

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.Б.06 Сельскохозяйственная микробиология**

**Направление подготовки 06.03.01 Биология**

**Профиль образовательной программы Микробиология**

**Форма обучения очная**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1. Конспект лекций</b>	4
<b>1.1 Лекция № 1</b> Введение в сельскохозяйственную микробиологию. Почвообразовательный процесс и формирование микробных ценозов почвы .....	4
<b>1.2 Лекция № 2</b> Экологические особенности развития микробных сообществ почвы. Влияние антропогенных факторов на микробное сообщество почвы.....	10
<b>1.3 Лекция № 3</b> Системы использования почвы и микробиологические основы ее плодородия. Регулирование микробиологических превращений в почве основных элементов питания растений. Трансформация азота в почве.....	21
<b>1.4 Лекция № 4</b> Регулирование микробиологических превращений в почве основных элементов питания растений. Трансформация в почве соединений фосфора и калия. Баланс основных элементов питания растений в пахотных почвах.....	27
<b>1.5 Лекция № 5</b> Взаимоотношения микроорганизмов и растений. Микроорганизмы ризосфера и их влияние на растение. Симбиоз микроорганизмов с растениями. Эпифитные микроорганизмы растений и хранение урожая. Развитие на растениях токсигенных грибов.....	31
<b>1.6 Лекция № 6</b> Микробные землеудобрительные препараты и их эффективность. Использование в сельском хозяйстве микробов-антагонистов и микробных метаболитов.....	37
<b>1.7 Лекция № 7</b> Препараты микробного происхождения, используемые в сельском хозяйстве.....	50
<b>1.8 Лекция № 8</b> Использование продуктов микробного синтеза для кормления – животных. Синтез кормового белка и аминокислот. Синтез микроорганизмами витаминов и ферментов.....	54
<b>1.9 Лекция № 9</b> Превращение микроорганизмами растительного сырья. Биоконверсия. Микробиологическая трансформация отходов АПК.....	58
<b>1.10 Лекция № 10</b> Микробиология твердых отходов. Анаэробная и аэробная очистка сточных вод. Микроорганизмы – биологические индикаторы.....	68
<b>2. Методические указания по выполнению лабораторных работ</b>	<b>78</b>
<b>2.1 Лабораторная работа № ЛР-1</b> Введение в сельскохозяйственную микробиологию. Приборы и оборудование для микробиологических исследований почвы.....	78
<b>2.2 Лабораторная работа № ЛР-2</b> Методы выделения и культивирования почвенных микроорганизмов. Количественный анализ почвенных микроорганизмов.....	81
<b>2.3 Лабораторная работа № ЛР-3</b> Оценка бактериального разнообразия почв и идентификация почвенных бактерий. ....	84
<b>2.4 Лабораторная работа № ЛР-4</b> Методы определения структуры комплексов почвенных актиномицетов и грибов.....	86
<b>2.5 Лабораторная работа № ЛР-5</b> Роль микроорганизмов в биологическом круговороте веществ. Преобразование органических безазотистых соединений....	88
<b>2.6 Лабораторная работа № ЛР-6</b> Симбиотическая и несимбиотическая азотфиксация в почве.....	91
<b>2.7 Лабораторная работа № ЛР-7</b> Нитрификационная способность почвы.....	92
<b>2.8 Лабораторная работа № ЛР-8</b> Активность денитрификации. Фосфатомобилизующие микроорганизмы в почве.....	94
<b>2.9 Лабораторная работа № ЛР-9</b> Микробиологическое превращение соединений серы.....	96
<b>2.10 Лабораторная работа № ЛР-10</b> Дыхание почвы. Продуцирование почвой диоксида углерода (дыхание почвы) как показатель ее биологической активности...	97
<b>2.11 Лабораторная работа № ЛР-11</b> Методы изучения ассоциаций	99

микроорганизмов. Выявление ризосферных микроорганизмов.....	
<b>2.12 Лабораторная работа № ЛР-12</b> Методы исследования метаболитов почвенных микроорганизмов. Методы изучения ассоциаций микроорганизмов.	101
Выявление эпифитных микроорганизмов.....	
<b>2.13 Лабораторная работа № ЛР-13</b> Микробиология кормов. Микробиологический анализ сilage.....	104
<b>2.14 Лабораторная работа № ЛР-14</b> Изучение культур, используемых при получении биопрепаратов.....	107
<b>2.15 Лабораторная работа № ЛР-15</b> Использование антибиотиков в кормлении животных.....	111
<b>2.16 Лабораторная работа № ЛР-16-17</b> Микробиологическая трансформация отходов в АПК.....	112
<b>2.17 Лабораторная работа № ЛР-18</b> Микробиология твердых отходов.....	118
<b>2.18 Лабораторная работа № ЛР-19</b> Анаэробная и аэробная очистка сточных вод..	119
<b>2.19 Лабораторная работа № ЛР-20</b> Итоговое занятие за 4 модуль.....	121

# **КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ**

## **1.1 Лекция №1 (2 часа).**

**Тема: «Введение в сельскохозяйственную микробиологию.**  
**Почвообразовательный процесс и формирование микробных ценозов почвы»**

### **1.1.1 Вопросы лекции:**

1. Развитие взглядов на роль микроорганизмов в образовании почвы.
2. Процесс образования почвы и деятельность микроорганизмов.
3. Факторы среды, определяющие развитие микробного ценоза почвы.

### **1.1.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Развитие взглядов на роль микроорганизмов в образовании почвы**

С давних времен происхождение почвы связывали с обогащением поверхностного слоя Земли растительными остатками. Подобный взгляд, например, развивал Б. Палисси (1499-1589).

Наиболее глубокие положения о почвообразовательном процессе были сформулированы великим русским ученым М. В. Ломоносовым. Академик И. В. Вернадский считал Ломоносова не только первым русским почвоведом, но и первым почвоведом вообще.

Основоположником современного научного почвоведения является В. В. Докучаев (1846-1903). По его представлению, почва - особое самобытное тело природы. В различных условиях образуются разные почвы, и они изменяются во времени. Докучаевым был сформулирован закон зональности, который может быть отнесен не только к почвам, но и ко всему живому миру Земли. По определению Докучаева, почвой следует называть «дневные», или поверхностные, горизонты горных пород, естественно измененные влиянием ряда факторов. Тип почвы слагается в зависимости от: а) материнской породы, б) климата, в) растительности, г) рельефа страны, д) возраста почвообразовательного процесса.

Большое внимание Докучаев уделял условиям, определяющим плодородие почвы. Разрабатывая научные основы почвоведения, Докучаев отмечал огромную роль живых организмов, и в частности микроорганизмов, в формировании почвы.

Период творчества Докучаева совпал со временем великих открытий Л. Пастера, показавших значение микроорганизмов в превращении разнообразных веществ. В конце прошлого и в начале текущего века был сделан ряд важных открытий в области микробиологии, имевших принципиальное значение для почвоведения и земледелия. Установлено, в частности, что в почве содержится огромное количество разных микроорганизмов. Это давало повод думать о существенной роли микробиологического фактора в формировании и жизни почвы.

Современником Докучаева был выдающийся ученый-почвовед П. А. Костычев. В монографии «Почвы черноземной области России, их происхождение, состав и свойства» (1886) он писал, что геология имеет второстепенное значение в вопросе о черноземе, потому что накопление органического вещества происходит в верхних слоях земли, геологически разнообразных, и чернозем является вопросом географии высших растений и вопросом физиологии низших растений, разлагающих органическое вещество.

Большой вклад в представления о роли биологического фактора в преобразовании Земли и в процессе почвообразования внес ученик Докучаева академик В. И. Вернадский.

Он считал, что главным фактором в миграции химических элементов в верхней части земной коры являются организмы. Их деятельность затрагивает не только органические, но и минеральные вещества почвенного и подпочвенного слоев.

Позднее академик А. П. Виноградов развил учение о биогеохимических провинциях, устанавливающее закономерности распределения микроэлементов на поверхности Земли.

Большое внимание биологическим процессам в почвообразовании уделял академик Б. Б. Полынов, который, в частности, считал, что глинистые минералы в почвах имеют биологическое происхождение.

Многие моменты, связанные с почвообразующей деятельностью животных, нашли отражение в трудах Н. А. Димо.

Биологический аспект почвообразовательного процесса был разработан академиком В. Р. Вильямсом. Он считал, что отдельным почвенным типам свойственны специфические группировки микроорганизмов.

Интерес к микроорганизмам как факторам почвообразования и плодородия к концу прошлого века так возрос, что на VIII съезде естествоиспытателей и врачей в С.-Петербурге, состоявшемся в 1890 г., были заслушаны доклады, имевшие микробиологический аспект. И. В. Ковалевский в сообщении «Запросы современного сельского хозяйства к естествознанию» основное внимание уделил значению микроорганизмов в создании плодородия почвы. Профессор Петровской сельскохозяйственной академии Г. Г. Густавсон в докладе «О микробиологических основах агрономии» убедительно показал, что почва представляет собой живую систему, огромную роль в которой играют низшие существа.

Через год после этого съезда русский ученый Д. И. Ивановский опубликовал работу «Из деятельности микроорганизмов почвы». В 1894 г. состоялся IX съезд русских естествоиспытателей и врачей. На нем присутствовал Л. Н. Толстой и выступал К. А. Тимирязев. Известный микробиолог С. Н. Виноградский сделал доклад «О круговороте азота в природе», в котором осветил роль микроорганизмов в цикле процессов, имеющих огромное значение для формирования почвенного плодородия.

К концу XIX в. сложилось мнение о возможности широкого использования в сельском хозяйстве «биологического» азота. Об этом, в частности, свидетельствует выступление Б. Л. Исаченко в 1889 г. на собрании сельских хозяев в С.-Петербурге, где он прочитал лекцию на тему «О бактериальном способе удобрения растений азотом».

Отмечая наиболее значимые успехи наших ученых в области общей и сельскохозяйственной микробиологии, целесообразно остановиться на работах основоположников этих наук С. Н. Виноградского (1856—1953) и В. Л. Омелянского (1867—1928).

Изучая железо- и серобактерий, С. Н. Виноградский обнаружил существование особой группы бактерий, у которой обычный дыхательный акт заменен окислением минеральных соединений. Ученый установил также, что подобные организмы вызывают процесс нитрификации. Виноградским впервые был обнаружен анаэробный микроб, фиксирующий атмосферный азот,— *Clostridium pasteurianum*.

Длительное время с С. Н. Виноградским работал его ученик В. Л. Омелянский. Он провел обширное исследование по методике изолирования чистых культур нитрифицирующих бактерий и установил их физиологические свойства. Им были

изучены анаэробные целлюлозные бактерии, вызывающие метановое и водородное брожение. Последние работы были связаны с улучшением технологии мочки льна.

Большое внимание Омелянский уделил микроорганизмам, связывающим молекулярный азот. Этому вопросу посвящена его монография «Связывание молекулярного азота почвенными микроорганизмами» (1923).

Ученые следующего поколения внесли большой вклад в разработку методических приемов, позволяющих расширить представление о составе почвенных микроорганизмов, их физиологических функциях, экологии и т. д. Из них нельзя не упомянуть Н. Г. Холодного, Б. В. Перфильева, В. Н. Шапошникова, Н. А. Красильникова, Н. Н. Худякова, М. В. Федорова.

Широкие исследования по изучению биодинамики почв в географическом аспекте были начаты в 20-х годах прошлого столетия академиком С. П. Костычевым в созданном им Институте микробиологии ВАСХНИЛ.

Работа в области почвенной микробиологии интенсивно велась и за рубежом.

Совокупность полученных научных данных дает основание заключить, что почва представляет собой живую систему. В совершающихся в ней процессах микроорганизмы играют важную роль, без учета которой невозможно решение ряда хозяйствственно важных вопросов.

## **2. Процесс образования почвы и деятельность микроорганизмов.**

Все почвы на Земле образовались из выходящих на дневную поверхность весьма разнообразных горных пород, которые обычно называют материнскими. В качестве почвообразующих выступают рыхлые осадочные породы.

Уже с начальных этапов превращения горных пород в почву роль микроорганизмов в процессах выветривания минералов вырисовывается весьма наглядно. Выдающиеся ученые В. И. Вернадский и Б. Б. Полынов рассматривали выветривание горных пород как результат деятельности растительных организмов. К настоящему времени эта точка зрения подтверждена большим экспериментальным материалом.

