлен из дерева, срубленного в 2005 г., и возраст дерева составляет 90 лет, то можно построить график прироста древесины по годам начиная с 1915 г.

В силу различных микроклиматических условий конкретного района график будет отражать температурные условия конкретных лет, количество осадков в вегетационный период, что в первую очередь влияет на прирост древесины. Для дендрохронологических исследований не имеет значения величина абсолютного прироста, главным является анализ общего характера полученной кривой, причем очень ценна фиксация фактов либо резкого увеличения прироста в конкретный год, либо, наоборот, его сокращения. По этим характерным точкам можно осуществить временную привязку следующего спила.

Конечная цель всей работы – это построение хронологического графика прироста древесины для данного района на возможно более длительный срок, сотни и даже тысячи лет. С помощью такого графика по измерению годовых колец образцов древесины можно датировать, например, возраст построек. Важно отметить, что годовые кольца могут просматриваться на углях сгоревшей древесины, при некоторых поражениях ее грибами.

Анализ годового прироста древесины за большие временные отрезки позволяет реконструировать климат конкретной местности, а также прогнозировать его изменение.

Материалы и оборудование

1. Спилы древесины хвойных растений.
2. Наждачная бумага, штангенциркуль, миллиметровая бумага для оформления результатов.

4.5. Скорость продукции и деструкции органического вещества в водоемах

Скорость образования и деструкции органического вещества можно определить по изменению содержания кислорода в замкнутом объеме воды, помещенном в условия, максимально приближенные к естественным (метод Винберга).

Разница между содержанием кислорода в исходной воде в момент заполнения склянок и его содержанием по истечении суток в затемненной склянке является показателем потребления кислорода на окисление органического вещества и характеризует деструкцию.

Разница между содержанием кислорода в светлой склянке и в затемненной склянке после суточной экспозиции ее в водоеме свидетельствует о валовой величине фотосинтеза фитопланктона. Определение концентрации растворенного кислорода ведется методом Винклера (см. 1.5). Установка со склянками изображена на рис. 8.

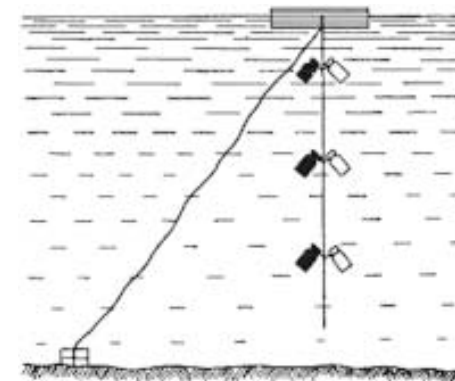


Рис. 8. Схема установки склянок

Ход работы

Заранее следует подготовить установку для подвешивания в водоеме светлых и темных склянок. Светлые склянки объемом 120–140 мл обязательно должны быть из белого стекла, с притертыми пробками. Для определения величины деструкции можно

пользоваться такими же склянками, но обязательно затемненными черной пленкой. Укреплять склянки удобно с помощью колец или крючков, заранее размещенных на определенном расстоянии друг от друга (обычно через 0,5 м).

Для одной пробы требуются три склянки: одна служит для определения начального содержания кислорода, а две другие (светлая и темная) устанавливаются в водоеме.

Все три склянки, предназначенные для заполнения из одного батометра, должны иметь один номер. Его либо проставляют на склянке несмываемым маркером, либо указывают на бирке, прикрепленной к склянке.

Правила взятия проб

1. Воду из водоема берут батометром Рутнера и из одного батометра заполняют три склянки: две светлые и одну темную. В одну из светлых склянок сразу добавляют 0,5 мл раствора сернокислого марганца и 0,5 мл щелочного раствора йодистого калия из расчета на 100 мл воды. Быстро закрывают склянки пробками. Необходимо следить, чтобы при заполнении склянок водой под пробкой не оставались пузырьки воздуха. Темную склянку и вторую светлую склянку прикрепляют к тросику для погружения в водоем, защищая их от прямых солнечных лучей.

2. Первая проба воды для заполнения склянок берется батометром с поверхностного слоя водоема. Далее отбор проб производят по вертикали через каждые 0,5 м до той глубины, где прозрачность снижается в 3 раза.

3. Тросик со всеми заполненными склянками подвешивают к буйку, к нижнему концу тросика прикрепляют грузило, чтобы склянки не унесло течением, и оставляют установку в водоеме на 24 ч.

