

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и естественных наук Кафедра "Общая биология и биохимия"

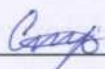
Направление подготовки 44.03.01 Педагогическое образование

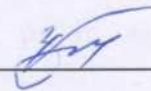
Профиль Биология

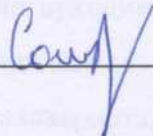
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

«НАТИВНЫЕ АССОЦИАЦИИ РИЗОБАКТЕРИЙ»

Студент  Струев Станислав Сергеевич

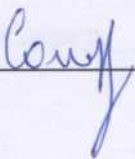
Руководитель  Заплатин Б.П.

Нормоконтролёр  Солдатов С.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 2.06.16 № 12)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой хорошо (протокол заседания ГЭК от 16.06.16 № 12)

Секретарь ГЭК  Солдатов С.А.

Пенза, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	4
1.1. ПОЧВА КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	4
2. БАКТЕРИИ ПОЧВЫ	7
2.1 Общая характеристика почвенных бактерий	7
2.2. Классификация почвенных бактерий.....	8
3. РИЗОСФЕРА И РИЗОПЛАН	13
3.1. Понятие о ризосфере и ризоплане.....	13
3.2. Разнообразие ризосферной микрофлоры.....	14
3.3. Микробно-растительные взаимодействия в ризосфере и ризоплане .	17
4. РОЛЬ БАКТЕРИЙ В СОЗДАНИИ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ И СТИМУЛЯЦИИ РОСТА РАСТЕНИЙ.....	22
4.1. Плодородие почвы	22
4.2. Процесс образования почвы и деятельность микроорганизмов	23
1.4.3. Использование ризосферных бактерий в хозяйственной деятельности	25
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.	30
2.1. Краткая характеристика объектов исследования	30
2.2. Методика эксперимента.	34
2.3. Результаты и обсуждение.....	36
2.4. Использование в школьном образовании методов и результатов исследований влияния бактерий на рост растений.....	45
ВЫВОДЫ.....	47
Список литературы	48

ВВЕДЕНИЕ

Почвенные организмы отвечают за разложение органического вещества, образовавшегося в наземной экосистеме при фотосинтезе, и снабжают растения доступными ресурсами. Они также играют существенную роль в формировании стабильных почвенных агрегатов.

Актуальность темы. Интерес к почвенным микроорганизмам во многом определяется их исключительной ролью в формировании качества почвы (почвенного «здоровья») как способности почвенной биосистемы в заданных пространственных границах поддерживать продуктивность растений и животных, сохранять приемлемое качество воды и воздуха, а также обеспечивать здоровье людей, животных и растений.

Жизнедеятельность почвенной биоты определяет уровень плодородия почв, а возможность управления биотой на основе контроля почвенной влаги представляет интерес с точки зрения дискуссионной проблемы устойчивого развития. Почвенная биота - идеальный пример системы, обеспечивающей устойчивое существование ненарушенных экосистем в течение очень больших промежутков времени.

В настоящее время биологические исследования характеризуются особым вниманием к вопросам повышения урожайности растений и уменьшения их заболеваемости при помощи микроскопически малых организмов. Такой подход особенно важен на фоне все возрастающего глобального загрязнения почв химически синтезированными удобрениями.

В нашу задачу входило исследование влияния ризобактерий на рост и развитие растений. Однако, подобные исследования в естественной среде довольно сложны, поэтому нами было решено создать модель взаимодействия природных ассоциаций с использованием готовых бактериальных препаратов.

Цель работы: изучение нативных ассоциаций ризобактерий.

Задачи:

- Изучить и проанализировать и литературные данные по теме;

- Подобрать модельные микроорганизмы;
- Изучить модельные микроорганизмы;
- Выявить влияние каждого из модельных микроорганизмов в отдельности на рост и формирование растений огурца;
- Создать модель взаимодействия природных ассоциаций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ПОЧВА КАК СРЕДА ОБИТАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Отличительная особенность почвы как природного местообитания микроорганизмов связана с ее гетерогенностью, которая проявляется в разных пространственных масштабах. Почвенные микроорганизмы обитают в трехфазной полидисперсной среде, представленной твердой (минеральные и органические частицы), жидкой (почвенная вода) и газообразной (почвенный воздух) фазами.

Жизнедеятельность микроорганизмов в почве осуществляется в основном на почвенных частицах, в определенных микроразонах которых представлены клетки, ресурсы и микробные метаболиты (Бузолева, Сидоренко, 2013). Поверхность почвенных частиц как жизненное пространство микроорганизмов может составлять несколько десятков квадратных метров в 1 г почвы. В работах Д. Г. Звягинцева (1987) и других почвенных микробиологов по особенностям жизнедеятельности адсорбированных микробных клеток в почвах обсуждались вопросы, которые в биотехнологии получили развитие в рамках направления по иммобилизованным клеткам и ферментам.

Масса биоты, включая бактерии, грибы, водоросли, по данным прямых методов микроскопии, может достигать нескольких тонн на гектар почв. В первом приближении по биомассе в поверхностных почвенных образцах (особенно в таежно-лесной зоне) доминируют грибы. Биомасса бактерий

сопоставима по порядку величин с биомассой грибов, а остальные компоненты, включая представителей почвенной фауны, составляют второй план. Вместе с тем сами по себе показатели биомассы, к тому же рассчитанные на основе тотальных количественных учетов (без дифференциации «активной» и «неактивной и мертвой» биомассы), не дают представления о функциональной роли отдельных представителей почвенной биоты.

В целом можно охарактеризовать почву как чрезвычайно гетерогенную среду обитания, в которой существует обильная и разнообразная микробная биомасса.

Почвенные микроорганизмы не просто обитают в естественной гетерогенной среде, но сами являются ключевым фактором почвообразования и участвуют в процессах преобразования горной породы в почву с характерным строением. Оценивая роль микроорганизмов, Т. В. Аристовская выделила пять важнейших элементарных почвенно-микробиологических процессов: разложение растительного опада, образование гумуса, разложение гумуса, деструкция минералов почвообразующей породы и новообразование минералов. Указанные и другие функции почвенных микроорганизмов составляют как бы фундамент наземных экосистем. Относительно более подробно исследован процесс разложения органического вещества в почве (Марченко, 2008).

Почва представляется не только гетерогенной (характеристики системы варьируют в пространстве), но и гетерохронной средой обитания, параметры которой изменяются во времени. Необходимость изучения динамики почвенной микробной системы осознана давно. Выдающийся русский микробиолог С.Н.Виноградский описал на основе микроскопических наблюдений последовательную смену микробных популяций в ходе разложения внесенных в почву органических веществ. На первом этапе разложения легкодоступной органики доминировали быстрорастущие популяции с банальной морфологией и относительно

крупными размерами клеток. Представители второго этапа разложения трудной почвенной органики характеризовались своеобразием морфологии и были названы С. Н. Виноградским автохтонной микрофлорой.

2. БАКТЕРИИ ПОЧВЫ

2.1 Общая характеристика почвенных бактерий

Почвенные бактерии, которые взаимодействуют с растениями, обитают в так называемой ризосфере - миллиметровом слое почвы, примыкающем к корневым волоскам. Именно через эти корневые волоски растения усваивают из почвы питательные вещества и выделяют органические соединения, которыми питаются ризосферные бактерии (Шабаев, 2005).

Почвенные бактерии играют основную роль в питании растений. Некоторые авторы уже отмечали, что транспорт питательных веществ осуществляется не только в результате пассивной диффузии или передвижения почвенных растворов в ходе испарения, но также и в результате активного транспорта микроорганизмами почвы. Для некоторых питательных веществ такой активный транспорт является преобладающим.

Почвенные бактерии оказывают большое влияние на рост и развитие растений.

Некоторые почвенные бактерии и дрожжи способны усваивать алифатические углеводороды в присутствии неорганических источников азота типа солей аммония, давая белки, пригодные на корм скоту. В одном из последних методов природный газ химически перерабатывают в метанол, который затем используют как питательную среду для специально выведенных микроорганизмов. Аминокислотный состав конечного продукта меняется в зависимости от вида микроорганизма, источника углерода и условий ведения процесса, но во всех случаях получается продукт, пригодный для откорма скота.

Среди почвенных бактерий особую функцию выполняют нитрифицирующие (азотфиксирующие), играющие важнейшую роль в круговороте азота в природе. За год бактериями фиксируется 160 - 170 млн. тонн азота.

Под влиянием почвенных бактерий карбамид в течение 2 - 3 суток

превращается в карбонат аммония, который постепенно нитрифицируется. В связи с этим карбамид тоже относится к физиологически и биологически кислым удобрениям. Цианамид кальция, кальциевая и натриевая селитра являются физиологически щелочными удобрениями.

Для некоторых определенных почвенных бактерий характерно, что поглощение кремния в виде растворимого кремнезема в культуральной среде сопровождается выделением фосфора.

Одни виды полезных природных почвенных бактерий и грибов оказывают прямое действие, другие опосредованное. Первые поставляют растениям соединения, стимулирующие их рост, вторые подавляют размножение патогенных почвенных микроорганизмов, предотвращая их негативное влияние на растение (Глик, 2002).

2.2. Классификация почвенных бактерий

Микробы в почве являются ключом к переработке углерода и азота. Чайная ложка плодородной почвы может содержать от 100 млн и до 1 млрд бактерий. Бактерии - это крошечные одноклеточные организмы шириной около 0,2-2 мкм (в среднем - 1 мкм) и длиной около 1-10 мкм. По размеру бактерии сопоставимы с частичками глины (<2 мкм) и ила (2-50 мкм). Они растут и живут в тонких водных пленках вокруг частиц почвы и корней растений в области, называемой ризосферой. Небольшой размер бактерий позволяет им расти и адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды быстрее, чем более крупным и сложным микроорганизмам. Большинство почв являются своего рода кладбищем для мертвых бактерий. Так как большинство бактерий живут в условиях постоянного голодания или водного стресса, то они научились быстро адаптироваться к условиям окружающей среды и мгновенно репродуцировать, когда вода и пища находятся в изобилии. Популяцию бактерий можно легко удвоить за 30 минут. Бактерии так просты по структуре, что иногда их называют «мешок ферментов».

Классификация бактерий:

Бактерии в основном подразделяются на типы. Для упрощения бактерии могут быть объединены в следующие группы:

- а) бактерии в зависимости от их формы

До появления секвенирования ДНК бактерии были классифицированы на основе их форм и биохимических свойств. Большинство бактерий принадлежат к трем основным формам: стержень (стержневые бактерии называются бациллы), сфера (сферические бактерии называются кокки) и спираль (спиральные бактерии называются спириллы). Также существуют тонкие разветвленные нити, называемые актиномицетами. Некоторые бактерии принадлежат к разным формам, которые являются более сложными, чем вышеуказанные;

- б) аэробные и анаэробные бактерии

Бактерии, которые нуждаются в кислороде для выживания, называются аэробные. Бактерии, которые не требуют кислорода для выживания, называются анаэробными. Данные бактерии могут погибнуть, если находятся в окисленной среде;

- в) грамположительные и грамотрицательные бактерии

Деление бактерий на грамположительные и грамотрицательные основывается на результатах метода Грама. Грамотрицательные бактерии являются самыми маленькими и имеют тенденцию быть более чувствительными к водному стрессу, в то время как грамположительные бактерии больше по размеру, имеют более толстую клеточную стенку, отрицательный заряд на внешней поверхности и, как правило, противостоят водному стрессу;

- г) автотрофные и гетеротрофные бактерии

Это один из самых важных видов классификации. Он учитывает наиболее важный аспект роста бактерий и их размножения. Автотрофные бактерии, также известные как автотрофы, получают необходимый им углерод из углекислого газа. Некоторые автотрофы непосредственно

используют солнечный свет для получения сахаров из углекислого газа, тогда как для других это зависит от различных химических реакций. Гетеротрофные бактерии получают углеводы и/или сахара из окружающей среды, в которой они находятся;

- д) классификация основана на филах

Бактерии выполняют важные функции в почве, разлагая органические остатки из ферментов, секретируемых в почве. Есть четыре основные функциональные группы почвенных бактерий (Маслов, 2010).

