

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.ДВ.01.01 Почвенная биотехнология

Направление подготовки 05.04.06 Экология и природопользование

**Профиль образовательной программы Экологический мониторинг и безопасность
окружающей среды**

Форма обучения заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	3
1.1 Лекция № 1 Почвенная биотехнология: краткая история развития. Физико-химические характеристики почвы. Фиксация молекулярного азота: значение, микроорганизмы, процесс фиксации молекулярного азота	3
1.2 Лекция № 2 Микроорганизмы как естественные антагонисты фитопатогенных грибов и бактерий и их метаболиты. Биоудобрения и биоинтенсивное земледелие	7
2. Методические указания по проведению лабораторных работ	13
2.1 Лабораторная работа №1 Знакомство с правилами работы в биотехнологической лаборатории. Подготовка питательных сред. Изучение численности, биомассы и расчет количества почвенных организмов	13
2.2 Лабораторная работа № 2 Получение накопительных культур	14
2.3 Лабораторная работа № 3 Выделение чистых культур почвенных организмов из почв разного состава	14
2.4 Лабораторная работа № 4 Изучение способности почвенных организмов в биосинтезу ферментов	15
2.5 Лабораторная работа № 5 Изучение антагонистических свойств почвенных организмов. Биосинтез антибиотиков и стимуляторов роста растений	15
3. Методические указания по проведению практических занятий (не предусмотрено РУП).....	16
4.Методические указания по проведению семинарских занятий (не предусмотрено РУП).....	16

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1 (2 часа).

Тема: Почвенная биотехнология: краткая история развития. Физико-химические характеристики почвы. Фиксация молекулярного азота: значение, микроорганизмы, процесс фиксации молекулярного азота

1.1.1 Вопросы лекции:

1. Предмет, задачи, методы почвенной биотехнологии. Этапы развития науки.
2. Физико-химическая характеристика почвы
3. Микрофлора почвы.
4. Характеристика прокариот, осуществляющих азотфиксацию
5. Механизм фиксации атмосферного азота клубеньковыми бактериями
6. Механизм фиксации атмосферного азота свободноживущими бактериями.

1.1.2 Краткое содержание вопросов

1. Предмет, задачи, методы почвенной биотехнологии. Этапы развития науки.

Биотехнология – это совокупность промышленных методов, в которых используют живые организмы и биологические процессы для производства различных продуктов. Почвенная биотехнология изучает роль флоры и фауны в трансформации различных субстратов в ценные конечные биологически активные соединения, которые являются источниками питания ауто- и гетеротрофов; разрабатывает приемы регуляции биотехнологических процессов для оптимального получения целевого продукта. Задачей почвенной микробиологии является изучение почвенной флоры и фауны в связи с решением задачи повышении продуктивности земледелия и в том числе разработка биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами, получение бактериальных удобрений; разработка микробиологических методов рекультивации почв. В истории развития почвенной биотехнологии можно выделить следующие важные этапы: 1763 г. – М.В. Ломоносов в труде «О слоях земных» писал, что почвообразовательный процесс – результат длительного взаимодействия растительности с горными породами. 1846 - 1903 г.г. – В.В. Докучаевым разработано понятие о почве как естественном историческом теле, которое обладает свойствами живой и неживой природы. Он создал учение о географических зонах, разработал научную классификацию почв и развил агрогеологическое направление, которое рассматривало почву как геологическое образование. 1845 - 1895 г.г. – П.А. Костычев создал и развил агрономическое направление почвоведения, т.е. взаимоотношение почвы и растительности, почвенное плодородие; оп-

ганизовал первую в России агрохимическую лабораторию. 1860 - 1927 г.г. – М.Н. Сибирцев, К.Д. Глинка и др. разрабатывали географическое направление, то есть сравнительный анализ почв, их профиль в связи с почвообразованием. 1872 - 1932 г.г. - К.К. Гедройц заложил основы коллоидной химии почв. 1863 - 1945 г.г. - В.И. Вернадский, А.П. Виноградов и В.Р. Вильямс разрабатывали биогеохимическое направление, т.е. роль живых организмов в жизни почвы. В последнее время много внимания уделяется агробиологической концепции земле-делия. Большой вклад в развитие этого направления внесли Е.Н. Мишустин, М.М. Кононова, Д.Г. Звягинцев, В.Т. Емцев, Д.И. Никитин, Н.А. Красильников и др.