4. Через 24 ч установку извлекают из воды и по возможности быстро во всех склянках фиксируют кислород, как указано в п. 1. После осаждения взвешенных частиц, растворения осадка кислотой и выделения йода для титрования гипосульфитом удобно брать не весь находящийся в склянке раствор, а только 50 или 100 мл. При объеме склянок от 120 до 140 мл ошибка титрования не превышает 0,25 %.

Величина продукции и деструкции органического вещества в водоеме определяется по формулам:

$$D = I - T \text{ (г/м}^3\text{); } P = C - T \text{ (г/м}^3\text{); } Ч = P - D \text{ (г/м}^3\text{),}$$

где D – величина деструкции, измеренная по кислороду, г/м³;

I – содержание кислорода в исходном образце, г/м³;

T – содержание кислорода в темной склянке через 24 ч, г/м³;

P – валовая продукция, измеренная по кислороду, г/м³;

C – содержание кислорода в светлой склянке через 24 ч, г/м³;

$Ч$ – чистая продукция органического вещества, измеренная по кислороду, г/м³.

Расчет этих характеристик проводится для всех горизонтов.

Для определения содержания в водоеме органического вещества (глюкозы) нужно полученную величину умножить на 0,93, для определения содержания углекислого газа – на 1,375, а при переводе на калории – умножить на 3,51 (табл. 9).

Таблица 9

Соотношение между величинами O₂, CO₂ и энергией в процессе фотосинтеза и деструкции при дыхательном и ассимиляционном коэффициенты, равном 1

Исходная величина	O ₂		CO ₂		Глюкоза, мг	Энергия, кал
	мг	мл	мг	мл		
1 мг O ₂	–	0,6997	1,375	0,6997	0,9375	3,510
1 мл O ₂	1,4292	–	1,9652	1,0000	0,5359	5,017
1 мг CO ₂	0,7273	0,5089	–	0,5089	0,6818	2,553
1 мл CO ₂	1,4292	1,0000	1,9652	–	1,3399	5,017
1 мг С	2,6667	1,8660	3,6667	1,8660	2,5000	9,361

Примечание. Для перевода калорий в джоули необходимо иметь в виду, что 1 кал ≈ 4,186 дж.

Материалы и оборудование

1. Реактивы для определения содержания кислорода методом Винклера:

а) раствор хлористого или сернокислого марганца (42,5 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ или 48 г $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл);

б) щелочной раствор йодистого калия (70 г КОН или 50 г NaOH и 15 г KI растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 100 мл);

в) химически чистая соляная кислота, разведенная дистиллированной водой в отношении 1 : 1 по объему, или химически чистая серная кислота, разведенная дистиллированной водой в отношении 1 : 3 по объему;

г) 0,02 N раствор гипосульфита натрия, приготовленный путем разбавления 0,2 N раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (каждый миллилитр 0,02 N раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 0,16 мг кислорода).

2. Штатив, бюретка, мерные колбы объемом 25 мл, электронные весы, воронка.

3. Светлые и темные (затемненные) склянки, тросик с приспособлениями для закрепления склянок, буюк и грузило, батометр Руттнера для забора воды с разных горизонтов глубины.

5. ИЗУЧЕНИЕ ВОДНОЙ И ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ

5.1. Микрофлора воды

Водоемы являются обычной средой обитания многих микроорганизмов: чистые воды рек содержат десятки и сотни тысяч клеток, в загрязненных водных источниках их количество исчисляется миллионами и даже миллиардами на кубический метр. Среди них находятся микроорганизмы, постоянно проживающие в этих водоемах, а также микроорганизмы, попадающие туда с осадками и сточными водами. В воде обитают различные группы микроорганизмов: бактерии, грибы, микроводоросли. Количество и видовой состав микроорганизмов зависят от количества и состава питательных веществ, находящихся в воде, температуры, аэрации, значения pH и других факторов.

Количественный учет микроорганизмов важен при изучении биологической продуктивности водоемов. Он необходим также при исследовании природных процессов очистки воды от загрязнений. Наконец, определение числа микроорганизмов чрезвычайно важно при оценке качества водоема как источника водоснабжения населения.

Существует ряд методов определения общего числа микроорганизмов в исследуемой воде. Наиболее точные результаты дает применение прямых методов учета. Они заключаются в том, что под микроскопом непосредственно подсчитывают число микроорганизмов в строго определенном объеме исследуемой воды. Для этого используют или специальные счетные камеры, или фиксированные окрашенные препараты, при приготовлении которых строго определенное количество исследуемой воды наносят на мазок определенной площади. В последнем случае подсчет клеток проводят с помощью сетчатого микрометра.