1. Decomposers (деструкторы) - бактерии, которые потребляют простые сахара и соединения углерода, такие как корневые выделения и свежие растительные остатки.

2. Mutualists - бактерии, формирующие партнерские отношения с растениями; пример: ризобии - азот-фиксирующие бактерии.

3. Lithotrophs (хемоавтотрофы) - бактерии, которые получают энергии из соединений азота, серы, железа или водорода, а не из углеродных соединений.

4. Бактерии также могут быть патогенами для растений.

Бактерии в почве преобразовывают энергию органического вещества в формы, полезные для остальных организмов. Ряд бактерий деструкторов (Decomposers) могут разрушать остатки пестицидов и некоторые другие загрязняющие вещества в почве. Эти бактерии особенно важны для иммобилизации или сохранения питательных веществ, тем самым предотвращая потери питательных веществ, таких как азот из корневой зоны. Бактерии всех четырех групп выполняют важные функции, связанные с динамикой воды, круговоротом питательных веществ и противостоянием болезням. Некоторые бактерии производят вещества, которые помогают связывать частицы почвы в микроагрегаты (2-200 мкм). Стабильные агрегаты улучшают инфильтрацию воды и повышают водоудерживающую способность почвы. Также популяции бактерий конкурируют с болезнетворными организмами в корнях и на поверхности растений.

Азотфиксирующие бактерии (ризобии) образуют симбиотические ассоциации с корнями бобовых. Ризобии являются граммотрицательными бактериями. Создаются видимые глазу узелки в местах, где бактерии заражают растущий корень растения. Растение поставляет простые сахара к бактериям, а бактерии преобразовывают атмосферный азот из воздуха в нитратную и аммонийную формы, которые растение может использовать. Когда листья или корни растения разлагаются, количество азота в почве увеличивается. Для фиксации бактериями атмосферного азота нужны анаэробные условия. Нитрифицирующие бактерии сначала превращают аммоний в нитрит, а затем в нитрат, который является предпочтительной формой азота для большинства пропашных культур. Нитрифицирующие бактерии нужны почвам с чрезмерной аэрацией. Нитрат легко выщелачивается из почвы, поэтому некоторые фермеры используют ингибиторы нитрификации для понижения активности нитрифицирующих бактерий. Денитрифицирующие бактерии превращают нитраты в атмосферный азот или закись азота (Маслов, 2010).

Денитрификаторы являются анаэробными бактериями, то есть они активны при отсутствии кислорода, например в уплотненных почвах или внутри почвенных микроагрегатов. В тяжелых глинистых почвах до 40-60% азота может быть потеряно при денитрификации. Хотя существует множество бактерий в почве, только небольшая специализированная группа азотфиксирующих бактерий может фиксировать атмосферный азот. Фиксация азота не может происходить без участия специальных нитрогеназных ферментов конкретных бактерий. Азотфиксирующие бактерии присутствуют в большинстве типов почв как симбиотические виды, однако они, как правило, составляют очень небольшой процент от общего количества популяций микроорганизмов и имеют низкую способность фиксации азота. Сера, как и многие другие питательные вещества, трансформируется в почве таким же образом, как азот. Специальные бактерии в анаэробных условиях делают серу менее доступной для растений

путем ее преобразования в сероводород в водонасыщенных почвах, осаждая серу из почвы в виде нерастворимых сульфидов различных металлов. В хорошо аэрируемых условиях бактерии преобразуют серу из сульфидов металлов в сульфатную форму через промежуточные стадии с образованием элементарной серы и тиосульфата. Актиномицеты - большая группа бактерий, которые растут как грибы и аналогичны грибам функционально. Актиномицеты по размеру (1-2 мкм) меньше грибов (10-50 мкм) и довольно чувствительны к антибактериальным агентам. Когда фермеры пахут почву, именно актиномицеты ответственны за специфический «земляной» запах, источником которого являются стрептомицеты. Ряд антибиотиков производится из актиномицетов, в том числе стрептомицин. Актиномицеты разлагают многие вещества и являются более активными при высоких значениях pH. Актиномицеты особенно важны в деградации трудно разлагающихся соединений, таких как хитин, лигнин, кератин, грибковая целлюлоза и животные полимеры. При низком значении pH более активными в деградации подобных соединений являются грибы. Актиномицеты важны при формировании стабильного гумуса, что повышает структуру почвы, улучшает запас питательных веществ в ней и повышает ее свойство удерживать воду (Маслов, 2010).

3. РИЗОСФЕРА И РИЗОПЛАН

3.1. Понятие о ризосфере и ризоплане

Ризосфера — узкий участок почвы, прилегающий к корням растения и попадающий под непосредственное действие корневых выделений и почвенных микроорганизмов. Почва, не являющаяся частью ризосферы, называется основной почвой (англ. Bulk soil). В ризосфере содержится множество бактерий, питающихся отшелушивающимися растительными клетками, а также белками и сахарами, образуемых корнем. Кроме того, в ризосфере обитают многочисленные протисты и нематоды, питающиеся бактериями. Таким образом, большая часть круговорота питательных веществ и подавление растением различных патологических процессов происходят в непосредственной близости от корней.

Первое место в ризосфере занимают, как правило, неспоровые бактерии. Второе место принадлежит микобактериям. Актиномицеты, грибы и споровые бактерии обнаруживаются здесь в небольших количествах.

Ризосфера — среда для микроорганизмов почвы. Неспоровые бактерии — преобладающая группа почвенной микрофлоры в ризосфере. К неспоровым бактериям принадлежат азотфиксаторы: азотобактер, клубеньковые, фотосинтезирующие бактерии, азотомонас. Все они тяготеют к ризосфере растений. Здесь же накапливаются и другие представители азотфиксирующей флоры — маслянокислые, микобактерии, водоросли. Количество азотобактера и клубеньковых бактерий может достигать в этой зоне значительных величин: от сотен тысяч до нескольких миллиардов клеток в 1 г почвы (клубеньковые бактерии) и до 200 млн. клеток (азотобактер). Клубеньковые бактерии встречаются не только в ризосфере бобовых растений, они с успехом могут развиваться и в ризосфере злаков.

Термин «ризоплана» впервые был применен в 1949 г. Кларком для характеристики наружной поверхности корней растений вместе с прилегающими к ней частицами почвы.

Канадский исследователь Х. Дж. Тимонин различает в зоне взаимодействия растений и микроорганизмов три зоны: ризосферу, ризоплану и гистосферу. Он же разработал также методику их разделения и изучения.

В его понимании ризосфера — это часть почвы, непосредственно прилегающая к поверхности корней, которая отделяется после пятиминутного встряхивания собранного материала со смесью воды и кварцевого песка. Численность микроорганизмов в жидкой фазе этой системы характеризует численность микроорганизмов в ризосфере (Руссель, 1977).

Следующую фракцию — ризоплану — получают в результате дальнейшего встряхивания корней растений со стерильной водой. В фильтрате определяется численность микроорганизмов на поверхности корней растений.

Корни, промытые при отделении микрофлоры ризопланы, переносят в гомогенизатор и растирают в течение 5 мин. В гомогенате определяется численность микроорганизмов, составляющих микрофлору гистосферы.

Непосредственная связь между микроорганизмами и высшими растениями не ограничивается одной ризосферой. Микрофлора заселяет также надземные части растения — себель и листья, а патогенные микроорганизмы также и внутренность клеток и сосудистых пучков растения. Микроорганизмы, заселяющие надземные части растения, составляют эпифитную микрофлору, а область их действия называется филлосферой.

3.2. Разнообразие ризосферной микрофлоры

Бактерии выполняют важные функции в ризосфере, разлагая органические остатки из ферментов, секретируемых в почве. Есть четыре основные функциональные группы почвенных бактерий.

1. Decomposers (деструкторы) - бактерии, которые потребляют

простые сахара и соединения углерода, такие как корневые выделения и свежие растительные остатки.

2. Mutualists - бактерии, формирующие партнерские отношения с растениями; пример: ризобии - азот-фиксирующие бактерии.

3. Lithotrophs (хемоавтотрофы) - бактерии, которые получают энергии из соединений азота, серы, железа или водорода, а не из углеродных соединений.

4. Бактерии также могут быть патогенами для растений.

Бактерии в почве преобразовывают энергию органического вещества в формы, полезные для остальных организмов. Ряд бактерий деструкторов (Decomposers) могут разрушать остатки пестицидов и некоторые другие загрязняющие вещества в почве. Эти бактерии особенно важны для иммобилизации или сохранения питательных веществ, тем самым предотвращая потери питательных веществ, таких как азот из корневой зоны. Бактерии всех четырех групп выполняют важные функции, связанные с динамикой воды, круговоротом питательных веществ и противостоянием болезням. Некоторые бактерии производят вещества, которые помогают связывать частицы почвы в микроагрегаты (2-200 мкм). Стабильные агрегаты улучшают инфильтрацию воды и повышают водоудерживающую способность почвы (Маслов, 2010). Также популяции бактерий конкурируют с болезнетворными организмами в корнях и на поверхности растений. Азотфиксирующие бактерии (ризобии) образуют симбиотические ассоциации с корнями бобовых. Ризобии являются граммотрицательными бактериями. Создаются видимые глазу узелки в местах, где бактерии заражают растущий корень растения. Растение поставляет простые сахара к бактериям, а бактерии преобразовывают атмосферный азот из воздуха в нитратную и аммонийную формы, которые растение может использовать. Когда листья или корни растения разлагаются, количество азота в почве увеличивается. Для фиксации бактериями атмосферного азота нужны анаэробные условия. Нитрифицирующие бактерии сначала превращают

аммоний в нитрит, а затем в нитрат, который является предпочтительной формой азота для большинства пропашных культур. Нитрифицирующие бактерии нужны почвам с чрезмерной аэрацией. Нитрат легко выщелачивается из почвы, поэтому некоторые фермеры используют ингибиторы нитрификации для понижения активности нитрифицирующих бактерий. Денитрифицирующие бактерии превращают нитраты в атмосферный азот или закись азота.

Многие виды бактерий процветают на различных источниках пищи и в разных микросредах. В общем, бактерии являются более конкурентоспособными, когда в ризосфере присутствуют легко усваиваемые (лабильные) субстраты (простые сахара). Это свежие остатки растений и соединения, которые содержатся рядом с живыми корнями. Бактерии, особенно стержневые и грамотрицательные, и актиномицеты сконцентрированы в ризосфере вокруг корней. Актиномицеты могут составлять от 10 до 30% от общего объема микроорганизмов в ризосфере почвы в зависимости от питательной доступности. Некоторые растения производят определенные типы корневых выделений, чтобы стимулировать рост защитных бактерий.

