

**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

<b>1. Конспект лекций .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Лекция № 1 Почвенная биотехнология: краткая история развития. Физико-химические характеристики почвы. Фиксация молекулярного азота: значение, микроорганизмы, процесс фиксации молекулярного азота .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Лекция № 2 Микроорганизмы как естественные антагонисты фитопатогенных грибов и бактерий и их метаболиты. Биоудобрения и биоинтенсивное земледелие .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Методические указания по проведению лабораторных работ.....</b>	<b>13</b>
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
<b>3. Методические указания по проведению практических занятий (не предусмотрено РУП).....</b>	<b>16</b>
<b>4. Методические указания по проведению семинарских занятий (не предусмотрено РУП).....</b>	<b>16</b>

## **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 повышения 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; ор-

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 растворимы 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 восстанавливающими 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, микобактерии, 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, pH, экологического состояния, применения минеральных удобрений, наличия антибиотиков, фитонцидов, бактериофагов, типа растительности. Большинство бактерий почвы развиваются при нейтральном pH, 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-

ценные 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 (бактероидов), в которых и происходит активная фиксация  $N_2$ - бактериоды можно рассматривать как дифференцированные формы, приспособленные для наилучшего осуществления определенной функции. В первую очередь это связано с контролем поступления в бактериоды 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 бактериоды. Леггемоглобин, обладающий как и гемоглобин, высоким сродством к  $O_2$ , обеспечивает перенос кислорода к бактериодам в количестве, необходимом для обеспечения их энергией, и в то время защищает бактериоды 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 + *био* — 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 микроба губительно действуют на таковые другого. Гнилостные микробы не могут жить в одной среде с молочно-кислыми, так как образуемая молочная кислота понижает pH 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, посвященных 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 четко продемонстрировали участие хитиназ в микелизации. 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 Bоег и соавт. (1998) предположили, что такой широкий спектр различий может быть объяснен участием в миколлизе 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 миколлиза, 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 миколитическая 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 микробных 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 биосферы, созданных природой; биологизация земледелия; 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 азотфиксирующих бактерий (нитрагин, ризоторфин);
2. Препараты на основе несимбиотических азотфиксирующих бактерий (флавобактерин, ризоэнтерин, агрофил, ризоагрин, азотобактерин, ризобактерин, экстрасол и др.);
3. Фосфробактерин;
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 (гороха, люпина, сои, люцерны, клевера и др. при посеве). Флавобактерин и ризоэнтерин усиливают поглощательную 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 азотобактера, 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 азотфиксирующей активностью, продуцирует  $\beta$ -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 микоризных грибов; цианобактерий и водного папоротника. Фосфобактерин – 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. Фосфобактерин 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, азотфиксирующие, 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. Произвести 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 азотфиксирующую 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.**