Разрушение минералов микроорганизмами связано с рядом причин. Минералы, содержащие элементы с переменной валентностью (Fe, S, Mn), под действием микробных ферментов способны окисляться и восстанавливаться в зависимости от условий среды. Так, исследованиями Н. Н. Ляликовой, Г. И. Каравайко и др. показано, что бактерии рода *Thiobacillus* вызывают окислительную деструкцию пирита, халькопирита и других сульфидных минералов. Некоторые микроорганизмы продуцируют сильные минеральные кислоты, разрушающие минералы. Многие бактерии, а также плесневые грибы выделяют органические кислоты, разлагающие минералы или дающие с их компонентами хелатные соединения.

Не исключена роль биогенных щелочей в разрушении минералов. Многие бактерии выделяют слизи, облегчающие контакт микроорганизмов с горной породой. Разрушение последней происходит как под влиянием продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, так и в результате образования комплексных соединений между веществом слизей и химическими элементами, входящими в состав кристаллических решеток минералов.

До 60% земных минералов составляют алюмосиликаты. Еще в начале текущего века немецким ученым Г. Кюнцем, а также польским исследователем К. Бассаликом была показана способность микроорганизмов разрушать алюмосиликаты в средах, содержащих органические вещества и минеральные соединения азота. Позднее эту способность

обнаружили у фотосинтезирующих диатомовых водорослей академик А. П. Виноградов и Е. А. Бойченко (1942).

Пионерами, поселяющимися на материнских породах, являются микроскопические водоросли (диатомовые). Водоросли играют существенную роль как автотрофные накопители органических веществ, без которых не может протекать энергичная деятельность сапрофитных микроорганизмов. Последние продуцируют разные соединения, вызывающие выветривание минералов. Развивающиеся в этом ценозе цианобактерии фиксируют азот и обогащают разрушающую горную породу соединениями этого элемента.

В обогащаемом слое горной породы начинает развиваться богатая бактериальная флора.

Существенна роль лишайников, которые аккумулируют ряд элементов. Поэтому в мелкоземе, как установил Н. А. Красильников и др., под лиофильной растительностью резко увеличивается количество органического вещества, фосфора, окиси железа, кальция и магния.

Заселение минералов микроорганизмами происходит избирательно.

Выветривание горных пород в природе должно рассматриваться как единство двух противоположных процессов - распада первичных минералов и возникновения вторичных минералов. Новые минералы могут возникать при взаимодействии микробных метаболитов друг с другом. Образование минералов гемата и лимонита в коре выветривания происходит в результате жизнедеятельности микроорганизмов, интенсивно аккумулирующих железо.

Наряду с трансформацией горной породы в формирующейся почве накапливается гумус. В образовании гумуса микроорганизмы принимают активное участие. Под термином «гумус» объединяется целая группа родственных высокомолекулярных соединений, он составляет 85-90% всего органического вещества почвы. Гумус образуется из растительного опада и отмершей корневой системы растений.

### **3. Факторы среды, определяющие развитие микробного ценоза почвы.**

На активность микроорганизмов и формирование их ценоза в почве влияет ряд факторов.

Роль температуры почвы в протекании микробиологических процессов. На температуру почвы огромное влияние оказывает географический фактор, наблюдаются суточные колебания температуры, которые сильнее всего сказываются на поверхностном слое почвы. Сезонные колебания температуры влияют на весь профиль почвы. В криофильных почвах на некоторой глубине имеется постоянный мерзлотный слой, подавляющий активность микроорганизмов.

В одной и той же зоне температурный режим почвы зависит также от ее способности поглощать тепловые лучи, теплоизлучения, характера растительности и т. д.

Основная масса почвенных микроорганизмов принадлежит к мезофилам. При температуре ниже 5°C в почве практически перестает накапливаться CO<sub>2</sub> - приостанавливается процесс распада органических соединений, резко тормозится процесс нитрификации.

Доказано, что оптимальная и максимальная температуры у большинства почвенных мезофильных микроорганизмов меняются в зависимости от климата. Бактерии в южных почвах, как правило, имеют повышенные температурные оптимум и максимум

Теплолюбивые микроорганизмы при оптимальной для них температуре более активны, чем психрофильные их формы. Термофилы обладают исключительно высокой биохимической активностью. В южных почвах микробиологические процессы протекают более энергично, но термофильных микроорганизмов очень мало, и существенной роли в почвенных процессах они не играют.

Возникает вопрос - как сказываются низкие температуры зимнего периода на почвенной микрофлоре. Казалось бы, что в это время происходит массовая гибель микроорганизмов, но исследования нередко указывают на увеличение количества бактерий, которое объясняется, видимо, десорбцией микроорганизмов из почвенных частиц, наступающей при коагуляции коллоидов под влиянием холода. Возможно, определенную роль играет и замедленное отмирание бактерий при низких температурах.

Огромное влияние на жизнедеятельность микроорганизмов оказывает влажность почвы. В основном из почвенного раствора растения и микроорганизмы усваивают питательные вещества.

По величине осмотического давления микроорганизмы почвы существенно различаются. Большинство из них способны развиваться в почве при наличии по крайней мере гигроскопической влаги. Южные культуры микробов адаптированы к более сухим условиям существования. Некоторые микроорганизмы (актиномицеты и ряд грибов) могут развиваться при ничтожной влажности почвы.

При сильном увлажнении воздух из почвы вытесняется, что подавляет аэробные микробиологические процессы. Подобная обстановка, например, создается на залитых водой рисовых полях, где относительно аэробные условия имеются лишь в самом поверхностном слое почвы.

Не меньшее значение для микробиологических процессов почвы имеет воздушный режим. Воздух содержится в почвенных порах, которые составляют в отдельных случаях от 25 до 70% общего объема почвы. В воздухе слежавшейся почвы - около 2% кислорода, в хорошо взрыхленной - до 20%. В почвенном воздухе повышенено содержание углекислого газа. Газовый состав почвенного воздуха подвержен суточным и сезонным колебаниям.

Анаэробиоз легче создается в микропорах и капиллярных промежутках почвы.

Аэробные микроорганизмы хорошо переносят повышенное содержание в воздухе СО<sub>2</sub>, нередко отмечается даже улучшение их роста. Тем не менее при концентрации СО<sub>2</sub> 1-1,5% и выше в деятельности некоторых групп микроорганизмов начинает проявляться депрессия.

Аэробные цианобактерии лучше развиваются при повышенном содержании СО<sub>2</sub> в почве. Оптимальная для них концентрация СО<sub>2</sub> равна 1%, а максимальная - для ряда представителей достигает 12% и выше.

К аэробным микроорганизмам почвы относятся плесени, большинство актиномицетов и значительная часть бактерий.

Численность строгих и факультативных анаэробных микроорганизмов обычно невелика: не более 10%.

В результате деятельности разных групп микроорганизмов газовый состав почвы значительно отличается от атмосферного. Так, в почве имеются газы, практически отсутствующие в атмосфере (окислы азота, сероводород, метан, окись углерода, молекулярный водород и др.).

На характер микрофлоры большое влияние оказывает активная кислотность почвы: сильнокислые — pH 3-4, кислые — 4-5, слабокислые — 5-6, нейтральные — 6-7, щелочные — 7-8, сильнощелочные — 8-9 и выше.

В подзолах значение pH находится в пределах 3,5-5, в черноземах эта величина достигает 6,5-7,2, а в сероземах — 7,5.

Кроме того, одна и та же величина pH может иметь неодинаковое значение в жизнедеятельности микроорганизмов в разных почвах. Так, в подзолах некоторое снижение pH вызывает освобождение алюминия, токсически действующего на ряд микроорганизмов. Этого не наблюдается в богатых кальцием черноземах. Поэтому подкисление подзолов вызывает более сильное подавление микробиологических процессов, чем такое же подкисление черноземов. К алюминию особо чувствительны актиномицеты, азотобактер и многие водоросли. Повышенное количество этого элемента легко переносят грибы и ряд бактерий. Отчасти вследствие этого северные почвы бедны актиномицетами и азотобактером. Несмотря на разную кислото- и щелочеустойчивость, все группы микроорганизмов наиболее активно проявляют свою жизнедеятельность в нейтральной среде. На деятельность почвенных микроорганизмов большое влияние оказывает механический состав почвы.

Основная масса почвенных микроорганизмов (до 90—99%) связана с твердой фазой почвы, и только незначительная доля их находится в почвенном растворе. Это объясняется особенностью твердых частиц почвы удерживать клетки микроорганизмов.

В почвенном растворе имеются питательные для микроорганизмов вещества, что способствует размножению микробов не только на поверхности твердых частиц, но и в водной фазе почвы. На распределение микроорганизмов в твердой и водной фазах почвы значительно влияют растительные остатки, обогащающие почвенный раствор органическими соединениями. На растительной массе происходит также обильное размножение микробов.

Для каждого типа почвы характерен свой профиль. У одних почв гумусовый слой невелик, у других он очень мощный. От этого зависит глубина распространения микроорганизмов в почве. Однако по мере углубления в почву количество гумуса уменьшается более постепенно, чем численность микроорганизмов.

На характер сообщества микроорганизмов почвы большое влияние оказывают биотические факторы и, прежде всего взаимоотношения микробов, которые бывают весьма различными. Можно наблюдать так называемые метабиотические отношения, при которых продукты жизнедеятельности одних микроорганизмов служат источником существования для других. Так, нитрификаторы развиваются лишь тогда, когда в почве имеется достаточно аммиака, вырабатываемого гнилостными микробами.

Существуют синтрофные взаимоотношения микроорганизмов. Под этим термином понимают явление, когда два вида микроорганизмов или более растут на среде, недоступной каждому виду в отдельности.

У представителей микромира отмечем и прямой паразитизм. Имеются хищные грибы, образующие кольца или липкие головки, с помощью которых они улавливают нематод, служащих им источником питания.

Имеется большая группа грибов, паразитирующих на других грибах. Эти паразиты получили название микофильных грибов. Мелкая бактерия *Bdellovibrio* внедряется в клетки более крупных бактерий и питается их содержимым. Паразитами

многих микроорганизмов являются фаги. Protozoa поедают большое количество бактерий и грибов. Пищей для мелких клещей и других животных служит не только мертвый органический субстрат, но и микроорганизмы.

Таким образом, развитие микроорганизмов в почве определяется целым комплексом абиотических и биотических факторов.

## **1.2 Лекция №2 (2 часа)**

**Тема: «Экологические особенности развития микробных сообществ почвы. Влияние антропогенных факторов на микробное сообщество почвы»**

### **1.2.1 Вопросы лекции:**

1. Особенности состава микробных ценозов почв различных типов
2. Обработка почвы. Мелиорация.
3. Органические удобрения.
4. Минеральные удобрения.
5. Пестициды.

### **1.2.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Особенности состава микробных ценозов почв различных типов**

Долгое время почвенные микроорганизмы рассматривали как космополитов. Предполагалось, что почвы различаются лишь по численности их микронаселения.

Численный состав микроскопических существ различных почв отличается большой динамичностью. Это следствие динамики температуры и влажности почвы, состояния растительного покрова и т. д. Почти во всех почвах наблюдается большая или меньшая активизация деятельности микроорганизмов весной. Очевидно, это связано с обогащением почв отмершей за осенне-зимний период растительностью и достаточной их увлажненностью. Кроме сезонных изменений, в численности почвенной микрофлоры отмечаются кратковременные флуктуации. Отмеченное явление зависит от неравномерного распределения микроорганизмов в почве. В связи с этим каждая взятая проба отличается по составу микробов от другой, что создает впечатление существенной динамики в их численности.

Динамика количества микроорганизмов не снимает вопроса о разной плотности заселения ими почв различных типов.

По мере перехода от более холодного северного климата к южному микронаселение почв все более возрастает, и потому в южных почвах микробиологические процессы протекают более энергично.

Наиболее изучена сапропитная, или зимогенная, группировка микрофлоры различных почв, то есть микрофлора, разлагающая в основном органические соединения.

В почвах северной зоны спорообразующих бактерий и актиномицетов значительно меньше, чем в южных.

Бациллы и актиномицеты размножаются на более поздних этапах разложения растительных остатков, кроме того, северные почвы имеют кислую реакцию, которую плохо переносят актиномицеты.

В южных почвах относительное число грибов уменьшается при одновременном увеличении их видового состава. Окультуренные почвы всех зон обычно богаче микроорганизмами, чем целинные. Вертикальная поясность влияет на состав почвенной микрофлоры так же, как и широтная зональность.