Эти вещества играют важную роль в цементировании песка, ила и глинистых частиц почвы в стабильные микроагрегаты, которые улучшают структуру почвы. Для того чтобы бактерии могли выжить в почве, они должны адаптироваться к разным микросредам. Концентрации кислорода в почве могут широко варьироваться. Большие поры, заполненные воздухом, обеспечивают высокий уровень кислорода, что способствует образованию аэробных условий. В то же время мелкие микропоры могут быть анаэробной средой, где не хватает кислорода. Это разнообразие в почвенных микросредах позволяет бактериям процветать при различных уровнях влажности почвы и содержании кислорода, потому что даже после наводнения (насыщение почвы, недостаток кислорода) или обработки почвы (диффузия кислорода) существуют небольшие микросреды, где различные

виды бактерий и микроорганизмов могут существовать.

Поскольку почва разрушается меньше, а разнообразие растений увеличивается, почвенная пища становится сбалансированной и разнообразной, что делает питательные вещества почвы более доступными для высших растений. Разнообразные микробные популяции и грибы, простейшие организмы и нематоды поддерживают утилизацию питательных веществ и болезнетворные организмы под контролем (Маслов, 2010).

3.3. Микробно-растительные взаимодействия в ризосфере и ризоплане

Прорастающее и развивающееся из семени в почве растение сталкивается с различными микроскопическими биологическими объектами. Будущее растение контактирует с ними как формирующейся корневой системой, так и стеблем, пока проростком. Корень контактирует с неспецифическими для него микроорганизмами, т. е. такими, контакт с которыми не приводит к его инфицированию, и со специфическими, инфицирующими корень микроорганизмами. Среди инфицирующих имеются непатогенные (клубеньковые бактерии, микоризные, эндо- и эктомикоризные грибы) и типичные патогенны.

Совокупность корневой системы с почвой представляет собой сложную экологическую нишу, заселенную полезными, вредными и нейтральными для растений микроорганизмами (Боронин, 1998).

Пространство и почву, окружающие формирующийся корень, называют ризосферой. Считается, что первое определение понятия ризосферы было дано Хилтнером в 1904 году. В настоящее время под ризосферой понимают пространство вокруг корня от 0 до 2-8 мм в диаметре, в котором имеет место более обильное развитие микроорганизмов из-за стимулирования их роста корневыми выделениями, а в более широком смысле - корневыми депозитами. Пространство ризосферы иногда называют ещё эндоризосферой, включая в это понятие и ткани самого корня в противовес ризоплане, под которой подразумевают только то, что находится

непосредственно на поверхности корня и прикреплено к корню. Корневые экссудаты представляют собой низкомолекулярные органические вещества, продукты фотосинтеза и метаболизма (сахара, органические и аминокислоты, спирты, гормоны, витамины и др.). Эти вещества «вытекают» из зоны растяжения корня в процессе его роста и развития.

Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере). В ризосфере в отличие от свободной от корней почвы доминируют грамотрицательные бактерии, причем преобладают флуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*. Некоторые штаммы бактерий *Pseudomonas putida*, *P. Fluorescens*, *P. aureofaciens* (chlororaphis), *P. corrugata* и др. способствуют значительному улучшению роста и развития растений. В настоящее время бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, принято обозначать как PGPR (от Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - ризобактерии, способствующие росту растений). Исследования этой перспективной для практического использования группы ризобактерий вызывают большой интерес, чем обусловлено регулярное проведение международных симпозиумов по проблеме изучения и практического использования PGPR. Среди PGPR различных таксономических групп выделяются широким набором полезных для растений свойств ризосферные PGPR *Pseudomonas*, которые являются потенциальными объектами агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений (Соколов, Литвишко, 1993).

Положительное влияние PGPR *Pseudomonas* на растения

1. Прямая или непосредственная стимуляция роста растений за счет синтеза различных метаболитов, полезных для растений;

2. Опосредованная стимуляция роста растений за счет вытеснения и подавления развития почвенных фитопатогенов или микроорганизмов, угнетающих рост растений.

В ризосфере небобовых растений достаточно широко распространены и азотфиксирующие бактерии родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Citobacter*, которые представляют собой грамотрицательные палочки, подвижные (кроме представителей рода *Klebsiella*), факультативные анаэробы.

В ризосфере на корнях кукурузы, сорго и риса обнаружен новый вибриоидный организм - *Herbaspirillum seropedicae*, способный к фиксации азота в условиях ассоциативного симбиоза.

Herbaspirillum seropedicae - грам-отрицательные бактерии, способные к фиксации азота и стимулированию роста растений.

На корнях злаковых и других небобовых растений распространены представители рода *Pseudomonas*, среди которых имеется ряд азотфиксаторов.

Ассоциативная азотфиксация протекает практически во всех почвах в прикорневом пространстве или на корнях различных небобовых растений.

При таком практически повсеместном распространении эффективность её, определяемая деятельностью diaзотрофных бактерий, далеко не одинакова по разной растительностью.

Зоны, непосредственно примыкающие к корням живых растений, являются областями активного развития микроорганизмов. Это связано, прежде всего, с выделениями из корней (экзосомом) органических веществ, синтезированных растениями. Совокупность микроорганизмов, содержащихся в большом количестве в узкой зоне вокруг корней, называют ризосферной микрофлорой. Ясно, что метаболизм (обмен веществ) корней оказывает большое влияние на почвенную среду, прилегающую к корням. Считают, например, что корни увеличивают кислотность примыкающих к ним микрослоев почвы за счет выделения углекислоты и H^+ ионов. Такие

изменения возможны в пределах нескольких миллиметров вокруг корня. Важным источником стимуляции почвенного микронаселения является выделение корнями питательных веществ. Патогенные и симбиотические микроорганизмы привязаны к ним либо способны растворять стенку клеток корня и проникать внутрь цитоплазмы. Экзосмос органических веществ из корней растений обусловлен активными процессами, пассивной диффузией или выделениями из отмирающих клеток.

Сфера воздействия корней на микрофлору в почве определяется лишь приблизительно по увеличению числа микробов по мере приближения к поверхности корня. Большинство групп микроорганизмов обнаруживается в большем числе в ризосфере (Р), чем в окружающей почве (П), что можно выразить отношением: Р/П (Борисовна, Занина, Ларионов, Семенова, 2010).

Ризосферный эффект увеличивается после прорастания семени и достигает максимума в период цветения и плодоношения растений. Таким образом, возраст и старение растений играет большую роль в формировании и деятельности ризосферной микрофлоры (Борисовна, Занина, Ларионов Семенова, 2010).

Ризосферный эффект более ярко выражен в песчаных почвах и менее — в гумусных. В пустынных районах ризосфера является, по-видимому, единственной зоной, где активно развивается микрофлора. В любой почве изменения окружающей среды, включая агротехнические мероприятия, оказывают меньшее воздействие на микроорганизмы в ризосфере по сравнению с обитателями почвы. Ризосферная зона представляет собой своеобразную «буферную» систему, препятствующую воздействию среды на микрофлору (Борисовна Занина Ларионов Семенова, 2010).

Колонизация почвы микроорганизмами (в том числе не содержащимися в ассоциациях в данном участке) все же ограничено возможна, если не лимитируется следующими условиями:

а) наличием пригодного места в данный момент (в реальных

микроразнообразиях обитания микроорганизмов, а не вообще в почве);

б) присутствием в достаточном количестве субстрата, обеспечивающего длительное развитие данного организма;

в) способностью использовать многие источники энергии и пищи в экосистеме, и причем более эффективно, чем аборигенная микрофлора;

г) высокой толерантностью (выносливостью) попадающего организма к микро-экологическим факторам — колебаниям pH и температуры, осмотическому давлению, содержанию кислорода, окислительно-восстановительному потенциалу, влажности и другим, обеспечивающим вегетативный рост;

д) наличием механизмов активного воздействия на другие организмы — образованием физиологически активных метаболитов, способностью к антагонизму и устойчивостью к продуктам жизнедеятельности других организмов (Федоров, Красильников, Уранов, 1974).

Нет практически ни одного вещества (в первую очередь содержащего углерод), которое не могло бы быть разложено микроорганизмами. Самые устойчивые соединения — асфальты, битумы и новые синтезированные химическим путем соединения, не встречающиеся в природе, также атакуются.

4. РОЛЬ БАКТЕРИЙ В СОЗДАНИИ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ И СТИМУЛЯЦИИ РОСТА РАСТЕНИЙ

4.1. Плодородие почвы

Под плодородием понимают способность почв удовлетворять потребность растений в воде и питательных веществах. Важными факторами, определяющими плодородие почв, являются также свет и тепло.

В различных почвенно-климатических зонах условия, определяющие почвенное плодородие, различны. Ограничивающими условиями в зоне тундры будут низкие температуры и избыточное увлажнение почв, в лесной зоне — избыточное увлажнение и кислотность почв, в лесостепной и степной зонах — недостаток воды и нередко избыточное содержание в почвах натрия хлора. На песчаных почвах сказывается недостаток влаги и элементов питания, а на тяжелосуглинистых — низкая аэрация и большая плотность почв. Таким образом, плодородие ограничивается различными условиями, связанными с факторами почвообразования (Зеликов, 1981).

Виды почвенного плодородия.

Различают естественное, потенциальное, искусственное и эффективное, или действительное, плодородие почв.

Естественное плодородие — свойство почвы, образовавшейся под естественной растительностью при естественном протекании почвообразовательных процессов. Оно сравнительно мало изменяется во времени и является величиной стабильной для определенного типа почв.

Потенциальное плодородие определяется валовым (общим) запасом элементов питания в почве, находящихся как в доступной, так и недоступной формах.

Эффективное плодородие, измеряемое величиной урожая, является действительным выражением естественного и искусственного плодородия и в значительной степени зависит от уровня развития науки и техники. К.

Маркс писал: «Таким образом, отчасти от развития агрохимии, отчасти от развития механизации земледелия зависит, в какой степени на земельных участках одинакового естественного плодородия последнее может быть действительно использовано. Поэтому, хотя плодородие и является объективным свойством почвы, экономически оно все же постоянно подразумевает известное отношение — отношение к данному уровню развития химических и механических средств агрикультуры, а потому и изменяется вместе с этим уровнем развития».

Следовательно, плодородие неуклонно будет возрастать, так как все полнее будут использоваться потенциальные запасы элементов питания и влаги в почве (Зеликов, 1981).

4.2. Процесс образования почвы и деятельность микроорганизмов

Почва является основным средством производства в сельском хозяйстве. Все продукты сельского хозяйства состоят из органических веществ, синтез которых происходит в растениях под воздействием, главным образом, солнечной энергии. Разложение органических остатков и синтез новых соединений, входящих в состав перегноя, протекает при воздействии ферментов, выделяемых разными ассоциациями микроорганизмов. При этом наблюдается непрерывная смена одних ассоциаций микробов другими.

Микроорганизмов в почве очень большое количество. По данным М.С. Гилярова, в каждом грамме чернозема насчитывается 2-2,5 миллиарда бактерий (Нарциссов, 1982). Микроорганизмы не только разлагают органические остатки на более простые минеральные и органические соединения, но и активно участвуют в синтезе высокомолекулярных соединений - перегнойных кислот, которые образуют запас питательных веществ в почве. Поэтому, заботясь о повышении почвенного плодородия (а, следовательно, и о повышении урожайности), необходимо заботиться о питании микроорганизмов, создании условий для активного развития микробиологических процессов, увеличении популяции микроорганизмов в

почве.