2. Физико-химическая характеристика почвы

Обычно в почвах для большинства культур микроэлементов достаточно. Из почвы растения извлекают азот, фосфор и калий, в меньших количествах серу, бор, магний и другие элементы. Содержание азота и фосфора зависит от количества в почве гумуса, а калия – от состава минеральной части почвы. Растениям, в основном, доступны только вещества, которые растворимые в воде и слабых кислотах. В почве меньше, чем в атмосфере кислорода (12 - 14 %), но больше углекислого газа (6 - 8 %). Она содержит метан, углеводороды, сероводород, жирные кислоты и продукты неполного окисления органических веществ. Почва обладает радиоактивностью. Ферменты почвы действуют в адсорбированной или иммобилизованной форме. Их активность мало исследована, т.к. она зависит от природы и свойств адсорбентов, условий среды, длительности контакта фермента и носителя и т.д. Кислотность почвы – один из хорошо изученных показателей. В кислой почве мало доступных растениям фосфора, бора, алюминия, марганца и др. Кислый почвенный раствор разрушает структуру почвы, ее рыхлость, водовоздушный режим и др. На таких почвах плохо размножаются полезные микроорганизмы; у большинства растений плохо растут и ветвятся корни; увеличивается кислотность соков в растениях, то есть нарушается обмен веществ. Ведущий признак почвообразовательного процесса – образование перегноя (гумуса). Гумус составляет 85 - 90 % всей массы органического вещества почвы. В нем много азота, фосфора и других элементов. Гумус представляет собой группу высокомолекулярных соединений, химическая природа которых еще точно не установлена. В нем выделяют четыре группы соединений: гуминовые кислоты составляют 15 - 40 % гумуса. Они образуются при разложении отмерших растений при участии микроорганизмов, влаги и кислорода атмосферы. По химической структуре гуминовые кислоты представляют собой конденсированные ароматические соединения, в которых обнаружены фенольные гидроксилы, карбоксильные, карбонильные и ацетогруппы. В кислотном гидролизате гуминовых кислот определяются аминокислоты, амиды, пуриновые и пиримидиновые основания. Молекулярная масса гуминовых кислот составляет 1300-1500. Гуми-

ны составляют 20 - 30 % гумуса. К ним относят те соединения гумуса, которые не извлекаются из почвы щелочными растворами. Считают, что это производные гуминовых кислот, прочно связанные с минеральной частью почвы. Гиматомелановые кислоты являются спирторастворимой фракцией гуминовых кислот. Фульвокислоты составляют 35 - 50 % гумуса. По строению близки к гуминовым кислотам, но имеют менее конденсированное ароматическое кольцо, небольшую молекулярную массу, большее число разнообразных функциональных групп, обладают восстановливающими свойствами, образуют комплексные растворимые соединения с железом, алюминием.

3. Микрофлора почвы

Важную роль в образовании гумуса и его использовании играют почвенные микроорганизмы. Считают, что примерно 0,1 - 2,5 % почвенного органического вещества состоит из клеток разных микроорганизмов. Они формируют структурные компоненты гумусовых веществ следующим образом: при разложении растительных остатков; выделяют структурные вещества в процессе жизнедеятельности; при отмирании поставляют в почву большое количество органической массы. В почве обитают бактерии, актиномицеты, мицобактерии, грибы, водоросли, простейшие, также вирусы и бактериофаги. Распределение бактерий в почве зависит от географического расположения; глубины, механического и агрегатного состояния почвы, времени года, водного и солевого режима, температуры, рН, экологического состояния, применения минеральных удобрений, наличия антибиотиков, фитонцидов, бактериофагов, типа растительности. Большинство бактерий почвы развиваются при нейтральном рН, температуре 25 - 45 °C, при относительной влажности выше 95 %. На глубине 3 - 4 м почва почти стерильна. Важное значение в повышении урожайности растений и улучшении плодородия почвы имеют микробы-антагонисты. Это бактерии, грибы, дрожжи и пр., которые вырабатывают антибиотические вещества. Они подавляют рост и развитие патогенной микрофлоры; оздоравливают почву; препятствуют болезням растений; способствуют усвоению растениями антибиотических веществ; усиливают иммунобиологические свойства растений и др.