Отдельные почвы существенно различаются по глубине их микробиологического профиля. С углублением в почву количество микроорганизмов постепенно уменьшается и меняется их состав. Снижение их численности с глубиной до известной степени связано с уменьшением количества гумуса в нижележащих слоях почвы, но прямая корреляция здесь отсутствует. В составе зимогенной микрофлоры богато представлены *бактерии*, особенно неспорообразующие формы. Количество этих микроорганизмов неодинаково во всех почвах. Так, гнилостные бактерии *Pseudomonas fluorescens*, являющиеся пионерами освоения органических растительных остатков, богато представлены в почвах севера. В почвах юга они обнаруживаются в значительном числе лишь в течение краткого времени после внесения растительных остатков.

Представители рода *Arthrobacter* в большем числе встречаются в почвах южной зоны. Они свойственны более поздним стадиям распада органического вещества и предпочитают нейтральную среду. В почвах севера очень часто находится значительное количество коринебактерий.

Из неспорообразующих азотфиксирующих бактерий *Beijerinckia* распространены только в кислых субтропических почвах. Представители рода *Enterobacter* в большом количестве находятся в лесных почвах средней полосы, а рода *Spirillum* — в южной зоне.

Каждому типу почв свойствен характерный набор преобладающих видов бацилл. В почвах с более энергичными мобилизационными процессами преобладают бациллы, использующие органический и минеральный азот (*Vac. megaterium*, *Vac. mesentericus*, *Vac. subtilis*). В почвах со слабо протекающими процессами минерализации органических веществ доминируют спорообразующие бактерии, для которых необходим органический азот (*Vac. cereus*, *Vac. mycoides* и др.)

При окультуривании почвы состав почвенной микрофлоры существенно меняется, появляются виды спорообразующих бактерий, свойственные более южной зоне.

**Грибы.** Северные почвы (кислая реакция) наиболее богаты грибами. В разлагающейся растительной массе и в верхних слоях почвы их биомасса больше бактериальной.

В почвах южной зоны родовой и видовой состав микроскопических грибов более разнообразен. В южных почвах доминируют представители рода *Aspergillus*, а в северных - *Penicillium*. Северные почвы беднее, чем южные, грибами рода *Fusarium*. Некоторые виды (*Fusarium sambicum*) свойственны только щелочным почвам. Мукоровыми грибами богаты почвы северных районов, однако некоторые роды (*Choanephora*, *Rhizopus*) приурочены к южным почвам.

В настоящее время установлены индикаторные микроскопические грибы для определенных типов почв.

**Дрожжевая микрофлора** почв и растительности разных зон изучена Н. П. Бабьевой. В тундре при большой пестроте почвенного покрова основная часть дрожжей сосредоточена на мхах и торфе. Домinantные виды дрожжей в тундровых почвах имеют базидиомицетовую природу (*Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*).

В лесных биогеоценозах много дрожжей имеется в подстилке. Они составляют группу, относящуюся к базидиальным грибам (*Candida*, *Trichosporon*). В минеральных горизонтах почвы дрожжей значительно меньше. Здесь доминируют типичные педобионты - из аскоспоровых грибов *Lipomyces starkeyi* и из базидиомицетов - *Candida* и *Cryptococcus*.

В степном биогеоценозе травяной опад весьма богат дрожжами. Здесь встречается до 14 видов, относящихся к родам *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Rhodosporidium* и др.

В биогеоценозах полупустынь и пустынь на растительности доминируют дрожжи из родов *Sporodiobolus*, *Tilletiopsis* и *Sporobolomyces*, образующих баллистоспоры, рассеивающиеся токами воздуха и имеющие в жизненном цикле стадии, устойчивые к засухе, - хламидоспоры. Их численность невелика. Дрожжи обитают на некоторой глубине - ниже 20 см. Род *Lipomyces* в почве пустынь отсутствует. Доминируют криптококки.

**Актиномицеты.** Группа актиномицетов и близких к ним организмов чрезвычайно обширна. Слабый рост актиномицетов в почвах северной зоны может быть объяснен замедленным темпом разложения органического вещества и их слабой толерантностью к почвенной кислотности. Почвы южной зоны богаче актиномицетами и имеют более разнообразный их видовой состав.

**Целлюлозоразлагающие микроорганизмы.** Большая часть растительных остатков состоит из целлюлозы. В северных почвах этот процесс связан с деятельностью некоторых медленно растущих грибов (*Dematioides* и *Penicillium*). В зоне тайги в этот ценоз начинают включаться микробактерии и род *Cellvibrio*. В южных почвах в значительной степени грибы вытесняются как указанными, бактериями, так и представителями родов *Rhizophlyctis* и *Cytophaga*. В заметных количествах здесь появляются грибы рода *Chaetomium*. Этот ценоз в отличие от северного разрушает клетчатку быстро.

**Автохтонная микрофлора почвы.** Гумусовые соединения разлагаются автохтонными микроорганизмами. Гумус представляет собой комплекс разных по сложности соединений, весьма стойких к воздействию микроорганизмов.

В последнее время выявлен ряд микроорганизмов, способных минерализовать гумусовые соединения почвы (род *Nocardia*).

К процессу разложения гумуса причастны и другие бактерии (*Pseudomonas*, *Bacterium*, *Mycobacterium*, *Bactoderma*, *Clostridium*), а также грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*). Доказано, что чистые культуры микроорганизмов менее активно разлагают гумус, чем смешанные. Микроорганизмы, трансформирующие гумусовые соединения, играют существенную роль в формировании почвенного профиля. Так, накопление Fe и Al в определенных горизонтах подзолистых почв связано с разрушением микроорганизмами перегнойных комплексов. Освободившиеся гидроксиды Fe и Al могут вступать в реакции с фульвоокислотами и способствовать их выпадению из раствора и закреплению в аллювиальном горизонте почвы.

**Олиготрофные микроорганизмы** составляют большую группу почвенного микронаселения. Они завершают минерализацию органических соединений.

Д. И. Никитин установил, что относительная численность олиготрофов в северных почвах ниже, чем в южных.

Значительная часть олиготрофных бактерий отличается необычной морфологией и циклом развития. К этой группе относятся почкующиеся бактерии - *Hypnophyllum*, *Pedomicrobium*, *Hypomonas*, *Blastobacter*; простокобактерии: род *Prosthecomicrobium*, *Ancalomicrombium*, *Stella*; В группу стебельковых бактерий входят часто встречающиеся в

почве *Caulobacter* и *Asticcacaulis*. *Тороидальные, или кольчатые, бактерии* к группе относятся: *Microcyclus*, *Renobacter*, *Spirosoma*.

**Хемоавтотрофные микроорганизмы** почвы весьма разнообразны. Они вызывают окисление неорганических соединений, образующихся при микробной трансформации органических веществ. Наиболее изучены из этих микроорганизмов нитрифицирующие бактерии, деятельность которых характеризует энергию мобилизационных процессов в почве. По мере движения от севера к югу активность нитрификационного процесса усиливается. В условиях вертикальной зональности наблюдается аналогичное явление - по мере подъема в горы, энергия нитрификационного процесса снижается.

Помимо хемоавтотрофных микроорганизмов, в почвах находятся фотоавтотрофные микроорганизмы. В почвах арктических пустынь и тундры развиваются зеленые и желто-зеленые водоросли, много азотфиксацирующих цианобактерий.

В подзолистых почвах преобладают одноклеточные зеленые (*Chlamydomonas*, *Coccotrichia*, *Chlorococcum*, *Chlorella*) и некоторые нитчатые зеленые. Им сопутствуют нитчатые желто-зеленые и некоторые диатомовые водоросли.

При дерновом процессе отмечается обильное разрастание водорослей, среди которых появляется значительное число видов цианобактерий, в том числе азотфиксаторов (*Nostoc*, *Calothrix*, *Anabaena*, *Tolypothrix* и др.). Богато представлены зеленые и желто-зеленые водоросли.

В луговых и ковыльных степях черноземной зоны под густым травостоем водоросли развиваются менее интенсивно. Альгофлора представлена зелеными водорослями. Здесь интенсивно размножаются и цианобактерии.

В южных сухих и полупустынных степях развитие водорослей усиливается. На поверхности каштановых почв образуются пленки водорослей, в которых ведущая роль принадлежит цианобактериям, в том числе и азотфиксаторам. При пустынном почвообразовании состав альгофлоры напоминает таковой в полупустынной зоне, но численность водорослей существенно снижается. Преобладают цианобактерии, распространены зеленые водоросли.

Описанная специфика живого микронаселения почвы подтверждает закон зональности В. В. Докучаева и делает возможной микробиологическую диагностику направленности почвообразовательного процесса, плодородия почвы и его изменения под влиянием деятельности человека.

Некоторые группировки микроорганизмов остаются довольно константными при антропогенном воздействии на почву. Они отражают тип почвообразовательного процесса и могут быть индикаторами, которые достаточно консервативны и хранят информацию о былых состояниях факторов почвообразования. К таким сравнительно стабильным показателям относится соотношение основных групп микроорганизмов.

При окультуривании в микробном ценозе отмечаются существенные изменения. Увеличивается численность микробного населения, и в ценозе появляются организмы,ственные более южной почвенной зоне. Об этом свидетельствует пример с целлюлозоразлагающими микроорганизмами, состав которых резко меняется при внесении удобрений.

Следовательно, микроорганизмы можно использовать для анализа типа и состояния почвы.

## 2. Обработка почвы. Мелиорация.

Среди антропогенных факторов наибольшее влияние на микробное сообщество почвы имеют разнообразные приемы обработки и мелиорации.

**Обработка почвы.** В настоящее время в земледелии используют различные приемы основной и поверхностной обработок почвы. Для выполнения основной обработки используют как общие приемы - вспашку, безотвальное рыхление, фрезерование и др., так специальные приемы - двухъярусную и трехъярусную вспашку, щелевание, кротование и др. К приемам поверхностной и мелкой обработки почвы относят лущение, культивацию, боронование, прикатывание и др.

Главный прием основной обработки почвы, влияющий на жизнедеятельность ее микрофлоры, - вспашка. Она должна создавать в почве благоприятные условия для протекания мобилизационных процессов. Однако в сельскохозяйственной науке и практике существуют разные подходы к решению вопроса об использовании различных приемов основной обработки почвы. Обоснование их связано с почвенными микробиологическими процессами.

Биологическая разнокачественность пахотного слоя выражается в постепенном снижении численности микроорганизмов по мере углубления в почву. По мере углубления в почву численность практически всех групп микроорганизмов снижается. При этом химический состав почв в пределах пахотного слоя тождествен.

В зоне достаточного увлажнения верхний горизонт пахотного слоя остается более богатым микроорганизмами в течение всего вегетационного периода. Черноземы находятся в зоне недостаточного увлажнения, поэтому количество микроорганизмов здесь заметно меньше.

Снижение микробиологической активности по мере углубления в почву подтверждается «дыханием почвы», т. е. выделение диоксида углерода, служащее показателем жизнедеятельности микроорганизмов. Самый активным по энергии дыхания - верхний слой почвы.

Разные слои парющей почвы, вспаханной с оборотом пласта не отличаются по плодородию. Верхний горизонт, перемещенный вниз, сохраняет высокое плодородие, а в нижнем при улучшении аэробиоза активизируются мобилизационные микробиологические процессы и плодородие существенно повышается.

Отдельные горизонты пахотного слоя сохраняют свои особенности в течение 1-1,5 месяцев после вспашки.

Положительное действие оборота пласта объясняется, вероятно тем, что подвижные органические вещества, аккумулированные в нижнем горизонте, попадая наверх, в условиях лучшего аэробиоза быстро подвергаются минерализации и повышают плодородие почвы.

**Мелиорация.** Огромное значение в повышении плодородия почв имеют мелиоративные мероприятия. К ним относят орошение почв в зонах недостаточного увлажнения, осушение избыточно увлажненных почв, внесение в кислые и щелочные почвы соединений, нормализующих реакцию среды, удаление из почвы избыточных солей и т. д.

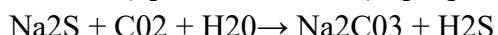
В зонах недостаточного увлажнения при дефиците влаги микробиологические процессы почвы приостанавливаются и большая часть микроорганизмов переносит засуху в анабиотическом состоянии. Увлажнение почвы активизирует микрофлору, что приводит к накоплению питательных веществ для растений и способствует их росту.