В окультуренных плодородных почвах бурно развиваются не только микрофлора, но и почвенная фауна. Животные в почве представлены дождевыми червями, личинками различных почвенных насекомых и живущими в почве грызунами. Из числа микроскопической фауны черви являются наиболее активными почвообразователями. Они живут в поверхностных горизонтах почвы и питаются растительными остатками, пропуская через свой кишечный тракт большое количество органического вещества и минеральной составляющей почвы. Микроорганизмы в почве образуют сложный биоценоз, в котором различные их группы находятся между собой в сложных отношениях. Одни из них успешно сосуществуют, а другие являются антагонистами (противниками). Антагонизм их обычно проявляется в том, что одни группы микроорганизмов выделяют специфические вещества, которые тормозят или делают невозможным развитие других (Шаблин, 2010).

Очень важны в жизни микроорганизмов витамины, ауксины и другие биотические вещества. Небольшие дозы их заметно ускоряют развитие и размножение клеток микробного населения.

На распределение отдельных микробов сильное влияние оказывает кислотность почвенного раствора. В почвах с нейтральной или слегка щелочной реакцией бактерий бывает значительно больше, чем в кислых, заболоченных или торфяных почвах (Яброва, Швабенланд, 2012).

Наиболее благоприятные условия при обработке создаются для аэробных микробов, в результате чего весной уже через 8-20 дней после обработки численность микрофлоры возрастает в 5-10 раз.

Гумус повышает количество водопрочных агрегатов почвы, что способствует хорошей водопроницаемости, экономному расходу воды, улучшает аэрацию и создает благоприятный биологический режим в структурной почве, гармонически сочетает аэробный процесс с анаэробным.

Перегной служит источником энергии для микроорганизмов и одновременно делает почву более благоприятной для развития растений.

1.4.3. Использование ризосферных бактерий в хозяйственной деятельности

Ростстимулирующие ризобактерии (plant growth promoting rhizobacteria — PGPR) играют важную роль в адаптации растения к внешним воздействиям. Таксономически эти бактерии чрезвычайно разнообразны (Кравченко, Макарова, Азарова, 2002) (наиболее изучены представители родов *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Bacillus*). Они обитают в ризосфере (зона почвы, непосредственно соприкасающаяся с корнями), которая служит их основной экологической нишей с наиболее благоприятными условиями, и на поверхности корней. В ризосферу из корней активно поступают сложные смеси легкодоступных органических источников энергии и углерода, что обуславливает ее высокую микробиологическую активность и образование отличающихся от почвенного микробоценоза специфических ризосферных микробных сообществ (Кравченко, 2000).

К важнейшим механизмам взаимодействия в растительно-бактериальных ассоциациях относится продуцирование бактериями фитогормонов (ауксинов, цитокининов и гиббереллинов), витаминов и других биологически активных веществ (Цавкелова, Климова, Чердынцева, 2006). Наибольшее внимание уделялось роли бактериальных ауксинов в стимуляции роста и питания растений, поскольку способность синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) широко распространена среди ризобактерий. Изучены биохимические пути и гены, ответственные за синтез ИУК, а также фенотипические эффекты экзогенных ауксинов на растения. Показан положительный эффект бактериальных ауксинов на инициацию и удлинение корней, развитие боковых корней и корневых волосков, что может иметь значение для ускоренного роста, потребления питательных элементов

и устойчивости растения к стрессам. Синтез ауксинов ризосферными микроорганизмами в значительной степени определяется составом корневых выделений, содержащих их основной метаболитический предшественник L-триптофан. Многие ризобактерии способны синтезировать цитокинины и гиббереллины. В качестве примера эффективной стимуляции роста растений бактериальными цитокининами можно привести эксперименты по инокуляции салата бактерией *Bac. subtilis*. Необходимо также учитывать, что некоторые бактерии могут не только продуцировать, но и деградировать фитогормоны. Так, описаны штаммы *Ps. putida*, расщепляющие ИУК, что может быть использовано для снятия ингибирующего действия суперпродуцентов ИУК, к которым относятся фитопатогены, на растения. Однако как ризобактерии, расщепляющие фитогормоны, так и реакция растений на эту деструкцию требуют более детального изучения.

Описаны эксперименты, свидетельствующие о повышении активности систем поглощения и транспорта питательных элементов у инокулированных растений. Так, при инокуляции *Achromobacter* sp. отмечали увеличение скорости ассимиляции нитрата в корнях у рапса, при инокуляции в *Azospirillum brasilense* — индукцию экспрессии гена LEAMT1:2, кодирующего транспортер аммония, у томата. Инокуляция озимой пшеницы ризобактериями вызывала у растений изменения в составе фосфорных соединений, в том числе увеличивала содержание кислоторастворимой фракции и АТФ (Губайдуллина, Самосова, 1978), что может рассматриваться как указание на изменение регуляции метаболизма питательных элементов у инокулированных растений. Интерес к механизмам прямого воздействия ризобактерий на системы поглощения и транспорта элементов в растениях в настоящее время возрастает. Наиболее вероятно, что вышеперечисленные специфические эффекты бактерий служат причиной повышения содержания определенного элемента в растительных тканях. Существенное влияние бактерий на рост биомассы растения может не проявиться, если дефицит этого элемента не представляет собой

ростлимитирующий фактор. Однако чаще наблюдают только повышение накопления (выноса) определенных элементов, обусловленное увеличением биомассы инокулированных растений. Такое действие бактерий может быть связано со стимуляцией роста корней, приводящей к освоению ими большего почвенного пространства и, следовательно, дополнительных питательных ресурсов.

Способность ризобактерий подавлять развитие фитопатогенных микроорганизмов изучают на протяжении многих лет. Известные механизмы биоконтроля могут быть связаны с прямым влиянием ризобактерий на фитопатоген, а также с воздействием на растение, направленным на повышение его устойчивости к заболеванию. К одной их группе относится конкурентная колонизация корней и конкуренция за общие пищевые субстраты. В этом случае эффективной может быть инокуляция растений авирулентными фитопатогенными штаммами или близкородственными видами.

Для успешной колонизации корней важна способность бактерий утилизировать основные компоненты корневых выделений, в особенности низкомолекулярные органические кислоты. Мутант *Ps. fluorescens* WCS365, не растущий на органических кислотах, плохо колонизировал корни томата, а мутант, который не мог расти на сахарах, колонизировал корни так же, как дикий тип. Кроме того, при утилизации органических кислот скорость роста, антифунгальная активность и интенсивность продукции ряда антибиотиков у ризосферных псевдомонад, как правило, выше, чем при использовании сахаров (Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Достанко, 1993). В ризосфере у диплоидных генотипов пшеницы с высоким относительным содержанием органических кислот в корневых выделениях численность ассоциативных азотфиксаторов и других ризобактерий росла интенсивнее (Штарк, Шапошников, Кравченко, 2003). Способность синтезировать аминокислоты и витамин В1 также оказалась существенной для колонизации корней псевдомонадами. Ауксотрофные по аминокислотам мутанты *Ps. fluorescens*

WCS365 не росли на корнях томата без внесения в ризосферу дополнительного количества аминокислот.

Интродуцируемые ризобактерии образуют ассоциации не только с полезными, но и с вредными для растений ризосферными аборигенами. Такое взаимодействие описано для *Az. lipoferum* и фитопатогенной бактерии *Cytophaga jonsoneae*, стимулирующей нитрогеназную активность азоспирилл и повышающей их выживаемость на корнях. Однако совместная инокуляция ячменя этими ризобактериями была неэффективной, так как *C. johnsonae* ингибировала развитие растений. Было также обнаружено, что у ячменя биоконтрольный штамм *Flavobacterium* sp. L30 в условиях *in vitro* полностью подавлял рост ризосферных бактерий, усиливающих прорастание семян, а в вегетационном опыте снижал эффективность инокуляции бактериями-стимуляторами.

Итак, ризобактерии, как правило, обладают набором свойств, влияющих на рост и питание растений. Это обуславливает широкую вариабельность реакций макроорганизма на инокуляцию и затрудняет интерпретацию полученных результатов, но в то же время открывается возможность для сочетания многих полезных свойств в одном штамме, что делает интродуцента более эффективным и экологически пластичным. Расширяется спектр известных механизмов растительно-ризобактериальных взаимодействий: относительно недавно описаны антистрессовые бактериальные эффекты за счет активности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминазы (АЦК деаминазы) и специфические воздействия на системы потребления элементов минерального питания. Особый интерес представляет вопрос, как растения влияют на численность популяций интродуцируемых штаммов и их функциональную активность. Весьма перспективно создание инокулятов, состоящих из бактериальных ассоциаций с аддитивными и синергическими эффектами на растения и повышающих устойчивость растительно-бактериальной системы. К настоящему времени информация о взаимодействии компонентов ризосферного сообщества с

интродуцентами довольно ограничена. Часто этим затрудняется понимание реакции растений на инокуляцию и поведения популяции интродуцента в ризосфере (Белимов, Шапошников, Кравченко, Виванко, 2011).

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2.1. Краткая характеристика объектов исследования

Объектами исследований были семена огурца сорта «Малыш», сенная палочка, молочнокислые бактерии.

Огурцы сорта «Малыш»

Огурец обыкновенный, или Огурец посевной (*Cucumis sativus*) — однолетнее травянистое растение, вид рода Огурец (*Cucumis*) семейства Тыквенные (*Cucurbitaceae*) класса Двудольные (*Dicotylédones*).



Рис. 1 Огурцы сорта "Малыш"

Огурцы сорта «Малыш» - пчелоопыляемые.

Тип цветения - женский или преимущественно женский. Растения кустовые, образуют нестелющиеся плети, длиной 33-43 см, междоузлия на стеблях укороченные, 2,2-2,3 см. Завязь закладывается с пазухи первого листа кистью, в которой от 3 до 6 плодов.

Урожай: 3,4-3,8 кг/кв.м., каждое растение дает до 47 плодов.

Особенности агротехники: для открытого грунта. Схема посадки 20 см х 50 см.

Сроки созревания: ультраскороспелый: в плодоношение вступает на 30-40 день после появления всходов.

Плоды эллипсовидные, темно-зеленые, крупнобугорчатые, белошипые, длиной 9 см, диаметром 3-3,3 см, массой 94-105 г. Плоды очень выравненные, не желтеют, без горечи, до 10 дней лежат без потери качества, транспортабельные. Относительно устойчив к ложной мучнистой росе. Использование: сорт универсального использования. Благодаря кустовой форме растения, сорт очень удобен для сбора зеленцов. Компактность куста

уменьшает затраты труда по выращиванию в сравнении с длинностебельными сортами в 2-3 раза. Гибрид очень скороспелый. Небольшого размера зеленцы пригодны для консервирования в небольших банках. За отличные вкусовые качества, отсутствие горечи сорт Малыш ценят хозяйки. Из них можно приготовить и вкусные салаты, и получить хорошие консервы на зиму. Благодаря лежкости и транспортабельности плодов, дачники могут не опасаться за их качество при перевозке на большие расстояния.

Сенная палочка (Bacillus subtilis).

Сенная палочка (рис. 2) - вид грамположительных спорообразующих аэробных почвенных бактерий рода Бациллы (*Bacillus*) семейства *Bacillaceae* порядка *Bacillales* класса Бациллы (*Bacilli*).

Название «сенная палочка» вид получил из-за того, что накопительные культуры этого микроорганизма получают из сенного экстракта.

Палочковидная бактерия, размер $0,5-2,5 \times 1,2 - 10$ мкм с округленными или «обрубленными» концами, часто в парах или цепочках.

Грамположительные. Подвижные за счёт перитрихальных жгутиков. Эндоспоры

овальные или иногда сферические либо цилиндрические, высокоустойчивые ко многим неприятным факторам. В клетке образуется не

более одной споры. Споруляция не подавляется в атмосфере воздуха.