В зависимости от микробиологических свойств почвы классифицируют следующим образом: А. Болезнетворные почвы. В них 5 - 20 % составляют микроорганизмы типа *Fusarium*. После внесения органики с большим содержанием азота в них образуются продукты неполного окисления, которые токсичны для растений. В них большое количество энергии теряется на газообразование.

В. Почвы, подавляющие болезни. Их микрофлора (*Trichoderma*, *Aspergillus* и *Streptomyces*) продуцирует большое количество антибиотиков. Зерновые культуры, выра-

щенные на этих почвах, редко повреждаются вредителями или болезнями. Такие почвы имеют высокую проницаемость для воздуха или воды.

С. Ферментативные почвы (зимогеники). В них легко осуществляются различные виды ферментации. Они имеют приятный аромат, благоприятные физические свойства, в ней содержится много БАВ и мало метана, аммиака и диоксида углерода. Синтезирующие почвы содержат значительное число микроорганизмов, которые регулируют содержание атмосферного азота и углекислоты в почве. Они даже при небольших количествах органики, но при достаточной влажности способны поддерживать хорошее плодородие почвы.

4. Характеристика прокариот, осуществляющих азотфиксацию

Семейство *Azotobacteraceae* объединяет виды, имеющие крупные клетки, склонные к изменению морфологии в зависимости от возраста культуры и условий культивирования. Среди представителей этого семейства встречаются подвижные и неподвижные формы. Бактерии рода *Azotobacter* образуют цисты. Хемоорганогетеротрофы. Способны активно фиксировать молекулярный азот. Облигатные аэробы. Обитают в почве, воде и на поверхности растений. В состав семейства *Rhizobiaceae* входят виды, во многих отношениях сходные с таковыми семейства *Pseudomonadaceae*, но отличающиеся от них плеоморфизмом, а также способностью вызывать разрастание тканей, приводящее к образованию клубеньков и галлов на корнях или стеблях различных видов растений. В род *Rhizobium* (клубеньковые бактерии) объединены бактерии, вызывающие образование клубеньков на корнях бобовых растений и способные фиксировать азот в условиях симбиоза с ними.

5. Механизм фиксации атмосферного азота клубеньковыми бактериями

Клубеньковые бактерии проникают через корневые волоски в корневую систему растения и стимулируют деление тетраплоидных клеток корня, приводящее к образованию клубенька. В нем происходит интенсивное размножение бактерий. В молодых клубеньках большинство бактериальных клеток имеют форму палочек. В процессе последующего развития наблюдается образование клеток неправильной формы (бактериоидов), в которых и происходит активная фиксация N_2 - бактериоиды можно рассматривать как дифференцированные формы, приспособленные для наилучшего осуществления определенной функции. В первую очередь это связано с контролированием поступления в бактериоиды молекулярного кислорода, которое осуществляется с помощью находящегося в клубеньках леггемоглобина, цитоплазматического гемопротеина, в синтезе которого участвуют растение и бактерии. Апогемоглобин (белок без тема) синтезирует растение. За синтез гема ответственны бактериоиды. Леггемоглобин, обладающий как и гемоглобин, высоким сродством к O_2 , обеспечивает перенос кислорода к бактериоидам в количестве, необходимом для обеспечения их энергией, и в то время защищает бактериоиды от избытка O_2 путем

его связывания. К фиксации N_2 способны только клубеньки, содержащие леггемоглобин. Отношения между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями можно определить как мутуализм, т. е. такой вид симбиоза, при котором оба симбионта извлекают выгоду из сожительства: растение получает азот, клубеньковые бактерии — углеродсодержащие вещества и минеральные соли. Показана способность различных видов клубеньковых бактерий фиксировать N_2 без какой-либо связи с растительными клетками. Для этого необходимо обеспечить клубеньковые бактерии подходящими источниками углерода (преимущественно пентозами), минимальным количеством фиксированного азота и промежуточными соединениями.