В последние годы широкое распространение получили методы, основанные на применении специальных фильтров (мембран), за-

держивающих микроорганизмы. При этом определенное количество воды пропускается через фильтр определенной площади, который затем окрашивается и осветляется иммерсионным маслом, после чего число микроорганизмов на нем можно подсчитывать под микроскопом.

В санитарной микробиологии для оценки качества воды принят тест на определение «микробного числа». «Микробное число» – это количество колоний аэробных мезофильных сапрофитных микроорганизмов, вырастающих при посеве 1 мл неразбавленной воды на мясопептонном агаре (МПА) за 24 ч при 37 °С.

При такой методике оценки большинство микроорганизмов воды не учитывается (автотрофные, нитрифицирующие, азотфиксирующие, многие грибы, анаэробные организмы, психрофильные и др.). Тем не менее сапрофитная микрофлора является важным показателем состояния и качества воды. В нашей стране принят стандарт на питьевую воду, «микробное число» которой не должно быть выше 100 (т. е. в 1 мл воды должно содержаться не более 100 сапрофитных организмов).

Ход работы

При проведении количественного учета микроорганизмов в воде большое значение имеет отбор проб. Неправильный отбор может создать ложное представление о микробном населении исследуемого источника. Так, требуется учитывать неоднородность потоков в текучих водах, атмосферные осадки, паводки, смывающие в водоемы почву и нечистоты, близость населенных пунктов и промышленных предприятий, резкие колебания температуры и др.

Следует также учитывать, что распределение микрофлоры по горизонтам варьируется весьма значительно, поэтому необходим отбор проб с различных глубин, начиная с 10–15 см от поверхности и кончая придонными пробами на расстоянии 30 см от дна.

Все приборы для отбора проб и посуда для хранения образцов воды должны быть предварительно простерилизованы.

При отборе проб из искусственного источника воды (водопровода) важно производить забор после предварительного пропуска воды через кран в течение нескольких минут, чтобы избежать их загрязнения микрофлорой, обитающей на запорной арматуре.

Отобранные пробы должны быть герметично закрыты до анализа, их сохраняют не более 1–3 ч при температуре +4 °С.

Определение общего числа микроорганизмов в пробе из реки, водохранилища, источника питьевого водоснабжения (колодец, скважина) осуществляют с помощью счетной камеры Горяева.

Согласно инструкции, прилагаемой к камере, проводят подготовку прибора к измерению, после чего стерильной пипеткой образец исследуемой воды помещают в камеру и устанавливают ее на предметный столик микроскопа. Подсчет числа микроорганизмов проводят в пределах сетки камеры, а затем, исходя из объема водного образца, определяют количественное содержание микроорганизмов в 1 мл воды.

В ходе данного исследования затруднение вызывает подвижность некоторых клеток. Она может быть снята путем введения в исследуемый образец воды одной капли 5 %-го раствора фенола. Клетки гибнут, и их движение прекращается. Кроме того, необходим некоторый навык в распознавании микроорганизмов, чтобы отличить их от взвешенных в воде примесей иной природы.

Наконец, подсчет клеток может быть затруднен из-за слишком большого числа микроорганизмов в исследуемом образце. В данном случае необходимо количественное разведение образца свободной от микроорганизмов водой (например, пропущенной через бактериальный фильтр).

Измерения проводят не менее трех раз, при этом камера после очередного измерения подвергается тщательной промывке, а исследуемый образец воды перед измерением тщательно перемешивается для снятия погрешности из-за возможного оседания некоторых микроорганизмов.

В качестве результата исследования принимается среднее значение числа микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды.

Для определения «микробного числа» в лабораторных условиях предварительно готовят стерильный мясопептонный агар. Он представляет собой природную среду, содержащую все необходимые вещества для роста сапрофитных микроорганизмов (в основном бактерий). Для придания среде студенистой консистенции в нее вводят отвердитель (агар) в количестве 1,5–2,0 %.

Перед подсчетом «микробного числа» среда расплавляется на водяной бане и разливается по стерильным чашкам Петри. После застывания среды на ее поверхность стерильной пипеткой наносят 0,25–0,5 мл исследуемой воды и путем покачивания чашки распределяют воду по всей поверхности среды. Закрытые крышками чашки Петри помещают в термостат (37 °С) на 24 ч. Живые клетки сапрофитных бактерий активно развиваются на поверхности среды и образуют колонии, видимые невооруженным взглядом. Определение «микробного числа» сводится к подсчету колоний, выросших на поверхности среды, и проведению расчета на 1 мл исследуемой воды.