Аэробы или факультативные анаэробы. Отношение к повышенной температуре, pH и солёности сильно варьирует. Хемоорганотрофы;

метаболизм бродильного или дыхательного типа. Обычно

каталазоположительные. Обнаруживаются в разнообразных местообитаниях.

Колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые.



Рис. 2 Сенная палочка (*Bacillus subtilis*)

Край колонии волнистый. Растёт на МПА, МПБ, а также на средах, содержащих растительные остатки, простых синтетических питательных средах для гетеротрофов. Развивается при температуре +5...+45 С (Занина, 2010).

Согласно Российским СанПиН, сенная палочка условно патогенна для человека. Доказано, что штаммы *Bacillus subtilis* не вредны для человека и животных.

B. subtilis является важным продуцентом протеаз, амилаз, аминокислот и некоторых полисахаридов. Является продуцентом полипептидных антибиотиков. Ввиду наличия антагонистических свойств против фитопатогенов, используется в биозащите растений.

Bacillus subtilis, штамм ИПМ 215 – бактерии-антагонисты патогенов. Являются основой микробного препарата Бактофит, рекомендуемого для борьбы с грибными и бактериальными фитопатогенными микроорганизмами. Средство также обладает стимулирующим действием, повышает энергию прорастания и всхожесть семян. Бактерии *Bacillus subtilis* штамма ИПМ 215 производят антибиотик. Вместе с ним они являются действующей основой препарата Бактофит. Установлено, что антигрибным действием обладает вещество, относящееся к антибиотикам аминогликозидного ряда. Биологическая активность препарата обуславливается как антагонизмом самой культуры, так и антибиотиком, синтезируемым в процессе роста и относящимся к группе аминогликозидов. В сухую и жаркую погоду эффективность препарата снижается.

Наибольший эффект может быть получен при применении препарата для обработки сначала семян, а затем растений во время вегетации опрыскиванием.

Обладает токсическим действием на афидофагов, особенно Галлицу афидимизу (*Aphidoletes aphidimyza* Rond.) и Лизифлебусов (*Lysiphlebus testaceipes* Gres.), как при проливах растений против корневых гнилей, так и (особенно) при опрыскивании листовой поверхности против мучнистой

росы.

Препарат Бактофит на основе *Bacillus subtilis*, штамм ИПМ 215 малотоксичен для теплокровных животных. Летальная доза для белых крыс – более 10000 мг/кг веса.

Препараты на основе штамма относятся к 3В и 4 классу опасности для человека и 3 классу опасности для пчел.

Бактофит - биологический препарат предназначен для борьбы с грибными и бактериальными болезнями зерновых, овощных, плодово-ягодных культур, болезнями цветов и лекарственных растений, а также препарат способствует увеличению завязей, что влияет на повышение урожайности на 15-20% у овощей и плодово-ягодных культур. Максимальная эффективность достигается при сочетании предпосевной обработки с обработкой вегетирующих растений.

Действующие вещества:

- споры и клетки культуры-продуцента;
- метаболиты, обладающие антагонистическими и антибиотическими свойствами;
- гумат калия (натрия);
- микроэлементы Mn, S, Si, B, Fe, Zn, Mo;
- инертные наполнители, обеспечивающие сохранность и стабильность препарата.



Рис. 3. Биологический препарат «Бактофит»

Молочнокислые бактерии (Lactobacillus)

Молочнокислые бактерии - грамположительные, факультативные анаэробы. Среди молочнокислых бактерий есть мезофилы и термофилы, оптимальной температурой для которых является температура около 40-50 С.

Молочнокислые бактерии обитают в основном на растениях, плодах, овощах, в желудочно-кишечном тракте, в молоке и молочных продуктах, а также в местах разложения растительных остатков.

В качестве источника углерода используют лактозу, мальтозу.

Оптимальное значение pH для развития молочнокислых бактерий около 4. Молочнокислые бактерии образуют от 1 до 3,5% молочной кислоты (Красноперова, 2011).

Эти бактерии содержатся в биопрепарате «Байкал ЭМ-1».

Байкал ЭМ-1 – это микробиологическое удобрение нового поколения, в котором содержит большое количество анабиотических (полезных) эффективных микроорганизмов (ЭМ), обитающих в почве: бактерии фотосинтеза, молочнокислые, дрожжевые и клеточные.

Взаимодействуя в почве, они вырабатывают ферменты и физиологически активные вещества, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и пр., оказывающие как прямое, так и косвенное положительное влияние на рост и развитие растений.



Рис. 3. Биологический препарат «Байкал ЭМ-1»

2.2. Методика эксперимента.

Семена были проверены на всхожесть в соленой воде, затем обработаны марганцовкой.

Методика проверки семян на всхожесть: в 100 г. воды комнатной температуры растворяют 2 — 3 г. поваренной соли и в раствор высыпают семена, перемешивают их. Всплывшие семена выбрасывают (Ващенко, 2004).

Методика обработки семян перманганатом калия: семена в марлевом

мешочке опускаем в раствор марганцевокислого калия (1г. на полстакана воды) на 10 минут, затем хорошо промываем чистой водой (Ващенко, 2004).

Раствор препарата Бактофит (споры *Bacillus subtilis* ИПМ 215) получали путём разбавления 0,2 г. препарата в 100 мл воды, согласно инструкции на упаковке.

Раствор препарата Байкал ЭМ-1 (споры молочнокислых бактерий) получили путем разбавления 5 капель препарата в 100 мл воды, согласно инструкции на упаковке.

Культуру бактерий препарата Бактофит (вегетативные клетки *Bacillus subtilis* ИПМ 215) получали при +23°C — + 25°C в чашках Петри с агар-агаром (МПА).

При инокуляции семян спорами *Bacillus subtilis* ИПМ 215 и молочнокислых бактерий, семена замачивались перед посевом 2 часа в растворах препаратов «Бактофит» и «Байкал ЭМ-1» соответственно.

После этого семена помещались в 10 контейнеров в 2 ряда по 4 штуки:

4 контейнера - контроль

2 контейнера - семена, обработанные «Байкал ЭМ-1»

2 контейнера - семена, обработанные «Бактофит»

2 контейнера - семена, обработанные смесью обоих препаратов

Семена проращивались 10 дней в термостате при температуре +24.6.

В течение 10 (с 05.04.16 по 15.04.16) дней производились измерения длины корней и побегов, после чего проростки, имевшие достаточную длину побегов, были взвешены. Получен их сырой и сухой вес.

Были сделаны агаровые пластинки, на которые был произведен посев бактерий из обоих препаратов по методу Дригальского: на поверхность МПА в чашке Петри петлей нанесли исследуемый материал. С помощью стеклянного шпателя втерли в среду.

Также произведен перекрестный посев бактерий из обоих препаратов для изучения взаимовлияния бактерий: на МПА петлей высевались молочнокислые бактерии в одном направлении, перпендикулярно этому

направлению на МПА высевалась сенная палочка.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием двухфакторного дисперсионного анализа в едином статистическом комплексе данных. Значимыми мы считали эффекты, вероятность которых равна или более 0,95 (при уровне значимости $p < 0,05$).

2.3. Результаты и обсуждение

Для изучения микрофлоры препарата «Бактофит» нами было проведено *микроскопическое исследование культур выращенных на МПА*.

Образовавшиеся колонии *Bacillus subtilis* были сухие, мелко-морщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые. Край колонии волнистый. Большинство штаммов формировали плоские непрозрачные колонии, белого или бежевого цвета, с фестончатым краем, с шероховатой поверхностью, матовые, имеющие не выделяющийся центр, зернистой структуры. Вегетативные клетки имеют палочковидную форму, размер $0,5-2,5 \times 1,2 - 10$ мкм с округленными или «обрубленными» концами, часто в парах или цепочках. Подвижные. Эндоспоры овальные или иногда сферические либо цилиндрические, высокоустойчивые ко многим неприятным факторам. В клетке образуется не более одной споры. Споруляция не подавляется в атмосфере воздуха. Аэробы или факультативные анаэробы. Окраска по Грамму дала положительный результат. Сравнение выращенных культур и раствора препарата «Бактофит» позволило убедиться в присутствии монокультуры препарата. Клетки *Bacillus subtilis* ИПМ 215 находились в препарате в виде спор, как это показали микроскопические исследования.

Сенная палочка относится к наиболее изученному роду ростостимулирующих бактерий, играющих важную роль в адаптации растений к внешним условиям (Кравченко, Макарова, Азарова, 2002).

Был сделан мазок с агар-агара, зараженного бактериями из препарата «Бактофит» (рис. 4.).

Точно также для изучения микрофлоры препарата «Байкал ЭМ-1» нами было проведено микроскопическое исследование культур выращенных на МПА.

Описание колоний молочнокислых бактерий, выращенных на МПА:

Молочнокислые бактерии росли в виде кремовых колоний с ровными краями, при микроскопии обнаруживаются грамположительные палочки, часто в виде цепочек.

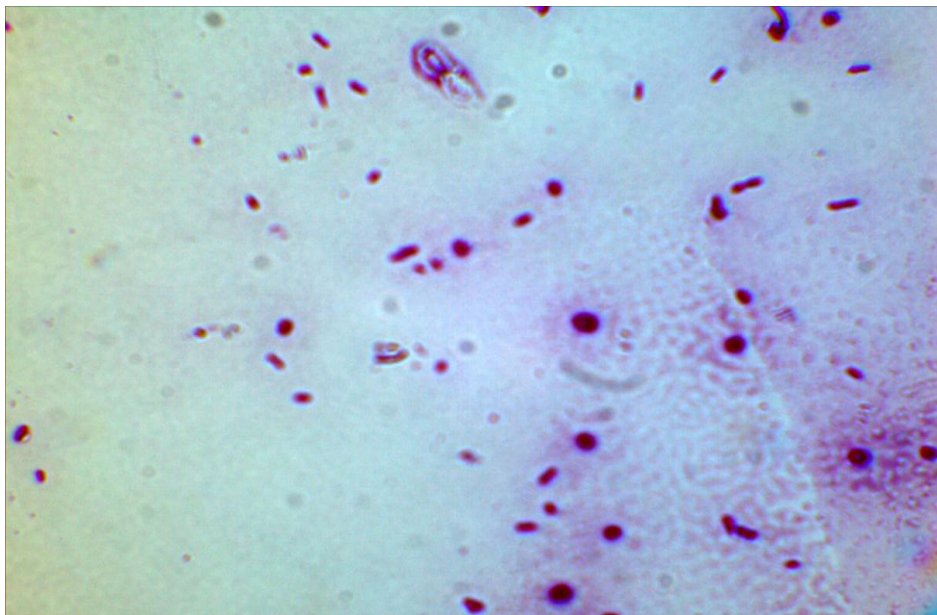


Рис. 4. Микрофотография культуры препарата «Бактофит» выращенной на МПА

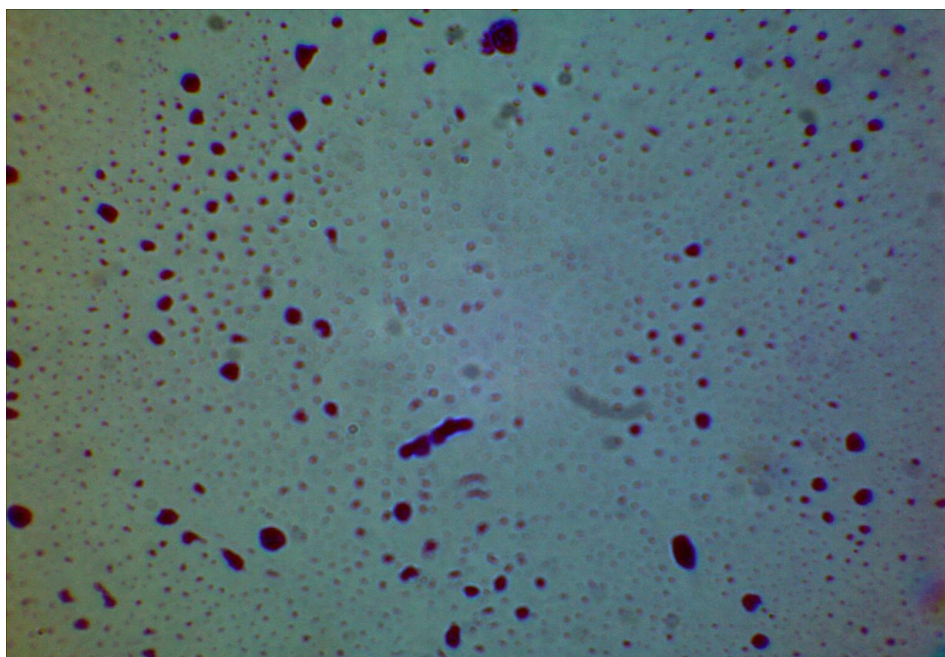


Рис. 5. Микрофотография культуры препарата «Байкал ЭМ-1» выращенной на МПА

Сделав мазок с агар-агара, зараженного бактериями из препарата «Байкал ЭМ-1», мы убедились, что там действительно в большом количестве присутствуют молочнокислые бактерии.