6. Механизм фиксации атмосферного азота свободноживущими бактериями.

Свободноживущие клубеньковые бактерии синтезируют свой собственный гемоглобин, отличающийся структурно, но не функционально от леггемоглобина. Все бактерии, принадлежащие к роду *Agrobacterium*, за исключением вида *A. radiobacter*, вызывают тканевые разрастания на стеблях различных растений, на основании чего они могут рассматриваться как внутриклеточные паразиты. Бактерии проникают в ткань растения-хозяина, используя для этого повреждения на его поверхности. Круг растений, поражаемых ими, очень широк. Например, типичный представитель рода *A. tumefaciens* вызывает образование галлов у растений, относящихся более чем к 40 семействам.

1.2 Лекция № 2 (2 часа)

Тема: Микроорганизмы как естественные антагонисты фитопатогенных грибов и бактерий и их метаболиты. Биоудобрения и биоинтенсивное земледелие.

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Понятие антагонизма
2. Характеристика метаболитов естественных антагонистов патогенных микроорганизмов
3. Общие сведения об удобрениях
4. Виды бактериальных удобрений

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие антагонизма

В микромире существуют взаимоотношения, когда один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого — антагонизм. Такие взаимоотношения существуют между самими микроорганизмами, между микроорганизмами и животными, между микроорганизмами и растениями. Антагонизм между микроорганизмами может

быть вызван конкуренцией за источники питания и действием антибактериальных веществ, получивших название антибиотиков (от греч. *anti* — против + *бино* — жизнь).

Бактерии-антагонисты, подавляя и уничтожая некоторые виды микроскопических грибов и бактерий, имеют большое значение в природе, почвообразовательных процессах и особенно в борьбе с болезнетворными микробами, защищая корни растений от фитопатогенных грибов. В почве могут находиться патогенные микроорганизмы (возбудители столбняка, ботулизма, газовой гангрены, сибирской язвы, кишечных заболеваний), которые попадают туда с трупами, испражнениями, зараженными сточными водами и разными отбросами. Некоторые патогенные микроорганизмы в почве даже размножаются, некоторые пребывают в неактивном состоянии (в виде спор), но большинство из них не находит в ней благоприятных условий для размножения и со временем теряет болезнетворность и гибнет.

2. Характеристика метаболитов естественных антагонистов патогенных микроорганизмов

Враждебное взаимоотношение, когда продукты жизнедеятельности одного микробы губительно действуют на та^ковые другого. Гнилостные микробы не могут жить в одной среде с молочно-кислыми, так как образуемая молочная кислота по^нижает рН и подавляет рост алкалофильных организмов. На этом явлении основаны процессы силосования, квашения, приготовления и сохранения кисломолочных продуктов. Антагонизм между микробами широко распространен в природе. В борьбе с возбудителями разных болезней его использует человек. Применяемые антибиотические вещества имеют специфическое действие. Этим они отличаются от других продуктов жизнедеятельности микробов. Антибиотики — это специфические соединения (вторичные метаболиты), способные в незначительных количествах избирательно задерживать рост или убивать микроорганизмы. Первые исследования бактериальных хитинолитических ферментов как возможного фактора антагонизма датированы началом 60-х годов XX века, когда было опубликовано несколько работ, посвящённых антифунгальной активности почвенных хитинолитических бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Было установлено, что клеточная стенка грибов, содержащая хитин в качестве основного структурного компонента, может быть разрушена под действием бактериальных хитиназ. Последующие эксперименты с использованием очищенных хитиназ, хитиназ-негативных мутантов и хитиназ-позитивных трансформантов чётко продемонстрировали участие хитиназ в миколизе. К настоящему времени показано, что особенно чувствительными к действию бактериальных хитиназ являются концевые участки грибных гиф, так как именно в данных частях мицелия происходит синтез волокон хитина.