Осушение переувлажненных почв благоприятно сказывается на составе микрофлоры, в частности это относится к вводимым в культуру торфяникам. В мелиорированных торфяниках обычно накапливается избыток доступных растениям соединений азота. Одним из методов предупреждения избыточной минерализации органических соединений торфяником является насыпное пескование.

Для химической мелиорации кислых подзолистых и дерново-подзолистых почв широко применяют известкование. Известь способствует образованию клубеньков у бобовых растений.

В южной зоне нашей страны большие площади заняты солонинными почвами. Для их сельскохозяйственного освоения проводят химическую мелиорацию, чаще всего гипсование.

Бактерии, восстанавливающие сульфаты, образуют сульфиды, которые в рассматриваемых почвенных условиях (при наличии СО<sub>2</sub>) превращаются в соду:



При внесении в почву гипса образуются труднорастворимый карбонат кальция, выпадающий в осадок, и сульфат натрия, в растворе имеющий нейтральную реакцию и легко удаляемый промывкой.

### 3. Органические удобрения

Органические удобрения - навоз, городские отходы, компосты и др. способствуют интенсификации микробиологических процессов, поскольку они являются источником энергии и элементов питания микроорганизмов.

**Навоз.** Содержание органического вещества в навозе составляет 20-25%; количество питательных веществ для растений - 0,5% азота, 0,2% Р2О5, 0,6% К2О и около 75% воды. Органическая часть навоза в расчете на беззольную сухую массу содержит до 40% перегнойных соединений, около 10% целлюлозы и лигниноподобных веществ.

Четыре способа хранения навоза: под скотом; нерегулированное хранение на гноище; приготовление «холодного» навоза немедленным уплотнением в навозохранилище и изготовление «горячего» навоза при временной рыхлой укладке с последующим уплотнением.

В свежем навозе размножается огромная масса разнообразных микроорганизмов. Главную роль в созревании холодного навоза играют неспорообразующие бактерии. В свежем навозе первоначально более половины микроорганизмов составляют кокковидные бактерии, число которых постепенно уменьшается. Большинство из них являются аммонификаторами, начинаяющими гнилостный процесс.

В навозе довольно много бактерий рода *Pseudomonas*, представителей группы кишечной палочки и других неспорообразующих палочковидных аммонификаторов. Некоторые из них могут вызывать денитрификацию. В навозе присутствуют и гнилостные спорообразующие бактерии - *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и т. д., но при холодном способе приготовления эти виды размножаются слабо.

Многие аммонифицирующие бактерии навоза могут вызывать распад мочевины. Общее число подобных форм микроорганизмов достигает 200—300 млн на 1 г навоза. Грибы существенного значения в созревании холодного навоза не имеют.

Многочисленна в навозе группа аэробных микроорганизмов, разлагающих целлюлозу. Обнаружены также анаэробные разрушители целлюлозы (*Clostridium omelianskii*). В холодном навозе можно встретить термофильную целлюлозоразлагающую

бактерию *Clostridium thermocellum*. Но в целом группа термофильных и термотолерантных бактерий в холодном навозе немногочисленна и не превышает 1-1,5 млн на 1 г массы.

В навозе встречаются нитрификаторы, проявляющие активность только в самом поверхностном его слое. Помимо окисления аммиака, некоторые из этих микроорганизмов разлагают в навозе пуриновые основания.

Иначе развивается процесс при горячем способе созревания навоза. В первый период созревания в рыхло сложенной массе бурно развиваются разнообразные мезофильные микроорганизмы - аэробные неспороносные бактерии, грибы и частично актиномицеты. Через несколько дней навоз уплотняют.

В результате подъема температуры и удаления из навоза воздуха большая часть мезофильной микрофлоры отмирает. Некоторые актиномицеты и неспорообразующие бактерии переносят повышенную температуру в анабиотическом состоянии. Активно размножаются в разогревшемся навозе термофильные и термотолерантные актиномицеты и бактерии (*Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*). Целлюлозу в горячем компосте разлагает *Clostridium thermocellum*.

Значительная часть растительных остатков и других компонентов навоза во время его созревания подвергается гумификации.

Скорость минерализации навоза в почве определяется рядом факторов, но при других благоприятных условиях она зависит в основном от соотношения в навозе С:N.

**Солома.** Солому также используют как органическое удобрение. Внесение соломы обогащает почву гумусом. Кроме того, в ней содержится около 0,5% азота и другие необходимые растениям элементы. При разложении соломы выделяется много диоксида углерода, что также благотворно действует на посевы

В условиях северной зоны солому целесообразно запахивать в верхний слой почвы. В аэробных условиях все токсичные для растений вещества быстро разлагаются. При мелкой запашке через один-полтора месяца происходит разрушение вредных соединений и начинает освобождаться биологически закрепленный азот. На юге разрыв времени между заделкой соломы и посевом может быть минимальным даже при глубокой запашке. Здесь все неблагоприятные факторы перестают действовать быстро.

При соблюдении приведенных рекомендаций почва обогащается органическим веществом и в ней активизируются мобилизационные процессы, в том числе деятельность азотфиксацирующих микроорганизмов.

**Торф.** Нередко удобрением служит низовой торф. Он обладает огромной влагоемкостью. В сухом веществе такого торфа содержится 80—93% органических соединений, три четверти которых — гумусовые и лигниноподобные вещества. Содержание органического азота в низовом торфе колеблется в пределах 1,5-4%.

**Компост.** В настоящее время для получения органических удобрений используют метод компостирования различных органических отходов. Отходы, поддающиеся компостированию, варьируют от городского мусора, представляющего собой смесь органических и неорганических компонентов, до более гомогенных субстратов, таких как навоз, отходы растениеводства, сырой активный ил и нечистоты.

Компостирование — это экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается аэробной биодеградации смешанной популяцией микроорганизмов в условиях повышенной температуры и влажности. В про-

цессе биодеградации органический субстрат претерпевает физические и химические превращения с образованием стабильного гумифицированного конечного продукта - органического удобрения.

Процесс компостирования представляет собой сложное взаимодействие между органическими отходами, микроорганизмами, влагой и кислородом. В отходах обычно существует своя эндогенная микрофлора. Микробная активность возрастает, когда содержание влаги и концентрация кислорода достигают необходимого уровня. Компост содержит наиболее стабильные органические соединения, продукты распада, биомассу мертвых микроорганизмов, некоторое количество живых и продукты химического взаимодействия этих компонентов.

Компостирование представляет собой динамический микробный процесс, протекающий благодаря активности сообщества микро- и макроорганизмов различных групп:

- микроорганизмы – бактерии (в т. ч. актиномицеты); мицелиальные грибы и дрожжи; водоросли; вирусы;
- микрофауна - простейшие;
- высшие грибы;
- макрофауна - двупарногие многоножки, клещи, ногохвостки, черви, а также муравьи, термиты, пауки и жуки.

Процесс компостирования можно разить на четыре стадии: мезофильная, термофильная, остывание, созревание.

В начальной **мезофильной** стадии микроорганизмы начинают быстро размножаться, температура поднимается до 40°C, среда подкисляется за счет образования органических кислот. При увеличении температуры выше 40°C начинают гибнуть исходные мезофилы и преобладать термофилы. Это поднимает температуру до 60°C, при которой грибы становятся активными. Далее процесс продолжается спорообразующими бактериями и актиномицетами; pH среды повышается. В течение **термофильной** фазы наиболее легко разлагаемые субстраты быстро потребляются, и скорость процесса начинает падать после того, как в него вовлекаются более устойчивые субстраты. При этом скорость тепловыделения становится равной скорости теплопотери, что соответствует достижению температурного максимума. Затем компост вступает в стадию остывания. В течение стадии **остывания** pH медленно снижается, но среда остается щелочной. Термофильные грибы из более холодных зон вновь захватывают весь объем компостируемой массы и вместе с актиномицетами потребляют трудноразложимые полисахариды, гемицеллюлозу и целлюлозу, разрушая их до моносахаридов, которые потом могут быть использованы широким кругом микроорганизмов.

Первые три стадии компостирования протекают очень быстро, за дни или недели, в зависимости от используемой системы компостирования. Заключительная стадия – **созревание** длится несколько месяцев. В этой стадии происходят сложные реакции между остатками лигнина из отходов и белками отмерших микроорганизмов, приводящие к образованию гуминовых кислот. Конечная реакция компоста - слабощелочная.

Разложение органических отходов в процессе компостирования представляет собой динамический и сложный экологический процесс, в котором постоянно происходит изменение температуры и состава питательных веществ, меняется численность и видовой состав микроорганизмов.

#### **4. Минеральные удобрения**

##### **Влияние минеральных удобрений на микроорганизмы почвы и ее плодородие.**

Внесение в почву удобрений улучшает питание растений и изменяет условия существования почвенных микроорганизмов.

При благоприятных климатических условиях количество микроорганизмов и их активность после внесения в почву удобрений значительно возрастают. Усиливается распад гумуса, увеличивается мобилизация азота, фосфора и других элементов.

Внесение в почву фосфорно-калийных удобрений усиливает деятельность азотфикссирующих микроорганизмов.

Иногда внесение в почву минеральных удобрений, особенно в высоких дозах, неблагоприятно сказывается на ее плодородии. При подкислении почвы в раствор переходят соединения алюминия, токсичные для микроорганизмов почвы и растений.

Внесение извести благотворно сказывается на сапротрофной микрофлоре. Изменяя pH почвы в благоприятную сторону, известь нейтрализует вредное действие физиологически кислых минеральных удобрений.

Некоторые из **микроудобрений**, например **молибден**, входят в ферментную систему азотфикссирующих микроорганизмов. Для симбиотической азотфиксации необходим также **бор**, важный для формирования нормальной сосудистой системы растений, а следовательно, и успешного азота усвоения. Большинство других микроэлементов (Си, Mn, Zn и т. д.) в небольших дозах также усиливают интенсивность микробиологических процессов в почве.

**Трансформация соединений азота.** Общий запас азота в почвах довольно велик. В пахотном слое дерново-подзолистых почв он достигает 4 т, в черноземах — 6-15 т/га.

Потребности сельскохозяйственных культур в азоте приходится удовлетворять минеральными и органическими удобрениями. Минеральные соединения вносят в основном в форме аммонийных и нитратных соединений, а также мочевины.

Некоторое количество аммонийных удобрений, а также аммония, накапливающегося при минерализации органических соединений, закрепляется почвенными минералами

Процесс нитрификации особенно наглядно проявляется в парующей почве, где летом накапливаются нитраты. Под посевами сельскохозяйственных культур соли азотной кислоты практически отсутствуют. Ранней весной и осенью нитратов мало даже в парующих почвах. Это связано с тем, что в холодную погоду соли азотной кислоты довольно энергично потребляются психрофильными микроорганизмами, а жизнедеятельность нитрифицирующих бактерий при температуре ниже 8-10 °C проявляется очень слабо. Следовательно весной целесообразно использовать азотные подкормки.

В почве возможна и «косвенная» денитрификация, когда потери азота происходят в результате некоторых химических реакций. Так, в кислой среде HNO<sub>2</sub>, реагируя с аминокислотами, образует молекулярный азот.

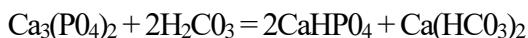
Потери азота из удобрений существенно уменьшаются при использовании гранулированных и медленно растворяющихся удобрений. Большое внимание сейчас уделяют применению веществ, задерживающих процесс нитрификации. Их использование особенно целесообразно при внесении в почву больших доз удобрений. К подобным соединениям относят ряд цианидов, нитро- и галла-анилиды, производные фенолов, пиридиниды и др. Применение небольших доз этих соединений селективно подавляет нитрификацию, не угнетая в то же время другие микробиологические процессы в почве.

Таким образом, из внесенных на 1 га под зерновые культуры 80 кг азота растения усваивают около 30 кг. Примерно такое же количество азота остается в почве - это азот органических удобрений и корневых остатков, а также азот, ассимилированный микроорганизмами. Остальные 20 кг теряются в процессе денитрификации и вымываются из почвы.