Измерения проводят в двух-трех повторностях. Очень важно соблюдать меры асептики, чтобы исключить попадание на среду микроорганизмов из воздуха во время разлива среды по чашкам, а также непосредственно во время посева.

Наиболее интересны эти исследования в отношении источников питьевого водоснабжения биостанции, а в качестве сравнения можно определить «микробное число» в источниках с заведомо большим числом микроорганизмов (например, в луже, оставшейся после дождя).

Материалы и оборудование

1. Стерильный мясопептонный агар.
2. Стерильные склянки объемом 150–200 мл для отбора проб, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 мл.
3. Водяная баня, термостат, обеспечивающий поддержание температуры на уровне 37 °С.

5.2. Содержание азотобактера в образцах почв и на корнях растений

Почвы, содержащие большое количество органических веществ и имеющие нейтральное или слабощелочное значение рН, обладают и хорошей азотфиксирующей способностью, что в конечном итоге определяет их высокую продуктивность.

Азотфиксирующая способность почв зависит прежде всего от развития в них свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum*.

При культивировании на питательных средах азотобактер образует характерные слизистые колонии, которые по мере старения окрашиваются в коричневый цвет. На этом основании определение содержания азотобактера (титра азотобактера) в образцах почв представляет собой достаточно простую задачу.

В лабораторных условиях готовится среда Эшби, которая не содержит азотных соединений, что исключает развитие на ней организмов, не способных к фиксации азота. В качестве отвердителя в среду добавляется агар (1,5–2,0 %).

Состав среды Эшби:

сахароза или маннит	– 20,0 г;
K ₂ HPO ₄	– 0,2 г;
MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,2 г;
NaCl	– 0,2 г;
FeSO ₄	– 0,1 г;
CaCO ₃	– 5 г;
вода дистиллированная	– 1 000 мл.

В среду рекомендуется вносить раствор микроэлементов (1 мл/л).

Состав раствора микроэлементов:

H ₃ BO ₃	– 5,0 г/л;
(NH ₄) ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	– 5,0 г/л;
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,2 г/л;
KI	– 0,5 г/л;
NaBr	– 0,5 г/л;
Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18H ₂ O	– 0,3 г/л.

Приготовленная среда стерилизуется в автоклаве при 1,0 атм в течение 25 мин. В силу особенности состава она может использоваться и без стерилизации, в этом случае ее достаточно прокипятить для расплавления агара.

Ход работы

Перед постановкой опыта среда Эшби расплавляется на водяной бане и разливается по чашкам Петри из расчета 25–30 мл на чашку. После застывания среды на ее поверхность с помощью стеклянной палочки или тонкой соломинки выкладываются комочки исследуемой почвы. Обычно их выкладывают в виде таблички (10 × 10), общее количество – 100 штук на чашку. Размер комоч-

ков – в пределах 2–3 мл в поперечнике. Чашка закрывается крышкой и помещается в термостат, где выдерживается температура 28 °С.

На вторые-третьи сутки часть комочков обрастает слизью. Чем выше азотфиксирующая способность почвы, тем большее число комочков покрывается этой тягучей, вязкой массой. Титр азотобактера конкретного образца почвы определяется в процентах. Если на поверхности среды Эшби расположены 100 комочков исследуемого образца почвы, то титр будет соответствовать числу обросших слизью комочков. Хорошие огородные почвы имеют в наших условиях титр до 80–90 %.

После определения титра азотобактера почвы проводят микроскопию слизи. Для этой цели готовят препарат негативного окрашивания и просматривают его при возможно большем увеличении. Клетки азотобактера имеют вид кофейных зерен, располагаются попарно и заключены в мощную слизистую капсулу.

Для выяснения возможности развития азотобактера в ризосфере разных растений отрезки их корней длиной 1,0–1,5 см раскладывают на поверхности застывшей в чашках Петри среды Эшби. При этом в одну чашку можно помещать отрезки корней нескольких растений.

Чашки Петри устанавливаются в термостат (28 °С) и по истечении двух-трех суток просматриваются. По появлению слизи вокруг корней судят о возможности развития азотобактера в ризосфере конкретного растения. Для того чтобы убедиться, что наличие слизи связано с развитием на корнях азотобактера, из слизи готовят препарат негативного окрашивания и микроскопируют при 400–600-кратном увеличении.