Тем не менее, фактическая роль бактериальных хитиназ в миколитическом процессе до конца не ясна. Было замечено, что механизм, благодаря которому осуществляется ингибирование роста грибов хитиназами, далеко не всегда осуществляется за счёт их хитинолитической активности. В этой связи примечательно, что бактериальные хитиназы, относящиеся к семейству 18, не обладают какой-либо антифунгальной активностью. Более того, не совсем понятно, различие ли в структуре или в ферментативной активности хитиназ связано с их потенциальной антифунгальной активностью. Многие исследования с применением индуцированного мутагенеза, призванные установить общие свойства хитиназной антифунгальной активности, так и не выявили какой-либо чёткой закономерности. Так, мутантные хитиназы класса I из семян каштана, не обнаруживавшие хитинолитической активности, проявляли большую антифунгальную активность, нежели хитиназы дикого типа. Антифунгальная активность хитиназ класса I табака была в три раза выше при наличии хитин-связывающего домена. Эти результаты показали, что большая роль в антифунгальной активности принадлежит хитин-связывающей активности, а не хитиназной. И наоборот, хитин-связывающий домен хитиназы класса I ржи не проявлял никакой антифунгальной активности, в то время как наличие каталитического домена этой же хитиназы приводило к ингибированию роста контрольного грибного патогена. В исследованиях Andersen и соавт. (1997) использовали мутантную хитиназу класса II ячменя, лишённую хитинолитической активности, и показали, что антифунгальная активность при этом снизилась на 85 % по сравнению с диким типом. Хитиназы с хитин-связывающим доменом (классы I и II) имеют антифунгальный механизм, отличный от такового хитиназ, лишённых этого домена. При наличии интактного хитин-связывающего домена, антифунгальная активность осуществляется в основном за счёт связывания хитина ферментом.

Кроме того, бактериям для осуществления лизиса грибного мицелия требуются и другие факторы. В результате многочисленных экспериментов *in vitro* было показано, что почвенные бактерии значительно различаются по своим миколитическим свойствам. De Boer и соавт. (1998) предположили, что такой широкий спектр различий может быть объяснен участием в миколизе антибиотиков. Обычно бактерии продуцируют несколько типов эндо- и экзохитиназ. Roberts и Selitrennikov (1988) установили, что эндохитиназы оказывают более сильное действие на рост мицелия, нежели экзохитиназы. Однако максимальный антифунгальный эффект достигался при действии комплекса, включающего как эндо-, так и экзохитиназы.

Открытие явления миколиза, осуществляемого хитинолитическими бактериями, побудило к дальнейшим исследованиям данного процесса с целью возможного применения подобных штаммов для защиты растений. В поле зрения таких исследований попали ризо-

сферные бактерии, так как они лучше адаптируются к условиям среды, в которых фитопатогенные грибы поражают корни растений.

Различными исследователями было показано, что штаммы с установленной *in vitro* антифунгальной активностью уменьшают симптомы болезней растений в условиях оранжереи. Однако применение таких штаммов в полевых условиях оказалось гораздо менее успешным. Для разрешения этой проблемы необходима дополнительная информация об экологической функции продуцирующих хитиназы бактерий и роли, которую их микробиологическая активность играет в естественных условиях.