**Трансформация соединений фосфора и калия.** Запас фосфора в почве зависит от материнской горной породы, на которой данная почва формировалась. Обычно в материнских породах фосфор содержится в форме фторапатита  $\text{Ca}_5\text{F}(\text{P}_0_4)_3$  и гидроапатита  $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{P}_0_4)_3$ . В кислых почвах накапливаются фосфаты полуторных окислов ( $\text{AlP}_0_4$ ,  $\text{FeP}_0_4$ ), а также основные соли железа и алюминия [ $\text{Fe}_2(\text{OH})_3\text{P}_0_4$ ,  $\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{P}_0_4$ ], малодоступные растениям. В почвах, насыщенных основаниями, образуются фосфаты кальция  $\text{CaHP}_0_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{P}_0_4)_2$ , постепенно растворяющиеся слабыми кислотами, что способствует более легкому усвоению фосфора растениями. При известковании кислых почв часть фосфатов полуторных окислов превращается в фосфаты кальция и магния, более доступные для растений.

Основная масса минеральных и органических соединений фосфора в почве недоступна высшим растениям, поэтому для получения высоких урожаев вносят минеральные фосфорные удобрения. Микробиологические процессы, происходящие в почве, способствуют переводу в доступное для растений состояние минеральных и органических соединений фосфора. Их разрушение - неспецифический процесс, который способны вызывать разнообразные формы микроорганизмов.

Некоторые минеральные соединения фосфора переходят в раствор под действием кислых продуктов метаболизма бактерий или водородных ионов кислых почв. Даже диоксид углерода, выделяемый микроорганизмами при разложении органических соединений, переводит в растворе двух- и трехкальциевые фосфаты в водорастворимый монокальциевый фосфат:



Поглощенная фосфорная кислота может быть вытеснена и тугими анионами. Поэтому когда на парящих почвах при нитрификации повышается содержание азотной кислоты, то несколько увеличивается и количество подвижных фосфатов.

Микробиологическая деструкция отдельных минеральных соединений фосфора происходит неодинаково легко. Для ускорения минерализации органических соединений Фосфора предложен препарат фосфоробактерин.

**Калий** в почве находится в виде минеральных соединений, причем в основном в алюмосиликатных минералах. Микроорганизмы играют существенную роль в повышении содержания в почве легкорастворимых соединений калия.

Для усиления распада алюмосиликатов в почве предложен препарат «силикатных» бактерий.

С урожаем сельскохозяйственных культур выносится менее половины массы фосфора, внесенного с минеральными и органическими удобрениями. Доступность большинства соединений фосфора для растений ограничена. Даже хорошо растворимый в воде суперфосфат при применении вразброс усваивается на 15%, при рядковом внесении — в полтора-два раза больше.

В отношении калия нужно иметь в виду, что некоторый дефицит этого элемента имеет лишь 10% пахотных земель. Около 22% среднеобеспеченено калием и 68% содержит вполне достаточное его количество.

## 5. Пестициды

Химические средства защиты урожая - пестициды - используются в сельском хозяйстве очень широко. В них входят гербициды, применяемые для борьбы с сорняками, фунгициды, защищающие растения от фитопатогенных грибов, инсектициды - средства защиты от вредных насекомых, нематициды - препараты против нематод и пр.

Химическая природа пестицидов весьма разнообразна - они относятся более чем к 20 различным группам соединений.

На трансформацию пестицидов в почве влияют химические и физические факторы, сорбция почвенными частицами и т. д. Однако главный фактор, вызывающий изменение пестицидов в почве, - микроорганизмы.

Быстрота микробиологического разрушения пестицидов в значительной степени зависит от их химического состава. Если в структуре пестицида присутствуют галогенные, нитро- или металлические группы, то замедляется процесс микробной деструкции.

Некоторые пестициды могут разлагаться лишь определенными видами микроорганизмов. Так, к микроорганизмам, использующим аллиловый спирт, относятся *Nocardia corallina*, *Azotobacter*, *Trichoderma vulgaris* и т. д.

Пестициды и другие соединения неприродного происхождения, которые подвергаются полной минерализации до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, сульфатов и фосфатов, обычно проходят весь метаболический путь и могут использоваться в качестве источника углерода и энергии членами микробного сообщества.

К соединениям, не поддающимся трансформации микроорганизмами, относятся синтетические полимеры и некоторые ароматические углеводороды. Отдельный вид микроорганизмов может обладать катаболитной способностью катализировать трансформацию одного соединения в другое, но не иметь ферментативной системы для дальнейшей деградации. Это может быть восполнено вторым микроорганизмом с комплементарным катаболическим свойством, и тогда соединение будет полностью разложено.

Гербициды вносят в почву в небольших количествах - несколько килограммов на 1 га. Обычно применяемые в практике дозировки пестицидов, как правило, не влияют на жизнь почвы. Однако иногда происходит задержка процесса нитрификации, так как нитрификаторы очень чувствительны к различного рода сильным воздействиям. Чувствительность к пестицидам относится в основном к повышенным их дозам. На основную же массу микроорганизмов дозы, даже в 50-100 раз превышающие применяемые на практике, не оказывают существенного влияния.

Несомненно, что не все микроорганизмы одинаково чувствительны к определенным препаратам.

Рассмотрим влияние пестицидов на взаимоотношения бобовых растений с клубеньковыми бактериями. Здесь наблюдаются значительные различия. Так, гербициды, ингибирующие фотосинтез, не действуют на образование клубеньков, но процесс азотфиксации подавляется ими вследствие недостатка ассимилятов для клубеньковых бактерий. Другие гербициды депрессируют активность находящихся в клубеньках бактерий и снижают азот-фиксацию.

Таким образом, для бобовых культур следует особенно тщательно подбирать гербициды и желательно употреблять их в сниженных дозах. Предпочтительнее вообще

использовать для этих культур почвы, очищенные от сорняков при выращивании предшественников.

### **1.3 Лекция №3 (2 часа).**

**Тема: «Системы использования почвы и микробиологические основы ее плодородия. Регулирование микробиологических превращений в почве основных элементов питания растений. Трансформация азота в почве»**

#### **1.3.1 Вопросы лекции:**

1. Севообороты и плодородие почвы.
2. Биологический азот в земледелии.
3. Накопление гумуса и создание структуры почвы.
4. Трансформация азота в почве

#### **1.3.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Севообороты и плодородие почвы.**

При сельскохозяйственном использовании почвы без удобрения она постепенно истощается и урожай падают. На юге России, в степной зоне, возникла «переложная» система.

В России существовала также «огневая», или «подсечная», система земледелия, которую применяли в более северной зоне.

При увеличении народонаселения потребность в земельной площади возросла, и возникла система «ускоренного» отдыха почвы в виде так называемой трехполки, при которой чередовались пар, озимые и яровые культуры.

После Октябрьской революции на смену трехполью пришли травопольная и плодосменная системы, включавшие посев травосмесей.

Целесообразность и даже необходимость введения севооборотов возникла, когда было установлено неблагоприятное воздействие на плодородие почвы длительного возделывания на поле одной и той же культуры.

Некоторые растения односторонне обедняют почву отдельными элементами питания. Под пропашными культурами почва истощается и ее структура существенно ухудшается.

Токсические для растений вещества могут накопить в почве многие микроорганизмы, развивающиеся в ризосфере растений и на растительных остатках.

Имеются и другие причины, определяющие влияние одного растения на другое - аллелопатическое действие растений. Термин «аллелопатия» был предложен немецким ученым Г. Молишем для определения химического воздействия одного растения на другое. Многие покрытосеменные растения способны вырабатывать те или иные токсические вещества, в том числе алкалоиды. Эти соединения не только аккумулируются в растительных тканях, но и частично выделяются в почву.

Отмеченное свойство присуще большинству культурных растений. Так, корневая система овса выделяет скополетин, лен - ряд ароматических соединений, люцерна - алкалоиды, сахарная свекла - циклические соединения и т. д.

Очевидно, научно обоснованное чередование культур должно строиться на учете аллелопатического фактора.

Благоприятное влияние на последующие культуры, как правило, оказывают бобовые растения в связи с тем, что они в симбиозе с клубеньковыми бактериями обогащают почву азотом. Это приводит к значительному повышению урожайности последующих культур. Общеизвестна высокая эффективность как предшественников хлопчатника люцерны и рапса. В значительной мере это связано с тем, что корневая система этих растений выделяет в почву соединения, угнетающие возбудителей вилта хлопчатника. Помимо этого, люцерна обогащает почву азотом.

В заключение отметим, что в середине XIX в., когда после работ Ю. Либиха стали широко использовать минеральные удобрения, нередко не принимали во внимание значение севооборотов. Сначала урожай резко возрастали, но вскоре начинали снижаться даже при увеличении норм удобрений. Оправдалась точка зрения Я. А. Линовского, который указывал, что при решении вопросов плодородия почв следует учитывать не только минеральное питание растений, но и другие факторы, в том числе севооборот.

## **2. Биологический азот в земледелии.**

Практически во всех почвах при их сельскохозяйственном использовании азот находится в первом минимуме.

Азот требуется растениям в довольно больших количествах. Если покрывать потребности растений в азоте только минеральными удобрениями, то для получения урожая зерновых культур 21 ц/га, нужно вносить в почву 220 кг азота на 1 га.

Сейчас в среднем под зерновые дают 30 кг азота на 1 га в форме азотных удобрений. Существен вклад азота в почву в форме органических удобрений и «биологического» азота. Целесообразно уделять внимание органическим удобрениям и биологическому азоту, что обеспечит накопление гумуса и повышение потенциального плодородия почв.

Широкое использование биологического азота стало особенно актуальным в последнее время в связи с необходимостью рационального расходования энергии.

В настоящее время установлено, что не все бобовые растения в равной мере обогащают почву азотом. По данному признаку одно- и многолетние бобовые растения существенно различаются. Бобовые растения не только обогащают почву азотом, но и дают продукцию, богатую белком, азот которого в основном получен из молекулярного азота воздуха.

Кроме того, бобовые культуры по сравнению со злаковыми дают белковую продукцию, более богатую такими ценными аминокислотами, как лизин, метионин, цистин и триптофан.

В почве азот остается в виде пожнивных и корневых остатков бобовых растений. Величина массы растительных остатков, запахиваемых в почву после уборки урожая, довольно точно определена большой серией исследований. Абсолютная и относительная масса растительных остатков меняется в зависимости от величины урожая.

Бобовые растения часть азота берут из минеральных соединений почвы, а часть связывают из молекулярного азота атмосферы (2/3 накапливаемого ими азота фиксируется из воздуха).

Примерные подсчеты показывают, что в пахотные почвы из растительных остатков бобовых растений поступает около 0,9 млн. т фиксированного азота и около 1,1 млн. т имеется в урожае.

Расчет фиксированного азота, поступающего в почву с растительными остатками, основан на анализе содержания азота в них. Этот показатель должен быть увеличен по крайней мере на 30%, так как часть азота поступает в почву с корневым опадом и экзо-смосом. Это обычно не учитывается. Поэтому можно считать, что бобовые культуры обогащают пахотные почвы примерно 1,2 млн. т азота, но возможно и более.

Нельзя не учитывать того, что азот кормов частично возвращается в почву в виде навоза (до 40-50%). Доля бобовых культур в азоте навоза равна примерно 20%.

Азот остатков бобовых растений примерно на 25% используется следующей культурой и на 15% двумя последующими культурами. Остальная часть трансформируется в гумусовые соединения и служит фондом для повышения потенциального плодородия почвы, а также частично теряется из почвы в результате денитрификации и вымывания.

В дальнейшем при росте урожайности бобовых культур и увеличении площадей, занятых ими, размер биологического азотонакопления может возрасти.

Продуктивное накопление азота бобовыми культурами требует создания комплекса условий для эффективного симбиоза их с клубеньковыми бактериями. Большое значение для накопления азота имеет обеспеченность почвы влагой, наличие в ней доступных форм фосфора, калия и кальция. Большинство бобовых культур предпочитает нейтральные почвы и лишь некоторые из них - более кислые.

Весьма эффективно на азотонакопление действуют и микроэлементы, особенно молибден, входящий в ферментативный комплекс нитрогеназы. Бобовые культуры хорошо реагируют на органические удобрения и даже на внесение свежей соломы. Эффективное действие соломы как удобрения в значительной степени определяется тем, что при ее разложении выделяется углекислота, повышение содержания которой в приземном слое воздуха усиливает рост растений и повышает их продуктивность.

Еще не совсем решен вопрос о целесообразности внесения под бобовые культуры минеральных азотных удобрений. Повышенные дозы минерального азота подавляют инфекционный процесс формирования клубеньков, а в конечном итоге фиксацию молекулярного азота.

Искусственное заражение бобовых культурами клубеньковых бактерий усиливает образование клубеньков и процесс фиксации азота.