Для изучения взаимодействия молочнокислых бактерий и сенной палочки сделана агаровая пластинка, на которую был произведен перекрестный посев бактерий из обоих препаратов (рис. 6).

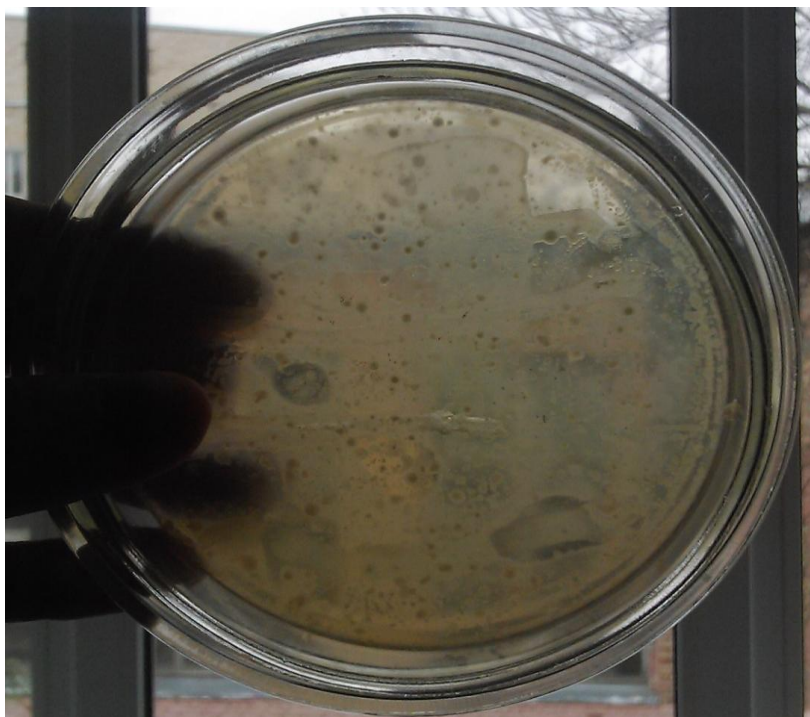


Рис. 6. Фотография чашки Петри с агар-агаром, на который был произведен перекрестный посев бактерий по методу Дригальского.

На фотографии можно увидеть лизогенные пятна, что говорит о том, что сенная палочка подавляла рост молочнокислых бактерий. Одновременное применение обоих препаратов, таким образом, негативно сказывалось на рост растения огурца, что доказывается в дальнейшем результатами измерений корней и побегов семян, обработанных смесью препаратов.

Измерения длины корней и побегов дали следующие результаты (рис.7): Обработка семян препаратом «Байкал ЭМ-1», судя по графику, дала

наибольший эффект, корни этих растений огурца по длине превзошли контроль на 7 день и далее эта разница только увеличивалась.

Семена, обработанные препаратом «Бактофит» показали результат хуже, чем контрольные и так не смогли по длине корней приблизиться к ним, а семена, обработанные смесью обоих препаратов, лишь с 7 дня уменьшили разницу в длине корней с семенами, обработанными препаратом «Бактофит», показывая при этом минимальные результаты.

Также нами проанализирована динамика роста корней растения огурца в процентном соотношении.

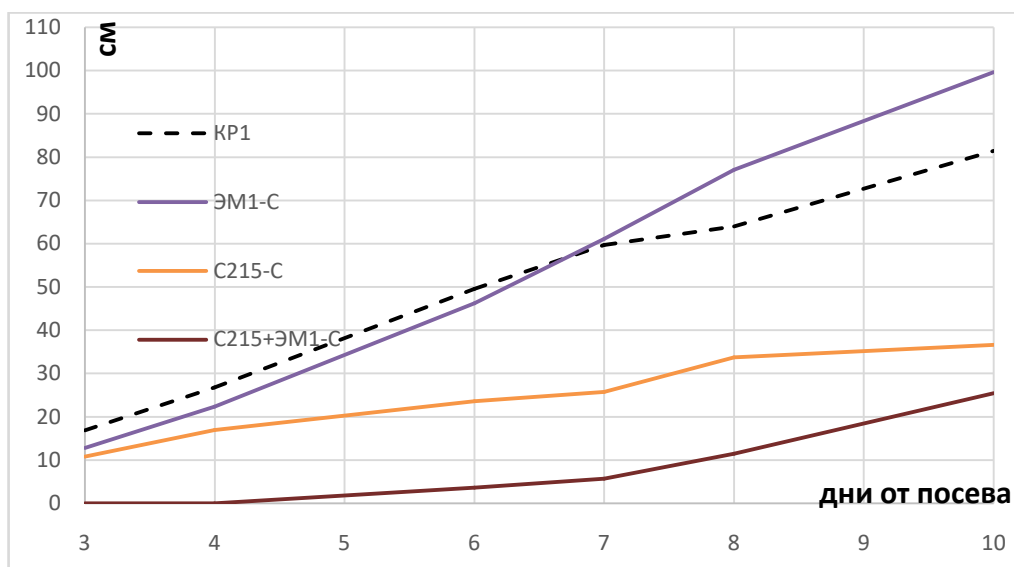


Рис. 7. Динамика роста побегов в абсолютном значении. Обозначения: КР - контроль, ЭМ1- С - семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», С215-С - семена, обработанные препаратом «Бактофит», С215+ЭМ1-С - семена, обработанные смесью препаратов.

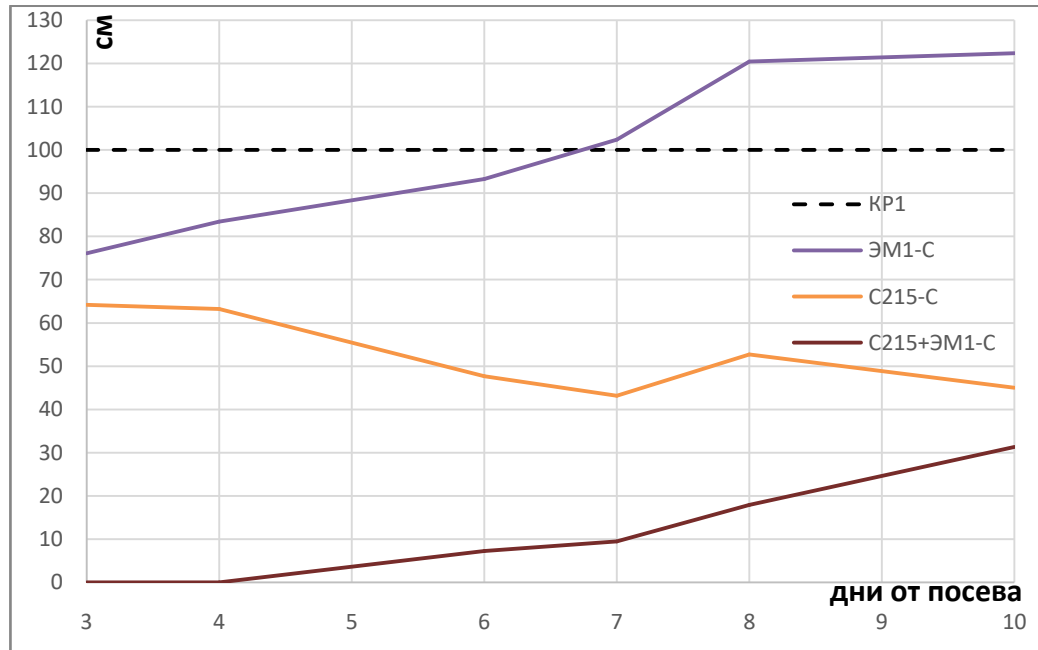


Рис. 8. Динамика роста побегов в процентном соотношении. Обозначения: КР - контроль, ЭМ1- С - семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», С215-С - семена, обработанные препаратом «Бактофит», С215+ЭМ1-С - семена, обработанные смесью препаратов.

Семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1» показали наилучшую динамику роста корней по сравнению с остальными вариантами. Динамика роста корней у семян, обработанных раствором бактофита, снижалась до 7 дня, затем увеличилась на 1 день и снова начала снижаться.

Динамика роста корней семян, обработанных смесью препаратов, была низкой на протяжении всего эксперимента.

Такой же анализ был выполнен нами для побегов растений огурца.

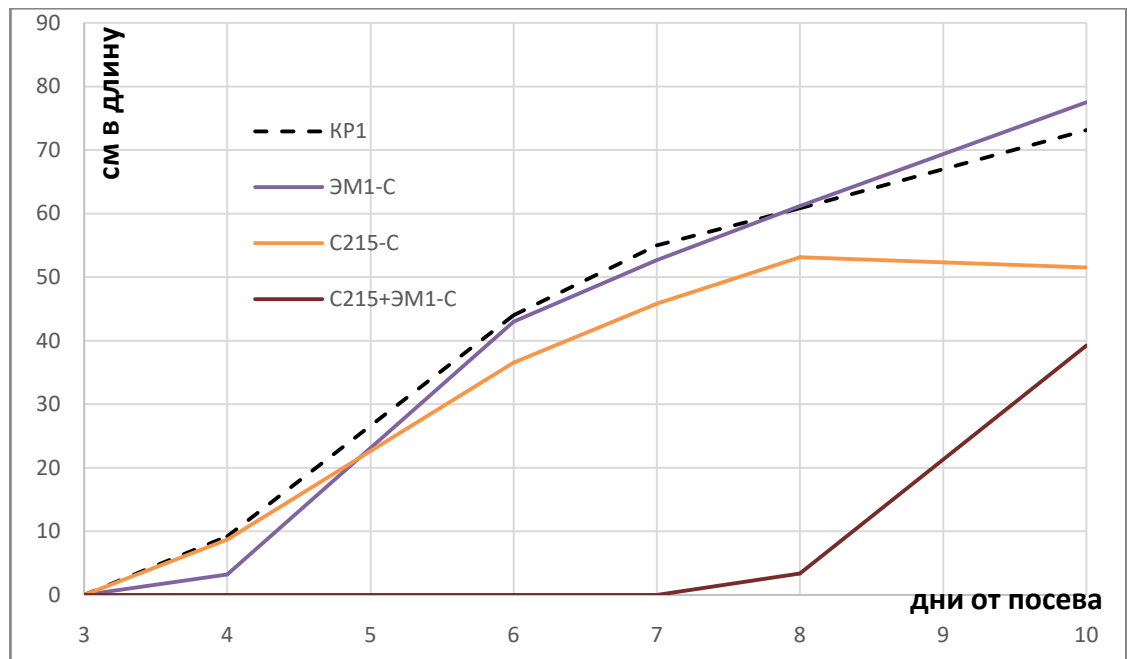


Рис. 9. Динамика роста побегов в абсолютном значении. Обозначения: КР - контроль, ЭМ1- С - семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», С215-С - семена, обработанные препаратом «Бактофит», С215+ЭМ1-С - семена, обработанные смесью препаратов.