3. Общие сведения об удобрениях

Удобрения – это вещества, которые улучшают питание растений и свойства почвы. В настоящее время единой классификации удобрений нет. Выделяют: 1) минеральные удобрения – азотные, фосфорные, калийные, магниевые, молибденовые и т.д.; 2) органические – навоз, компосты, торф, зеленые удобрения и др. По агрономическому назначению удобрения делят на: 1) прямые – их применяют из-за содержащихся в них питательных веществ, необходимых растениям (азотные, фосфорные, навоз, компосты и др.); 2) косвенные – это вещества, которые используют для улучшения свойств почвы (например, известь – для ликвидации излишней кислотности почв). Ежегодно во всем мире в почву в виде минеральных удобрений вносится около 60 млн. т азота, фосфора, калия. Они накапливаются в почве и грунтовых водах, отрицательно влияют на состояние микробного сообщества почвы, вызывают потерю гумуса, нитратное загрязнение кормов и продуктов питания, рост онкологических заболеваний животных и человека. Альтернативой химизации сельского хозяйства являются естественные, биологические технологии. В этом отношении перспективным является использование микробиологических землеудобрительных препаратов, или бактериальных удобрений. Бактериальные удобрения содержат монокультуру или комплекс микроорганизмов, которые способствуют накоплению в почве элементов питания растений, стимулируют их рост и развитие, обладают антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам. Преимущества биоудобрений перед химическими средствами: поддержание и сохранение окружающей среды; получение экологически чистой продукции; сохранение всех взаимосвязей и цепей биосфера, созданных природой; биологизация землемеделия; восстановление плодородия почвы и пр. В 1888 г. М. Бейеринк выделил чистую культуру клубеньковых бактерий *Rhizobium* бобовых растений. После этого стали производиться первые микробные землеудобрительные препараты.

4. Виды бактериальных удобрений

В настоящее время известны следующие биоудобрения:

1. Препараты на основе симбиотических азотфикссирующих бактерий (нитрагин, ризоторфин);
2. Препараты на основе несимбиотических азотфикссирующих бактерий (флавобактерин, ризоэнтерин, агрофил, ризоагрин, азотобактерин, ризобактерин, экстрасол и др.);
3. Фосфорбактерин;
4. Биологически активный грунт
5. Грибы-микоризообразователи

Нитрагин и ризоторфин производятся на основе активных жизнеспособных бактерий из рода *Rhizobium*. Они усваивают азот атмосферы и переводят его в связанную форму, которая доступна для питания растений. Растения снабжают бактерии энергией, которая необходима для фиксации азота. Таким образом, возникает симбиоз бактерий и бобовых культур. Это обеспечивает благоприятные условия азотного питания и повышение урожайности. Фиксация атмосферного азота возможна только в клубеньках, которые образуются на корнях растений. Выпускается два вида нитрагина – почвенный и сухой. Почвенный нитрагин впервые был получен в 1911 году на бактериально-агрономической станции в Москве. В настоящее время его производство ограничено из-за сложной и трудоемкой технологии. Более перспективен сухой нитрагин. Это высушенная биомасса жизнеспособных бактерий в смеси с наполнителем (тиомочевина и меласса). При использовании нитрагина повышается урожайность бобовых растений – на 15-20%, в растениях увеличивается содержание белка – на 3-5%. В 1973-1977 г.г. была создана технология торфяного препарата клубеньковых бактерий – ризоторфина. При этом торф сушат, размалывают в порошок, нейтрализуют мелом, стерилизуют облучением гамма-лучами, увлажняют до 30-40% и расфасовывают в полиэтиленовые пакеты. Затем его облучают и заражают клубеньковыми бактериями с помощью шприца. Ризоторфином обрабатывают семена бобовых культур (го-роха, люпина, сои, люцерны, клевера и др. при посеве). Флавобактерин и ризоэнтерин усиливают поглотительную способность корней, что улучшает минеральный и водный обмен растений, стимулирует рост растений, являются антагонистами микроорганизмов-фитопатогенов. Повышают в продукции содержание сырого белка – на 1,5-2%, аскорбиновой кислоты – на 15-20%. Азотобактерин – бактериальное удобрение, содержащее свободно-живущий почвенный микроорганизм азотобактер – *Azotobacter chroococcum*. Азотобактер способен усваивать до 10-15 кг атмосферного азота в год на 1 га пахотного слоя земли. Большое количество белкового азота появляется в почве при отмирании бактерий. Эти бактерии выделяют биологически активные вещества (никотино-