Но не только бобовые, но и другие высшие растения в симбиозе с микроорганизмами способны фиксировать молекулярный азот. Лучше изучены некоторые древесные растения (ольха и казуарина), на корневой системе которых клубеньки образует азотфикссирующий актиномицет из рода *Frankia*.

Небобовые растения, симбиотически фиксирующие молекулярный азот, стали использовать в целях повышения плодородия почвы задолго до выяснения причины их полезного действия.

Рассмотрим вопрос о роли свободноживущих микроорганизмов в азотном балансе почв. Показано, что без применения азотных удобрений и без посева бобовых растений можно получить урожай зерновых культур, для создания которых требуется внесение до 50 кг азота на 1 га. При этом к возможным источникам пополнения азота относятся

деятельность свободноживущих азотфиксаторов и отчасти поступления этого элемента из атмосферы с дождевыми водами.

На севере процесс азотфиксации свободноживущими микроорганизмами протекает крайне вяло.

Молекулярный азот, ассимилированный свободноживущими сапропитными микроорганизмами, не может быть сразу полностью использован растениями. Он становится доступным для растений по мере отмирания микроорганизмов. Часть фиксированного азота попадает в состав органического вещества почвы.

Молекулярный азот связывается сапропитными и некоторыми автотрофными микроорганизмами, анаэробными фотосинтезирующими бактериями и цианобактериями.

Эти группы микроорганизмов проявляют себя достаточно активно в сильно увлажненных и затопленных почвах, например на рисовых полях.

В залитых водой почвах, используемых для культуры риса, при хорошем развитии цианобактерии могут накапливать за вегетационный период 50-70 кг азота и более на 1 га. Однако если под рис даются дозировки минерального азота около 40 кг/га, то азотфиксация тормозится, а при 100 кг/га сильно депрессируется. Имеются данные, что фосфорные удобрения несколько снижают неблагоприятное влияние высоких доз азотных удобрений на азотфиксацию.

### **3. Накопление гумуса и создание структуры почвы.**

Гумус имеет большое значение для плодородия почвы. Он служит резервом питательных веществ для растений. Доказано, что минеральные удобрения более эффективны на почвах, богатых гумусом.

Чрезвычайно ценно свойство гумуса задерживать в пахотном слое влагу, имеющее особое значение в зоне недостаточного увлажнения. В природных условиях каждый тип почвообразовательного процесса приводит к накоплению в почве определенного запаса гумуса.

Стабилизация запаса гумуса в почве в основном определяется поступлением в нее органических веществ. Увеличить содержание гумуса в почве можно введением в севообороты многолетних трав.

Поскольку гумусовые соединения склеивают механические элементы почвы и создают агрегаты, то вопрос о динамике гумуса органически связан с острутурированием почвы. Структура - важное свойство почвы.

Структурная почва при рыхлении легко распадается на комочки, а бесструктурная - дает глыбистые отдельности. Различают макро- и микроструктуру почвы. К макроструктурным элементам относятся почвенные комочки диаметром от 0,25 до 10 мм. Микроструктура - это комочки с диаметром менее 0,25 мм. Агрегаты крупнее 10 мм создают глыбистую структуру.

В структурной почве много некапиллярных промежутков. Дождевая вода легко впитывается подобной почвой и рассасывается по капиллярам. В бесструктурной почве мелкие частицы залегают сплошной массой на всю глубину пахотного слоя. Такая почва плохо впитывает осадки, и большое количество воды стекает с поля.

Образование агрономически ценной структуры возможно далеко не во всех почвах. Лишь при наличии известного количества илистых частиц и определенных форм гумусовых соединений почва может быть острутурирована. Наиболее часто хорошая

структура свойственна почвам черноземной зоны, богатым илистыми коллоидными частицами. Структура почвы должна быть водопрочной.

Под воздействием микроорганизмов могут быть образованы менее прочные макроагрегаты. Многие микроорганизмы (грибы, актиномицеты) имеют мицелиальный рост. Развиваясь в почве, они опутывают ее частицы мицелием, что вызывает формирование агрегатов. Существуют бактерии, образующие слизи, также способные цементировать почву. Структура, сформированная таким способом, недолговечна и относительно легко распадается.

В связи с деятельностью почвенной микрофлоры наблюдается сезонная «пульсация» запаса гумуса в почве. Каждое растение как продуцент органического вещества способствует образованию структуры, и характер его воздействия на почву зависит от строения корней и их массы.

Во многих случаях препятствует повышению прочности структуры недостаток в почве кальция. Это наблюдается в зоне кислых северных почв.

В интенсивном земледелии поддержание и увеличение плодородия почвы стремятся осуществить на всех полях севооборота системой агротехнических мероприятий, которые проводят с учетом региональных условий.

#### **4. Трансформация азота в почве**

Азотные соединения способны к различным микробиологическим превращениям и поэтому нередко теряются для растений.

Общий запас азота в почве довольно велик. В пахотном слое дерново-подзолистых почв он достигает 4 т, в черноземах – 6-15 т/га. Основная часть азотного фонда находится в составе гумуса. Небольшое количество азота входит в другие органические соединения почвенного слоя, а также в минеральные соединения - преимущественно аммония и азотной кислоты. До 50-60 кг азота на 1 га заключено в плазме микроорганизмов, населяющих пахотный слой почвы.

Указанных запасов могло бы хватить на многие десятки лет, для получения высоких урожаев. Однако вследствие того, что основная часть азота почвы входит в состав гумусовых соединений, трудно разлагаемых микроорганизмами, сельскохозяйственные культуры обычно испытывают недостаток азота в этом элементе. Кроме того, допускать уменьшение содержания гумуса в почве нецелесообразно, так как это снижает плодородие почвы.

Потребности сельскохозяйственных культур в азоте приходится удовлетворять минеральными и органическими удобрениями. Минеральные соединения вносят в основном в форме аммонийных и нитратных соединений, а также мочевины.

Некоторое количество аммонийных удобрений, а также аммония, накапливающегося при минерализации органических соединений, закрепляется почвенными минералами. Ион аммония входит в кристаллическую решетку глинистых минералов. Частично аммонийные соединения закрепляются необратимо. Растения и гетеротрофные микроорганизмы могут использовать до половины поглощенного N.

Аммонийный азот, как образующийся в процессе аммонификации, так и внесенный с удобрениями, не является в почве стабильным соединением. Под влиянием нитрифицирующих бактерий он окисляется до азотной кислоты.

Процесс нитрификации особенно наглядно проявляется в парющей почве, где летом накапливаются нитраты. Под посевами сельскохозяйственных культур соли азотной

кислоты практически отсутствуют. Ранней весной и осенью нитратов мало даже в парующих почвах. Это связано с тем, что в холодную погоду соли азотной кислоты довольно энергично потребляются психрофильными микроорганизмами, а жизнедеятельность нитрифицирующих бактерий при температуре ниже 8-10°C проявляется очень слабо.

Азот, закрепленный в микробных клетках, после их отмирания минерализуется и используется растениями. Денитрификация, вызываемая микроорганизмами, обусловливает большие потери азота. Потери от этого процесса возрастают по мере увеличения в почве количества нитратов.

Для борьбы с потерями азота из удобрений может быть применен ряд приемов. Так. установлено, что потери существенно уменьшаются при использовании гранулированных и медленно растворяющихся удобрений. К ним относятся уреаформ, гранулированная мочевина с оболочкой из элементарной серы, уреазет, изобутилен-диуреа и т. д.

Хороших результатов можно достигнуть приближенным к посеву или дробным внесением удобрений и т. д.

Большое внимание сейчас уделяют применению веществ, задерживающих процесс нитрификации. Их использование особенно целесообразно при внесении в почву больших доз удобрений.

Большинство сапрофитных микроорганизмов не угнетаются применяемыми дозами этих препаратов.

При использовании нормальных дозировок депрессия микробиологических процессов может быть лишь в отдельных зонах, куда попадают значительные количества препарата из-за их неравномерного распределения в почве.

Продолжительность действия препаратов зависит от почвенно-климатических условий и влажности почвы.

Азотные соединения обычно в форме нитратов частично вымываются и грунтовые воды, которые используются для водоснабжения. В СССР установлена предельно допустимая концентрация нитратов (ПДК) в питьевой воде, равная 10 мг/л. В странах Западной Европы и США эта норма значительно выше (45—50 мг/л).

Следует отметить опасность накопления нитратов в пище и кормах. В зерне нитраты, как правило, не аккумулируются, за исключением зерна ячменя. В овощах и фруктах, как и в зеленых кормах, концентрация нитратов иногда бывает весьма высокой. Пища и корма с высоким содержанием нитратов могут вызвать отравления. Для пищевой продукции Министерством здравоохранения СССР утверждены временные нормы содержания в ней нитратов. С учетом указанного требует решения вопрос о нормировании доз азотных удобрений для разной продукции сельского хозяйства.

## **1.4 Лекция №4 (2 часа).**

**Тема: «Регулирование микробиологических превращений в почве основных элементов питания растений. Трансформация в почве соединений фосфора и калия. Баланс основных элементов питания растений в пахотных почвах»**

### **1.4.1 Вопросы лекции:**

1. Трансформация в почве соединений фосфора
2. Трансформация в почве соединений калия
3. Баланс основных элементов питания растений в пахотных почвах

### **1.4.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Трансформация в почве соединений фосфора**

Значительно меньшая подвижность по сравнению с азотом свойственна соединениям фосфора. Запас фосфора в почве зависит от материнской горной породы, на которой почва образовалась. Обычно в материнских породах фосфор содержится в форме фторапатита  $\text{Ca}_5\text{F}(\text{P}_2\text{O}_5)_3$  и гидроапатита  $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{P}_2\text{O}_5)_3$ . При разрушении указанных минералов образуются соединения ортофосфорной кислоты.

В кислых почвах накапливаются фосфаты полуторных окислов ( $\text{Al}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), а также основные соли железа и алюминия ( $\text{Fe}_2(\text{OH})_3\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Al}_2(\text{OH})_3\text{P}_2\text{O}_7$ ), которые плохо доступны растениям. В почвах, насыщенных основаниями, образуются фосфаты кальция  $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{P}_2\text{O}_7)_2$ , постепенно растворяющиеся слабыми кислотами, что способствует более легкому усвоению фосфора растениями.

При известковании кислых почв часть фосфатов полуторных окислов превращается в фосфаты кальция и магния, более доступные для растений.

Трансформация минеральных соединений горной породы микроорганизмами и растениями привела к превращению значительной их части в органические вещества. В подзолах, дерново-подзолистых, серых лесных почвах и черноземах 30—45% фосфора содержится в форме органических соединений. В каштановых почвах органических фосфатов меньше (около 25%), а в сероземных — лишь около 14%. Основная масса органических соединений фосфора входит в состав гумуса. Большая часть органического фосфора (до 60%) представлена фосфатами инозита. На долю нуклеиновых кислот приходится до 10% органических соединений фосфора, на глицерофосфаты и другие простые эфиры — 5—10; на фосфолипиды — 0,45—2,6 %.

Из отмеченных соединений наиболее стабильны инозитфосфаты. Легче разлагаются микроорганизмами нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты, фосфаты, глицеро- и сахарофосфаты, а также полифосфаты.

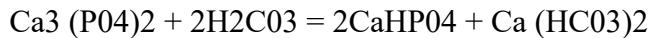
Содержание фосфора ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) в почвах колеблется от 0,03 до 0,2%, а общий запас фосфора в пахотном слое составляет от 1 до 9 т/га.

По примерным подсчетам, около 15 кг фосфора на 1 га может содержаться в клетках микроорганизмов.

Основная часть минеральных и органических соединений фосфора в почве недоступна высшим растениям, поэтому для получения высоких урожаев вносят минеральные удобрения.

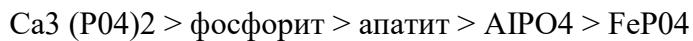
Микробиологические процессы, происходящие в почве, способствуют переводу в доступное для растений состояние минеральных и органических соединений фосфора. Их разрушение — не специфический процесс и вызывается разными микроорганизмами.

Некоторые минеральные соединения фосфора переводятся в раствор кислыми продуктами метаболизма бактерий или водородными ионами кислых почв. Даже углекислота, выделяемая микроорганизмами при разложении органических соединений, переводит в раствор двух- и трехкальциевые фосфаты, которые превращаются в водорастворимый монокальциевый фосфат:



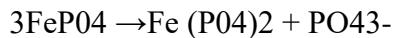
Поглощенная фосфорная кислота может быть вытеснена и другими анионами. Поэтому когда на парующих почвах при нитрификации повышается содержание азотной кислоты, то несколько увеличивается количество подвижных фосфатов.