Материалы и оборудование

1. Стерильная среда Эшби (250–300 мл).
2. Водяная баня, стерильные чашки Петри, скальпели, пинцеты, тушь чертежная.
3. Микроскоп, предметные и покровные стекла.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гавриленко В. Ф.* Большой практикум по фотосинтезу: Учеб. пособие для студентов вузов / Под ред. И. П. Ермакова. М.: Издат. центр «Академия», 2003.
2. *Горленко В. М., Дубинина Г. А., Кузнецов С. И.* Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977.
3. *Курсанов А. Л.* Транспорт ассимилятов в растениях. М.: Наука, 1976.
4. *Медведев С. С.* Физиология растений: Учеб. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004.
5. *Миркин Б. М., Наумова Л. Г., Соломещ А. И.* Современная наука о растительности. М.: Логос, 2002.
6. *Мокронос А. Т., Борзенкова Р. А.* Методика количественной оценки и функциональной активности фотосинтезирующих тканей и органов // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции ВНИИ растениеводства. Т. 61, вып. 3. Л., 1978. С. 119–133.
7. *Полевой В. В.* Физиология растений. М.: Высш. шк., 1989.
8. Практикум по региональной экологии / В. Н. Большаков и др. Екатеринбург: Издат. дом «Сократ», 2003.
9. Практикум по физиологии растений / Н. Н. Третьяков, Т. В. Карнаухова, Л. А. Паничкин и др. М.: Агропромиздат, 1990.
10. Практикум по физиологии растений / Под ред. В. Б. Иванова. М.: Издат. центр «Академия», 2001.
11. Словарь понятий и терминов современной фитоценологии / Б. М. Миркин, Г. С. Розенберг, Л. Г. Наумова. М.: Наука, 1989.
12. *Теттер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И.* Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004.
13. *Федорова А. И., Никольская А. Н.* Практикум по экологии и охране окружающей среды. М.: Гуманит. издат. центр «ВЛАДОС», 2003.
14. Физиология растений: Учеб. для студентов вузов / Под ред. И. П. Ермакова. М.: Издат. центр «Академия», 2005.
15. Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения. М.: Агропромиздат, 1989.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Учебное издание

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Методические указания к летней полевой практике

Введение	3
1. Измерение основных физико-химических характеристик среды при эколого-физиологических исследованиях	6
1.1. Солнечная радиация	6
1.2. Температура воздуха, почвы и воды	8
1.3. Влажность почвы	10
1.4. Величина рН воды и почвы	11
1.5. Содержание кислорода в воде	13
2. Изучение фотосинтеза	18
2.1. Лист как специализированный орган фотосинтеза	19
2.2. Определение содержания фотосинтетических пигментов	23
2.3. Зависимость фотосинтеза от интенсивности радиации	25
2.4. Зависимость фотосинтеза от температуры	27
2.5. Суточный ход фотосинтеза	28
3. Изучение водного режима и корневого питания растений	29
3.1. Водный режим растений	29
3.2. Синтетическая функция корня и суточный ход «плача»	40
4. Изучение продукционного процесса растений	46
4.1. Особенности продукционного процесса у культурных растений разных видов	49
4.2. Параметры продукционного процесса у разных фитоценозов	50
4.3. Структура биомассы у растений разных экологических стратегий	51
4.4. Дендрохронологические показатели древесных растений	52
4.5. Скорость продукции и деструкции органического вещества в водоемах	55
5. Изучение водной и почвенной микробиоты	59
5.1. Микрофлора воды	59
5.2. Содержание азотобактера в образцах почв и на корнях растений	62
Список использованной литературы	65

Составители:

Борисова Галина Григорьевна
Киселева Ирина Сергеевна
Некрасова Галина Федоровна
Фирсов Николай Николаевич
Храмцова Елена Владимировна

Редактор и корректор Е. И. Маркина
Компьютерная верстка Н. В. Комардина

Оригинал-макет подготовлен
редакционно-издательским отделом университета

План выпуска 2006 г., поз. 10. Подписано в печать 20.06.2006.
Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Уч.-изд. л. 3,7. Усл. печ. л. 3,95. Тираж 150 экз. Заказ

Издательство Уральского университета. 620083, Екатеринбург, пр. Ленина, 51.

Отпечатано в ИПП «Издательство УрГУ», 620083, Екатеринбург, ул. Гургенева, 4.