вую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и др.), которые стимулируют рост растений; фунгицидные вещества, которые угнетают развитие некоторых нежелательных микроскопических грибов в ризосфере растения. Азотобактер способствует поступлению в растения соединений фосфора; стимулирует развитие почвенной микрофлоры, которая необходима для корневого питания; он использует корневые выделения, продукты распада растительных остатков и соединений образующихся в результате минерализации перегноя в качестве дополнительного источника углерода и энергии. Выпускается несколько видов азотобактерина: сухой, почвенный и торфяной. Сухой азотобактерин – это активная культура высушенных клеток азотобактера с наполнителем. В 1 г препарата содержится не менее 0,5 млрд. жизнеспособных клеток. Почвенный и торфяной азотобактерин представляют собой активную культуру азо-тобактера, размноженную на твердой питательной среде. В 1 г содержится не менее 50 млн. жизнеспособных клеток. Азотобактерин применяют для обработки семян, рассады, компостов. При этом урожайность увеличивается на 10-15%. Ризобактерин – создан на основе штамма *Klebsiella planticola S*. Он обладает высокой азотфиксацией активностью, продуцирует β-индолилуксусную кислоту и подавляет развитие корневых фитопатогенов. Ризобактерин повышает урожайность зерновых культур в среднем на 23%. Экстрасол – содержит индивидуальные штаммы или несколько видов ризосферных азотфиксирующих бактерий и их метаболиты, которые предназначены для данного вида или сорта растений, что определяется экспериментальным путем. Представляет собой сухую или увлажненную массу или бактериальную суспензию. В 1 г содержится не менее 100 млн. бактериальных клеток. Экстрасол улучшает поступление элементов питания в растения, увеличивает энергию прорастания семян, ускоряет развитие растений, снижает поражаемость растений фитопатогенными микроорганизмами. Несимбиотическую азотфиксацию можно усилить внесением в почву ассоциативных азотфиксирующих бактерий и макоризных грибов; цианобактерий и водного папо-ротника. Фосфоробактерин – порошок светло-серого или желтоватого цвета, содержит споры капустной палочки *Bacillus megaterium var. phosphaticum*. Эти бактерии превращают сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды и т.д.) и трудноусвояемые минеральные фосфаты в доступную для растений форму; вырабатывают биологически активные вещества (тиамин, пиридоксин, биотин, пантотеновую и никотиновую кислоты и др.), стимулирующие рост растения. Фосфоробактерин эффективен на богатых органикой почвах и благоприятно действует на корневую систему, его рекомендуют для улучшения роста кустарников и древесных растений. Биологически активный грунт АМБ (автохронная микрофлора «Б») используется при создании грунта в теплицах и парниках для выращивания овощных культур и расса-

ды, а также для активации биохимических процессов северных почв (автохронная микрофлора «Б»). В АМБ входят бактерии разлагающие белки и белковоподобные соединения, фосфорсодержащие органические соединения, целлюлозолитические, азотфикссирующие, нитрифицирующие бактерии и др. Технология удобрения АМБ сложная и громоздкая. При этом в кислый торф вносят известковый материал, минеральные добавки и маточную культуру АМБ из расчета 1-2 кг/т, затем идет созревание грунта на местах его использования. Расход АМБ – до 500 кг/т. Грибы-микоризообразователи улучшают водообеспечение и минеральное питание растений, продуцируют биологически активные вещества (витамины, фитогормоны, антибиотики), противостоят фитопатогенным микроорганизмам. Так, полевые культуры образуют нормальную микоризу самостоятельно. Микоризация используется при инокуляции семян и саженцев древесных пород. Грибы-микоризообразователи трудно культивировать искусственно, поэтому для микоризации чаще применяют лесную почву, которая содержит споры и мицелий таких грибов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа).

Тема: «Знакомство с правилами работы в биотехнологической лаборатории. Подготовка питательных сред. Изучение численности, биомассы и расчет количества почвенных организмов».

2.1.1 Цель работы: ознакомиться с назначением и функционированием биотехнологической лаборатории, аппаратами и приборами, правилами работы в ней. Приобрести навыки приготовления питательных сред различного назначения.