Микробиологическая деструкция минеральных соединений фосфора происходит неодинаково легко. По возрастающей трудности разложения может быть намечен следующий ряд:



Растворяющее действие микроорганизмов на фосфаты не всегда связано с подкислением среды. Г. С. Муромцев и В. Ф. Павлова установили, что даже фосфаты алюминия и железа могут растворяться различными бактериями, грибами и актиномицетами, которые дают метаболиты, связывающие катионы фосфатов в недиссоциирующие хелатные комплексы.

В анаэробных условиях в затопляемых рисовых полях снижается окислительно-восстановительный потенциал, поэтому окисное железо восстанавливается в закисное. При этом происходит освобождение фосфора:



## 2. Трансформация в почве соединений калия

Калий в почве находится в виде минеральных соединений, причем основной запас его — в алюмосиликатных минералах. Из первичных минералов, содержащих калий, широко распространены калийные полевые шпаты (ортоклазы) и в меньшей степени калийные слюды (мусковит, биотит). Вторичные, или глинистые, минералы, образующиеся в процессе выветривания и почвообразования, относятся к гидроалюмосиликатам. В некотором количестве, наряду с другими элементами, в них содержится калий.

Общий запас калия довольно велик. В 1 га пахотного слоя песчаной дерново-подзолистой почвы содержится 15—20 т K<sub>2</sub>O, в дерново-суглинистой подзолистой почве — 45—75, в черноземе — 60—75 и в сероземе — 75—90 т.

Калий, адсорбционно связанный на поверхности коллоидов, служит главным источником питания растений. Он составляет не более 0,5—1,5% общего содержания этого элемента в почве. Иногда доступного для растений калия не хватает.

Микроорганизмы играют существенную роль в повышении содержания в почве легкорастворимых соединений калия. Способность микроорганизмов разлагать алюмосиликаты была установлена в начале текущего века чешским ученым Ж. Стоклазой и польским микробиологом К. Басаликом. Позднее это явление было подтверждено другими исследователями.

Разлагать силикаты способны разные микроорганизмы. Многие из них продуцируют кислоты, обладающие большой деструктивной активностью. Особенно большую растворяющую способность имеют кислоты, дающие комплексные и внутрикомплексные соединения с элементами, входящими в состав алюмосиликатов. Из этой группы отметим продуценты полигидроксида - и трикарбоновых кислот.

Большую роль в разрушении силикатов играют слизи, образуемые микроорганизмами. Чаще всего это полисахариды, содержащие уроновые кислоты. Они имеют карбоксильные и фенольные группы, которые реагируют с определенными элементами силикатов, образуют, комплексные связи, что приводит к освобождению соответствующего вещества из кристаллических решеток и переводу его в раствор.

В выветривании силикатов, по данным Р. С. Кутузовой, имеет значение биогенное сodoобразование. Показано, что нефелин и плагиоклаз сильно разрушаются под влиянием кислот, а кварц - щелочей.

Следовательно, распад минералов может идти под влиянием разных факторов.

### **3. Баланс основных элементов питания растений в пахотных почвах**

Рассмотрим баланс азота в земледелии нашей страны. Минеральные азотные удобрения позволяют быстро повышать урожай, действуя практически в год внесения в почву.

Химическая промышленность поставляет сельскому хозяйству ежегодно примерно 10,9 млн. т азотных удобрений (в расчете на чистый азот), из них в почву вносят 9,6 млн. т. Дозы внесения их под разные культуры различны. Так, под хлопчатник дают до 200—250 кг азота на 1 га, что вполне достаточно. Необходимое количество азотных удобрений получают и другие технические культуры. Под зерновые культуры в среднем вносят около 30 кг/га.

Азотный фонд почвы пополняется не только минеральными, но и органическими удобрениями. Сейчас ежегодно используют около 1 млрд. т органических удобрений, содержащих 4,6 млн. т азота. В среднем на 1 га пашни приходится 14 кг азота в форме органических удобрений. Как было отмечено выше, действие навоза растягивается обычно на три года. В первый год минерализуется не более 25% органических азотсодержащих соединений. Примерно аналогичным образом используются корневые и пожнивные остатки бобовых культур. По расчетам, на площадь всей пашни их поступает около 1,2 мл и. т. Из этого фонда 1 га зерновых получает 6 кг азота. Свободноживущие азотфиксаторы связывают на 1 га пашни около 20 кг азота, что на всю пахотную площадь составляет 4,25 млн. т. Допускаем, что биологически закрепленный азот в первый год используется на 15%. В небольших количествах в почву поступает азот с высеваемыми семенами и осадками

Изложенные соображения позволяют сделать примерный расчет использования посевом зерновых культур азота из всех поступлений.

Таким образом, из внесенных на 1 га под зерновые культуры 80 кг азота растения усваивают около 30 кг. Примерно такое же количество азота остается в почве —это азот органических удобрений и корневых остатков, а также азот, ассимилированный микроорганизмами. Остальные 20 кг теряются в процессе денитрификации (около 15 кг) и вымываются из почвы (около 5%).

Для среднего урожая зерновых культур требуется около 70 кг доступного азота.' Его поступления, как отмечалось, дают лишь 30 кг, остальные 40 кг берутся из почвы, в

основном из минеральных форм азота, образующихся при распаде гумуса. Обычно в год теряется от 0.5 до 1 т гумуса. Большое число опытов свидетельствует, что наши пахотные почвы потеряли существенное количество гумуса — иногда до 30% и более. Это снизило потенциальное плодородие окультуренных почв. Часть минерализованного из гумуса азота вымывается из почвы и теряется в виде газообразных веществ в результате химических и микробиологических процессов. Эти потери предположительно достигают 15 кг/га.

Следовательно, из поступающих в почву его источников и в результате распада гумуса потери азота достигают 35 кг/га.

Приведенные средние данные не могут быть отнесены ко всем хозяйствам. Существует немало совхозов и колхозов, получающих высокие урожаи зерновых культур (до 50—70 ц/га). В этих хозяйствах используют повышенные дозы минеральных и органических удобрений, а также большое внимание уделяют культурам бобовых растений, которые не только обогащают почву азотом, но и дают корм, богатый белком.

Целесообразно составить примерный баланс азота на территории всей пашни Советского Союза.

Из данных таблицы следует, что из 22 млн. т азота, поступающих в пахотные почвы, около 8 млн. т усваиваются посевами сельскохозяйственных растений. Исходя из принятого нами принципа расчетов можно предполагать, что около 8 млн. т азота остается в почве, а до 6 млн. т теряется в результате денитрификации и вымывания.

С урожаем сельскохозяйственных растений выносится около 15 млн. т азота. Следовательно, если из имеющихся его поступлений берется около 8 млн. т. то из почвы заимствуется до 7 млн. т азота.

Источником почвенного азота, как уже отмечалось, является гумус, минерализуемый микроорганизмами. Кроме азота, потребленного растениями, некоторое количество этого элемента теряется в газообразной форме и вымывается из почвы. Вообще потери азота достигают 8 млн. т.

Основными направлениями экономического и социального развития СССР на 1986—1990 годы и на период до 2000 года ставится задача повысить валовой сбор зерна до 250—255 млн. т и значительно увеличить производство кормового белка за счет расширения посевов и повышения урожайности бобовых культур. Намечается значительно увеличить поставки минеральных и органических удобрений. Расчет показывает, что намеченные рубежи повышения урожайности будут достигнуты.

Приведем некоторые данные, относящиеся к балансу фосфора. С минеральными удобрениями в пахотные почвы поступает около 7.6 млн. т РjО, а органическими — около 2 млн. т. С урожаем сельскохозяйственных культур выносится лишь около 4 млн. т. Однако доступность большинства соединений фосфора для растений ограничена. Даже хороший растворимый в воде суперфосфат при его применении вразброс усваивается на 15%, а при рядковом внесении в 1,5—2 раза больше. Фосфорные соединения к тому же неравномерно распределяются по территории пашни. Поэтому лишь около 22% пашни содержат повышенное количество РjОj, 36% среднеобеспеченны фосфором, остальную площадь можно считать нуждающейся в фосфоре.

В отношении калия нужно иметь в виду, что некоторый дефицит этого элемента имеет лишь 10% пахотных земель. Около 22% среднеобеспечено калием и 68% содержит

вполне достаточное его количество. С урожаем выносится около 10,5 млн. т КжО. С минеральными удобрениями его ежегодно вносят до 6,8 млн. т. с органическими - 3,6 млн. т.

Таким образом, вклад калия, поступающего с удобрениями в пахотные почвы, весьма существен.

В заключение следует отметить, что на величину урожая влияет не только запас элементов питания, но и сорт растения, и уход за посевом.

## **1.5 Лекция №5 (2 часа).**

**Тема: «Взаимоотношения микроорганизмов и растений. Микроорганизмы ризосферы и их влияние на растение. Симбиоз микроорганизмов с растениями. Эпифитные микроорганизмы растений и хранение урожая. Развитие на растениях токсигенных грибов»**

### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Микроорганизмы ризосферы и их влияние на растение.
2. Симбиоз микроорганизмов с растениями.
3. Эпифитные микроорганизмы растений и хранение урожая
4. Развитие на растениях токсигенных грибов

### **1.5.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Микроорганизмы ризосферы и их влияние на растение.**

На поверхность корней и надземных частей растений выделяются органические соединения, синтезированные растительным организмом. Это явление называется **экзосмосом**.

В зависимости от многих причин интенсивность экзосмоса может быть большей или меньшей. Количество выделяемых за период жизни растений соединений составляет до 10% их массы и более.

При корневом экзосмосе образуются различные органические кислоты - яблочная, янтарная, винная, лимонная, щавелевая и др. Обнаружены и сахара, представленные альдозами и кетозами, а также некоторые аминокислоты.

В выделениях корней имеются органические соединения большой физиологической активности - витамины, ростовые вещества, иногда алкалоиды и т. д. Многие из указанных соединений в некоторых количествах выделяются и надземными органами растений. В связи с этим на корнях и надземных органах растений размножается обильная сапрофитная микрофлора. Важно значение сапрофитных микроорганизмов зоны корня в жизни растений как разрушителей органических и минеральных соединений, подготавливающих минеральную пищу для растений. Многие сапрофитные микроорганизмы вырабатывают антибиотические вещества, подавляющие развитие фитопаразитов.

Обычно выделяют «корневые» микроорганизмы, поселяющиеся на самой поверхности корня, - **микрофлора ризопланы**. Выделяют также группу микробов, обитающих в слое почвы, прилегающем к корню, - **микрофлора ризосферы**. Количество микроорганизмов на поверхности корня и в ризосфере в сотни раз больше, чем в осталь-

ной массе почвы. В зоне молодого корня в основном размножаются неспорообразующие бактерии (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*). Здесь же встречаются микроскопические грибы, дрожжи, водоросли и другие микроорганизмы.

Способность специфических групп микроорганизмов развиваться в ризосфере определенных видов растений и оказывать положительное или негативное воздействие определила необходимость севооборота.

Состав микрофлоры ризосферы меняется с возрастом растений.

Микрофлора поверхности корня несколько отличается по составу от микробного ценоза ризосферы. Так, в ризоплане богаче представлен род *Pseudomonas*, здесь слабо размножаются *Azotobacter*, целлюлозоразлагающие и некоторые другие микроорганизмы, которых много в ризосфере.

Имеются попытки доказать, что зоне корня каждого вида растений свойственны строго специфические группы микроорганизмов, практически не размножающиеся в ризосфере других растительных организмов. Действительно, можно отметить некоторую перегруппировку отдельных микроорганизмов в зоне корня различных растений. Это определяется составом корневых выделений и органических остатков, которые у отдельных видов растений имеют некоторые особенности.

В последнее время установлено, что среди различных представителей ризосферных микроорганизмов имеются отдельные виды, обладающие способностью не только находиться и размножаться на корнях растений, но и проникать в корни, а затем мигрировать в стебли и листья. Такие микроорганизмы отнесены к **эндофитным ризобактериям**, т. е. организмам, способным жить и размножаться в тканях высших растений.

## 2. Симбиоз микроорганизмов с растениями.

Некоторые растения вступают в тесные симбиотические отношения с микроорганизмами почвы. Внедряясь в корневую систему или даже наземные ткани растений, они питаются там органическими соединениями, синтезированными растением-хозяином. В свою очередь, растения получают от микробов-симбионтов ряд необходимых им веществ. Симбиоз бобовых растений с азотфиксирующими бактериями рода *Rhizobiurn* и растений других семейств с актиномицетами рода *Frankia*.