Семена, обработанные раствором препарата «Байкал ЭМ-1», превзошли контроль лишь после 8 дня. Семена, обработанные раствором бактофита стали показывать худшие результаты по сравнению с контролем с 4 дня эксперимента и далее разница с контролем лишь увеличивалась. Семена, обработанные смесью препаратов дали побеги лишь на 7 день и с 8 дня их длина довольно быстро увеличивалась, но их побеги так и не смогли достичь длины семян, обработанных препаратом «Бактофит».

Далее нами анализировалась динамика роста побегов в процентном соотношении.

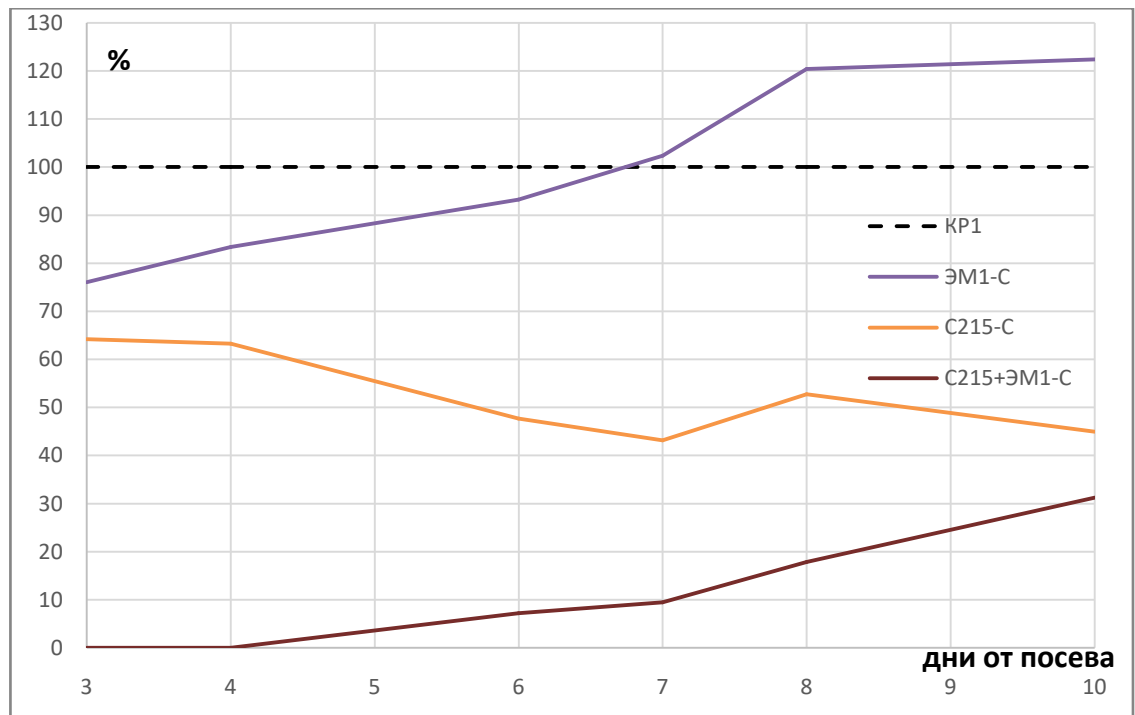


Рис. 10. Динамика роста побегов в процентном соотношении. Обозначения: КР - контроль, ЭМ1- С - семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», С215-С - семена, обработанные препаратом «Бактофит», С215+ЭМ1-С - семена, обработанные смесью препаратов.

Динамика роста побегов семян, обработанных препаратом «Байкал ЭМ-1», увеличилась по сравнению с контролем с 8 дня. Динамика семян, обработанных препаратом «Бактофит», снижалась до 6 дня, затем оставалось одинаковой до 7 дня и затем на 1 день увеличилась, чтобы снова снизиться.

Динамика семян, обработанных смесью препаратов, росла с 7 дня, но не так и достигла показателей контроля.

Наибольший прирост сухой массы наблюдался у проростков, обработанных раствором «Байкал ЭМ-1», проростки, обработанные раствором бактофита, не достигли значений контроля, а проростки, обработанные смесью препаратов, несмотря на самые низкие показатели роста, показали прирост массы, превосходящий показатели контроля.

Также их сырая масса, в отличие от остальных вариантов, превзошла по показателям контроль.

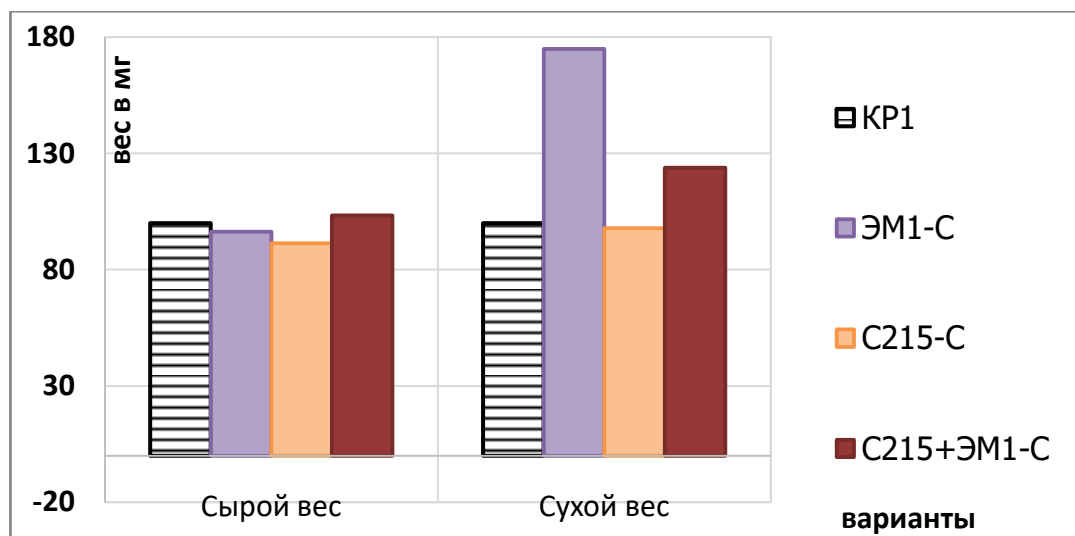


Рис. 11. Сырой и сухой вес растений огурца.

Обозначения: КР - контроль, ЭМ1- С - семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», С215-С - семена, обработанные препаратом «Бактофит», С215+ЭМ1-С - семена, обработанные смесью препаратов.

Далее нами были проанализированы всхожесть и энергия прорастания.

Энергия прорастания (на 4 день):

$$\text{КР: } 20 \cdot 100 : 32 = 62,5 \%$$

$$\text{ЭМ1-С: } 12 \cdot 100 : 16 = 75\%$$

$$\text{С215-С: } 7 \cdot 100 : 16 = 43,75\%$$

$$\text{С215+ЭМ1-С: } 6 \cdot 100 : 16 = 37,5\%$$

Всхожесть (на 8 день):

$$\text{КР: } 26 \cdot 100 : 32 = 81,25\%$$

$$\text{ЭМ1-С: } 11 \cdot 100 : 16 = 68,75\%$$

$$\text{С215-С: } 8 \cdot 100 : 16 = 50\%$$

$$\text{С215+ЭМ1-С: } 4 \cdot 100 : 16 = 25\%$$

По этим показателям были составлены гистограммы. Анализируя их, мы сделали вывод, что максимальную всхожесть показали контрольные семена.

Максимальной энергией прорастания обладали семена, обработанные препаратом «Байкал ЭМ-1», остальные варианты не достигли показателей контроля.

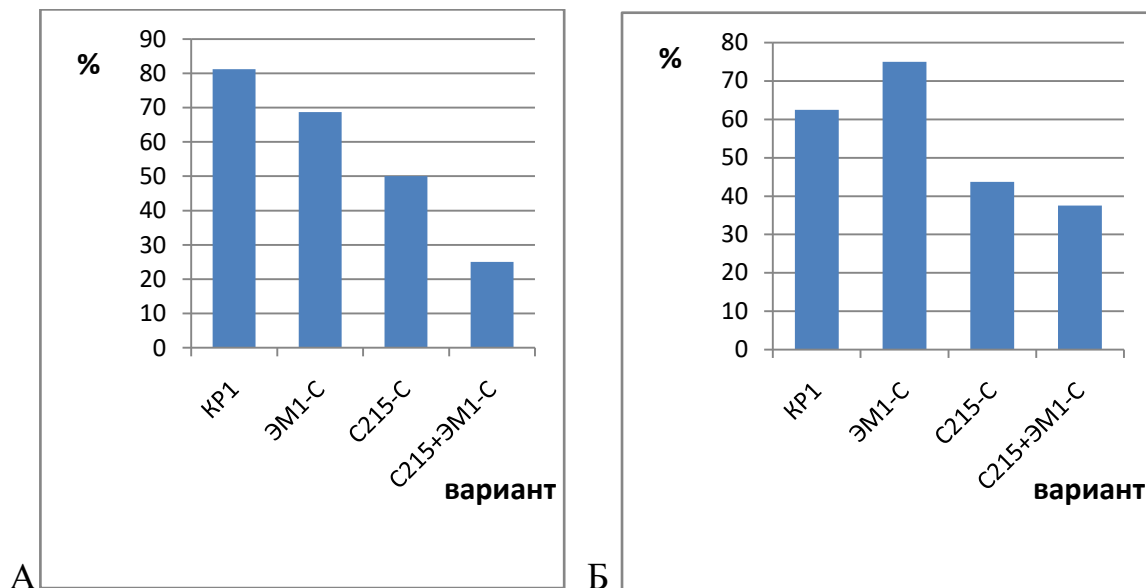


Рис. 10 .(А) Всхожесть и (Б) энергия прорастания проростков растений огурца сорта «Малыш».

Таким образом, ризобактерии обладают набором свойств, влияющих на

рост и питание растений, что в свою очередь, обуславливает широкую вариабельность реакций макроорганизма на инокуляцию и открывает возможность для сочетания многих полезных свойств в одном штамме, что делает интродуцента более эффективным и экологически пластичным (Белимов, Шапошников, Кравченко, Виванко, 2011).

2.4. Использование в школьном образовании методов и результатов исследований влияния бактерий на рост растений

Исследования такого рода могут использоваться в элективных курсах для предпрофильного обучения "Химизация земледелия".

Программа данного межпредметного элективного курса «Химизация земледелия» предназначена для предпрофильной подготовки учащихся 9-х классов с ориентацией на естественно-научный профиль. Теоретической базой курса служат химия, биология и география.