2.1.2 Задачи работы:

1. Подготовить лабораторию к работе с почвенными организмами и изучению закономерностей повышения плодородия почв и эффективности земледелия.
2. Провести анализ о наличии почвенных организмов методом прямого счета и произвести расчет на 1 г почвы при различной влажности.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия. Лабораторная посуда и инструменты, нитратомер портативный, набор микроскопической техники, аналитические весы, муфельная печь, сушильный шкаф, термостат, почвенное сито, тигли низкие, бюксы

2.1.4 Описание (ход) работы: объяснение материала по составу, назначению, физическому состоянию питательных сред, приготовление сред и стерилизация. Приготовление образцов для микроскопирования. Микроскопирование препаратов с использованием люминесцентного микроскопа. Провести расчет численности микроорганизмов на 1 г почвы.

2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа).

Тема: «Получение накопительных культур»

2.2.1 Цель работы: обеспечить преимущественное развитие представляющих интерес почвенных микроорганизмов.

2.2.2 Задачи работы:

1. Подбор специфической питательной среды и условий культивирования.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия. Лабораторная посуда и инструменты, нитратомер портативный, набор микроскопической техники, аналитические весы, муфельная печь, сушильный шкаф, термостат, почвенное сито, тигли низкие, бюксы

2.2.4 Описание (ход) работы: взятие почвенного образца, посев на питательные среды, анализ результатов.

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа).

Тема: «Выделение чистых культур почвенных организмов из почв разного состава»

2.3.1 Цель работы: выделение классическим методом чистой культуры бактерий из накопительной микрофлоры почвы.

2.3.2 Задачи работы:

1. Освоить методику выделения чистой культуры и провести идентификацию.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия. Лабораторная посуда и инструменты, нитратомер портативный, набор микроскопической техники, аналитические весы, муфельная печь, сушильный шкаф, термостат, почвенное сито, тигли низкие, бюксы

2.3.4 Описание (ход) работы: сделать посев в различных разведениях, изучить выросшие колонии, проверить чистоту культуры, сделать пересев чистой культуры в пробирку, на основании изучения свойств отнести к тому или иному роду, виду.

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа).

Тема: «Изучение способности почвенных организмов к биосинтезу ферментов»

2.4.1 Цель работы: изучить способность почвенных микроорганизмов утилизировать органические субстраты благодаря наличию ферментных систем

2.4.2 Задачи работы:

1. Определить общую биологическую активность, по выделению углекислого газа, аммонифицирующую, целлюлазную, фосфатазную, нитрифицирующую, денитрифицирующую и азотфиксющую почвы.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия. Лабораторная посуда и инструменты, нитратомер портативный, набор микроскопической техники, аналитические весы, муфельная печь, сушильный шкаф, термостат, почвенное сито, тигли низкие, бюксы

2.4.4 Описание (ход) работы:

Произвести посевы почвенных микроорганизмов на азот- и углеродсодержащие субстраты, поместить в термостат и проанализировать полученные результаты.

2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа).

Тема: «Изучение антагонистических свойств почвенных организмов. Биосинтез антибиотиков и стимуляторов роста растений».

2.5.1 Цель работы: определение антибиотической активности почвенных актиномицетов, подбор условий для биосинтеза биологически активных веществ.

2.5.2 Задачи работы:

1. Освоить способы выявления антибиотических свойств у микроорганизмов, определить чувствительность к антибиотическим веществам.

2. Изучить основные технологические этапы получения биологически активных веществ.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Набор демонстрационного оборудования (мультимедиа проектор, экран, ноутбук, средства звуковоспроизведения) и учебно-наглядные пособия. Лабораторная посуда и инструменты, нитратомер портативный, набор микроскопической техники, аналитические весы, муфельная печь, сушильный шкаф, термостат, почвенное сито, тигли низкие, бюксы

2.5.4 Описание (ход) работы: подготовить в стерильной воде суспензии тест-организмов, внести в пробирки с расплавленным агар-агаром, перенести в чашки Петри.

Разложить агаровые блочки с продуцентами антибиотических веществ на Чашки Петри с агар-агаром, поместить в термостат и через сутки отметить наличие зон подавления вокруг блочков. Измерить диаметр и оформить отчет по результатам работы.

**3. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ**
Не предусмотрено РУП.

**4. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ**
Не предусмотрено РУП.