В качестве объектов исследования отобраны минеральные удобрения, химическое строение и свойства которых легко анализируются на основе школьного курса химии. Отбор и структурирование содержания курса осуществлялись, исходя из главной задачи: показать связь химии с землей, сельским хозяйством, умению применять эти вещества на собственных приусадебных участках. Учащиеся приобретают устойчивые навыки работы с нагревательными приборами, весами, мерной посудой и реактивами, учатся самостоятельно проводить агрохимические анализы различных типов почв, некоторых удобрений. Практические работы делают занятия увлекательными и развивают наблюдательность и умение логически мыслить.

Методологический аспект включает использование объяснительно-иллюстративных и личностно-ориентированных технологий, имеющих целью способствовать процессу самоопределению учащихся.

Для организации творческого процесса предусмотрена система проблемных вопросов, творческих заданий. Значительная часть занятий

проводится в коллективной форме, что способствует сплочению группы, развитию дружеских отношений среди ребят. При необходимости проводятся индивидуальные занятия. Это имеет большое значение при подготовке к конференции, для совершенствования знаний в химических областях и, в конечном итоге, в выборе профессии. Проблема химизации решается совместно с учеными разных специальностей: биологами, почвоведом, агрохимиками, химиками; возникают межпредметные связи учебных предметов химии и биологии. Содержание курса включает ряд сведений, обеспечивающих элементы занимательности, что содействует положительной мотивации учения.

Данный курс способствует развитию практических умений и интереса к исследовательской работе, позволяет использовать материал краеведческого характера, использовать полученные знания в своей практической деятельности для охраны окружающей среды и своего здоровья.

Элективный курс рассчитан на 14 ч. Программой предусмотрено изучение теоретических вопросов, проведение лабораторного практикума (3 практических и 2 лабораторных работ), интернет - экскурсии.

Завершает курс защита рефератов, презентаций, творческих проектов на итоговой конференции.

В процессе изучения этого курса возможно использование информации о влиянии различных видов бактерий на рост и развитие сельскохозяйственных растений, также может быть использована информация о современных биопрепаратах, в состав которых входят бактерии (Ниджляева, 2011).

Проведенное нами исследование показывает, что бактериальные удобрения могут быть очень эффективными при выращивании сельскохозяйственных растений, к тому же, они являются намного безопаснее, чем методы химизации. И, таким, образом результаты нашего исследования могут быть учтены в этом элективном курсе.

ВЫВОДЫ

1. Все препараты на первых этапах в разной степени ингибируют рост побегов и всхожесть растения огурца, что, видимо связано со стрессовой реакцией растения.
2. Позже ингибирование сменяется стимуляцией за счет развития симбиотических отношений.
3. Максимальная стимуляция роста, развития и сухого веса растения огурца достигается ассоциацией с молочнокислыми бактериями
4. Сенная палочка ингибирует рост колоний молочнокислых бактерий, поэтому комплексное применение препаратов угнетает рост растения огурца.
5. Энергия прорастания опытных растений оказалась низкой, в связи с этим снижается достоверность различий, поэтому для более определенных выводов необходимо подобрать другой сорт растения огурца
6. В целом, биопрепарат «Байкал ЭМ-1» действительно положительно влияет на рост растения огурца, «Бактофит» показал меньшую эффективность, а взаимодействие обоих препаратов показывает наихудшие результаты, так как в этом случае происходит подавление одних бактерий другими.
7. Использование готовых бактериальных препаратов пригодно для моделирования взаимодействия природных ассоциаций в первом приближении. Для более детальных выводов необходимо использовать большее количество видов микроорганизмов.
8. Подобные исследования могут быть очень ценными для таких курсов, как элективный курс для предпрофильного обучения "Химизация земледелия".

Список литературы

- 1) Азарова Т.С., Кравченко Л.В., Макарова Н.М. [и др.]. Выделение и фенотипическая характеристика ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов // Микробиология. 2002. Т. 71. №4. С. 521-525.
- 2) Аленькина С.А, Никитина В.Е., Пономарева Е.Г. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимоотношениях с растениями // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями // Под ред. В.В. Игнатова.- М.: Наука, 2005 .С. 70-97.
- 3) Белимов А. А., Кожемяков А. П. Смешанные культуры азотфиксирующих бактерий и перспективы их использования в земледелии (обзор) // Сельскохозяйственная биология. Серия «Биология растений». 1992. № 5. С. 77—87.
- 4) Белимов А.А., Иванчиков А.Ю., Юдкин Л.Ю. [и др.]. Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростостимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя // Микробиология. 1999, № 5. С.392-397.
- 5) Белимов А.А., Шапошников А.И., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16-22.
- 6) Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал, №10. 1998. URL: http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/9810_025.pdf (дата обращения 07.02.16).
- 7) Бузолева Л.С., Ли Н.Г., Сидоренко М.Л. Влияние летучих метаболитов сапрофитной микрофлоры разных типов почв на размножение *Listeria Monocytogenes* // Международный журнал экспериментального образования. 2013. № 10. С. 288-291.

8) Ващенко И.М., Лошаков В.Г., Ягодин Б.А. и др. Биологические основы сельского хозяйства; под ред. И.М. Ващенко. Изд-во Академия, 2004. С. 225.

9) Губайдуллина Т.С., Самосова С.М. Влияние бактерий-стимуляторов и бактерий-ингибиторов роста растений на ростовые процессы и фосфорный обмен листьев озимой пшеницы // Микроорганизмы и высшие растения. 1978. С. 55-65.

10) Занина М.А., Ларионов М.В., Семенова Н.Ю., Смирнова Е. Б. Общая микробиология: учебное пособие для студентов экологических, биологических и агрономических специальностей вузов. Саратов. Изд-во Наука, 2010. С. 134.

11) Зеликов В.Д. Почвоведение. Изд-во Лесн. Пром-сть., 1981. С. 216

12) Карпунина Л.В. Роль агглютинирующих белков ризобий и азотфиксирующих бацилл при взаимодействии с растениями // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. 2005. С. 98-117.

13) Ковров Б.Г., Тирранен Л.С., Титова Г.Т. Метаболические взаимодействия в микробных ценозах, образующиеся при культивировании пшеницы в фитотроне // Микробиология. 1981. С. 700-704.

14) Кожемяков А.П., Чеботарь В.К. Биопрепараты для земледелия // Биопрепараты в сельском хозяйстве. 2005. С. 18-54.

15) Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Штарк О.Ю. Продуцирование антифунгальных метаболитов *Pseudomonas chlororaphis* при росте на различных источниках питания // Микробиология. 2003. С. 645-650.

16) Красноперова Ю.А. , Касаткина Н. А., Ильина Н. Г., Бугеро Н. С. // Микробиология: учебно-методическое пособие. М.: Флинта: Наука, 2011. С. 71.

17) Литвишко Е.В., Соколов М.С. Биологическая защита растений в США // Защита растений. 1993. № 11. С. 18-20.

18) Нарциссов В.П. Научные основы системы земледелия. М.: Колос,

1982. С. 230.

18) Марченко С. А. Индикация загрязнения почвы стойкими органическими загрязнителями по функциональной реакции микробного сообщества. Москва, 2008. С. 121.

19) Маслов О.А. Ценность и типы почвенных бактерий // Аналитическая лаборатория «Агротест». 2010. URL : http://www.agrotest.com/pict_mod/info/25_item_file_20_item_file_maslov_01_15_no_rekl.pdf (дата обращения 27.03.16).

20) Ниджляева Е. В. // Программа элективного курса для предпрофильного обучения: «Химизация земледелия». 2011. URL: <https://infourok.ru/elektivniy-kurs-dlya-predprofilnogo-obucheniya-himizaciya-zemledeliya-484606.html> (дата обращения 27.02.16).

21) Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во Московского университета, 1986. С. 118-119.

22) Руссель С. Микроорганизмы и жизнь почвы. Издательство: Колос, 1977. С. 225.

23) Федоров А.А. Жизнь растений. Том 1. Введение. Бактерии и актиномицеты; под ред. Красильников Н.А., Уранов А.А. М.: Просвещение, 1974. С. 342.

24) Шабаев В. П. Бактерии могут заменить минеральные удобрения // «Химия и жизнь XXI век». 2000. URL: http://www.informnauka.ru/rus/2000/2000-01-28-87_r.htm (дата обращения 16.03.16).

25) Яброва Ю.И., Швабенланд И.С. Роль почвенной биоты на первичное почвообразование отвалов вскрышных пород Восточно-Бейского угольного разреза республики Хакасия // Вестник Волжского ун-та им. В.Н. Татищева. 2012. № 3. С. 76.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
 44.03.01 Педагогическое образование
 Профиль подготовки «Биология»

Утверждаю:
 Зав. кафедрой
 _____ Г.А. Карпова
 « 17 » 11 2015 г.

Задание

По ВКР студента

Струев Станислав Сергеевич

Тема работы

Нативные ассоциации ризобактерий растений

Утверждена приказом по Университету от «30.10.2015 г. № 1166/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 23 » 05 2016 г.

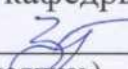
КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Выбор темы обоснование ее актуальности. Определение объектов изучения	Ноябрь 2015	<i>выполнено</i>
2.	Определение последовательности работ и составление плана обзора литературы	Ноябрь-Декабрь 2015	<i>выполнено</i>
3.	Сбор и анализ литературных данных. Написание обзора литературы.	Декабрь - Апрель 2016	<i>выполнено</i>
4.	Изучение различных методик определения количества микроорганизмов в почве и ризосфере по разным методикам и выбор методики соответствующей целям исследования	Январь 2016	<i>выполнено</i>
5.	Изучение методик приготовления различных сред для идентификации почвенных и ризосферных микроорганизмов выбор соответствующих сред	Январь 2016	<i>выполнено</i>
6.	Определение численных характеристик и разнообразия микрофлоры в нативных ассоциациях ризобактерий растений.	Февраль 2016	<i>выполнено</i>
7.	Определение тинкториальных свойств микрофлоры ризобактерий растений.	Февраль 2016	<i>выполнено</i>
8.	Определение культуральных свойств микрофлоры ризобактерий растений.	Февраль 2016	<i>выполнено</i>
9.	Проанализировать уровень профориентационной работы в школах. Предложить методы профессиональной ориентации школьников с использованием методик и результатов ВКР.	Март 2016 (во время прохождения педагогической практики)	<i>выполнено</i>
10.	Изучение влияния чистых культур бактерий на рост и развитие тестовых растений.	Апрель 2016	<i>выполнено</i>

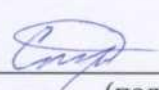
11.	Изучение влияния и взаимодействия нескольких культур бактерий на рост и развитие тестовых растений.	Апрель 2016	<i>выполнено</i>
12.	Статистическая обработка данных и обобщение экспериментальных данных.	Апрель 2016	<i>выполнено</i>
13.	Написание экспериментальной главы ВКР.	Апрель 2016	<i>выполнено</i>
14.	Апробация результатов на научно практ. конференции «Актуальные проблемы науки и образования».	Апрель 2016	<i>выполнено</i>
15.	Подготовка доклада для защиты ВКР	Май 2016	<i>выполнено</i>
16.	Проверка ВКР в системе «Антиплагиат»	Май 2016	<i>выполнено</i>
17.	Сдача оформленных и переплетенных экземпляров ВКР	Май 2016	<i>выполнено</i>

Дата выдачи задания: 15 ноября 2016 г.

Руководитель: Заплатин Б. П. доцент кафедры Общая биология и биохимия ПИ ПГУ


(подпись)

Задание принял к исполнению


(подпись)