Установлено также, что корневая система подавляющего большинства наземных растений образует с грибами так называемую микоризу, которая несомненно имеет симбиотический характер.

Сложный комплекс, образованный корнями растений и грибом – **микориза**.

Установлено, что наличие и отсутствие микориз, а также особенности их строения зависят преимущественно от систематического положения растения-хозяина. У высших споровых растений не имеют микориз спорофиты плаунов и хвощей.

Голосеменные все микотрофны. Среди покрытосеменных не имеют микориз осоковые, ситниковые, крестоцветные, маковые, гвоздичные, большинство гречишных и маревые. Бобовые растения, находящиеся в симбиозе с бактериями, имеют микоризу. Водные растения не имеют микоризы.

Внешний вид и внутренняя структура микориз могут сильно варьировать. Различают **эктофитную, эндотрофную и переходную** микоризы. Между этими типами микориз могут быть всевозможные варианты.

Самый распространенный - **эндотрофный** тип микоризы. Он свойствен травянистой растительности, многим деревьям и кустарникам. При формировании эндотрофной микоризы мицелий гриба распространяется не только между клетками коровой паренхимы, но и внедряется в них. Клетки коровой паренхимы остаются жизнеспособными и переваривают внедрившийся в них мицелий. Особенно заметен этот процесс в клетках, расположенных более глубоко. Он напоминает явление фагоцитоза. Под влиянием содержимого клетки внутриклеточный мицелий иногда образует клубки, а нередко древовидные разветвления или вздутое окончания, не исключена возможность, что спорангии в некоторых случаях представляют собой лизирующиеся арbusкулы.

У корней с эндотрофной микоризой часть мицелиальных окончаний выходит в почву. Такие гифы называются эмиссионными. Они не так густы и не образуют грибного чехла, как при эктотрофной микоризе. Поэтому корневые волоски у растений с эндотрофной микоризой обычно сохраняются.

**Эктотрофная микориза** свойственна главным образом хвойным растениям и «сережко-цветным покрытосеменным», реже встречается у других систематических групп растений. В этом случае корень окутывается достаточно плотным грибным чехлом, от которого во все стороны распространяется густая сеть гиф. Эктотрофная микориза может различаться по цвету мицелиального чехла. Различают микоризу с войлочной поверхностью, волосистую или щетинистую и гладкую.

При эктотрофной микоризе грибные гифы проникают в корень на небольшую глубину, ограничиваясь преимущественно межклетниками эктодермы. Здесь гифы, переплетаясь, образуют густую сеть, названную **гартиговской**. При эктотрофной микоризе плотный грибной чехол часто окутывает корни так, что корневые волоски исчезают, а вода и питательные вещества из почвы поглощаются мицелием гриба.

Наружный слой клеток коры корня подвергается более или менее полному разрушению. Под грибным чехлом находится слой клеток с большим количеством дубильных веществ. Главные окончания корней иммунные к грибу и не образуют микоризы. Рост их в длину продолжается все лето, что дает возможность охватить корнями больший объем почвы. Эктотрофная микориза - однолетнее образование. Структура микоризы может довольно сильно различаться даже у одного и того же растения.

**Микориза переходного типа** совмещает в себе черты, свойственные эктотрофной и эндотрофной микоризам.

Иногда наблюдается **перитрофная микориза**. В данном случае грибы не вступают с растениями в тесную связь. Они поселяются в ризосфере, окутывая корень.

От истинных микориз следуют отличать **псевдомикоризы**, образуемые паразитными грибами. Они лишь внешне напоминают микоризы, но поражают все ткани корня и имеют иную физиологическую основу. Кроме вреда, они ничего растению не приносят. Грибы же микоризообразователи значительно усиливают и улучшают развитие корневой и надземной частей растения.

По отношению к грибам-микоризообразователям высшие растения могут быть разделены на следующие группы.

Облигатно-микотрофные растения, не развивающиеся без гриба.

Растения, улучшающие свой рост и развитие при наличии микоризы. К этой группе относятся многочисленные древесные, кустарниковые и травянистые породы.

Растения, развивающиеся без микоризы, - водные и небольшая группа наземных.

Микоризу у одного и того же растения могут образовать разные грибы, способные к симбиозу с ним. С другой стороны, один и тот же гриб способен давать микоризу с различными растениями. Впрочем, у ряда грибов проявляется известная специфичность. Этим объясняется очень характерный состав шляпочных грибов в различных по составу древесных пород лесах.

Условия, способствующие хорошему росту растений, как правило, улучшают формирование у них микоризы. Благоприятное влияние на образование микоризы оказывают органические и большинство минеральных удобрений. Внесение азотных удобрений подавляет ее формирование.

Исследование распространения микориз в различных ландшафтно-географических зонах показывает, что в тундровых и пустынных фитоценозах симбиотические связи высших растений с грибами заметно ослабевают. В лесной и степной зонах, по данным И. А. Селиванова, микотрофные виды растений преобладают над немикотрофными.

Грибной мицелий, окружающий корень, увеличивает его рабочую поверхность. Поэтому корневой системой растения лучше поглощаются из почвы питательные вещества. Фосфор, например, быстрее ассимилируются корнями растений при наличии у них микоризы. Роль микоризных грибов в фосфорном питании растений подробно изучена Г. С. Муромцевым с сотрудниками. Показано, что фосфор, в основном в форме полифосфатов, со значительной скоростью транспортируется гифами грибов в ткани растений. Гифы микоризных грибов поглощают фосфор из почвы за пределами обедненной этим элементом прикорневой зоны. Они также способны использовать значительно более низкие концентрации фосфора из почвенного раствора, чем корни растений. Очевидно, микоризные грибы могут ассимилировать труднодоступные растениям фосфаты алюминия и железа.

Растения с микоризой более легко поглощают влагу при ее дефиците в почве и поэтому легче переносят засуху. Многие органические соединения могут минерализоваться грибами-микоризообразователями, в результате чего улучшается питание растения. Некоторые грибы-симбионты разрушают гумус. Грибы-микоризообразователи продуцируют биологически активные вещества и благодаря этому могут содействовать росту растений.

Подавляющее большинство грибов-микоризообразователей не могут фиксировать молекулярный азот и как накопители азота никакого значения не имеют. Исключением, по-видимому, являются гриб *Phoma* - симбионт вереска и некоторые симбионты сосны.

Образование микориз возможно, лишь если в почве имеются соответствующие грибы. Обычно в микробном ценозе почвы они есть. Однако в некоторых случаях, например при степном лесоразведении и рекультивации земель, когда в почве отсутствуют грибы-микоризообразователи древесных растений, целесообразно их внесение.

### **3. Эпифитные микроорганизмы растений и хранение урожая.**

Часть микроорганизмов, развивающихся в зоне корней растений, во время их вегетации переходит на надземные органы и продолжает здесь размножаться. Некоторое число микробов заносится на поверхность растений с пылью и насекомыми.

Микроорганизмы, развивающиеся на поверхности растений, получили название **эпифитов, или микробов филлосферы**. Эти микроорганизмы не паразитируют на

растении, а растут за счет нормальных выделений его тканей и имеющихся на его поверхности небольших количеств органических загрязнений.

До 80% общего количества эпифитов составляют клетки *Erwinia herbicola* (*Pseudomonas herbicola*).

По данным М. М. Умарова, в филлосфере фиксируется около 15% молекулярного азота от общего количества азота, связываемого небобовым растением при помощи свободноживущих микроорганизмов. Бацилл и актиномицетов среди эпифитных микроорганизмов мало, чаще встречаются споры разных грибов (*Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* и т. д.).

Существование эпифитных микроорганизмов на здоровом растении в значительной мере связано с климатом. Во влажную погоду их численность возрастает. У тех растений, которые интенсивнее выделяют продукты обмена на поверхность тканей, микрофлора богаче и разнообразнее.

Микроорганизмы находятся также на семенах. Исключение составляют лишь семена, плотно закрытые плодовыми или семенными оболочками, например плоды бобовых культур. В таких случаях до момента раскрытия оболочек семена практически лишены микрофлоры.

Во время уборки и обмолота зерно сильно загрязняется микроорганизмами. Большое значение при этом имеют пыль и почва. Попадая на зерно, они сильно загрязняют зерновую массу микробами. Степень обсеменения различного зерна микроорганизмами неодинакова. Здесь сказываются индивидуальные особенности растения, условия созревания зерна и морфологические его признаки.

Воздействие эпифитных микроорганизмов на растительный организм может быть очень разнообразным в зависимости от окружающих условий. В первые этапы прорастания зерна эпифитные микроорганизмы начинают размножаться и переходят на корни и проросток. При пониженной температуре интенсивнее развиваются более холодаустойчивые микроскопические грибы, среди которых имеются факультативные и obligatные паразиты, в результате чего резко понижается полевая всхожесть зерна.

Эпифитные микроорганизмы, размножаясь на поверхности растений, создают биологический барьер, препятствующий проникновению паразитов в растительные ткани. Большую роль эпифитные микроорганизмы играют при хранении зерна и семян. Развитие на зерне и семенах микроорганизмов, а следовательно, порча этой продукции зависит прежде всего от влажности зерна и температуры окружающей среды.

Отдельные группы микрофлоры начинают развиваться на зерне при разных уровнях влажности. Это зависит от количества связанной воды у различных семян, что определяется их структурой и химическим составом. Микроорганизмы начинают развиваться на зерне, лишь, когда в нем появляется свободная вода, то есть степень увлажнения превышает уровень связанной воды. Степень увлажнения хранящегося зерна зависит от влажности окружающего воздуха.

Развитие микроорганизмов на зерне и семенах зависит также от температуры. При повышенной влажности зерна микроорганизмы размножаются тем быстрее, чем выше температура. Для успешного хранения зерна при более высокой температуре его влажность необходимо снизить.

Активное развитие микроорганизмов в зерновой массе различных культур при одной и той же степени увлажнения начинается в разные сроки. Пшеница, рожь, ячмень,

горох, бобы и гречиха более устойчивы. В просе, кукурузе и подсолнечнике микроорганизмы развиваются быстрее и интенсивнее.

При подмокании зерна свойственная ему эпифитная микрофлора быстро исчезает. Начинают развиваться разные плесени, преимущественно представители родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Из бактерий на зерне сначала обильно размножаются микроплаки, полностью вытесняющие *Erwinia herbicola*, позднее появляются разнообразные неспороносные палочки, а при повышенной температуре - бациллы (*Bacillus mesentericus*, *Bac. subtilis* и др.).

Зерновые массы имеют низкую теплопроводность и поэтому хорошо аккумулируют тепло. Наряду с микроорганизмами тепло выделяется вследствие дыхания зерна, развития насекомых и т. п. Глубоко зашедший процесс разогревания зерна приводит к повышению его температуры до 60°C. Зерно при этом нередко приобретает темную окраску - «обугливается», так как в нем образуются темноокрашенные соединения меланоидной природы.

Сохранность урожая овощей и плодов, имеющих большую влажность, определяется их иммунитетом и созданием внешней среды, предупреждающей развитие микроорганизмов на их поверхности.

#### **4. Развитие на растениях токсигенных грибов**

К биологически активным веществам, вырабатываемым некоторыми группами микроорганизмов, следует отнести токсины. Токсины вырабатываются как патогенными микроорганизмами, так и некоторыми сапрофитными. Существуют токсины, связанные с протоплазмой микроорганизмов, другие же выделяются микробами во внешнюю среду.

При развитии на злаках или на кормах некоторых грибов накапливаются ядовитые продукты, вызывающие иногда тяжелые отравления, - **микотоксикозы**.

Примером микотоксикоза может служить **эргоизм** - болезнь человека и животных, возникающая при потреблении зерна, зараженного спорыней (сумчатый гриб *Claviceps purpurea*). Гриб поражает растения в поле. При этом в колосках злаков образуются склероции гриба (режки). Токсичное свойство режков объясняется присутствием в них ряда алкалоидов — эргокристина и его изомеров, эргобазина и близких к нему соединений. Из режков спорыни получаютенные фармацевтические препараты, но примесь ее к зерну вредна. Эрготизм протекает различно. В основном поражается пищеварительный тракт, что сочетается с расстройством нервной системы.

Гриб рода *Claviceps paspali* поселяется на травах рода *Paspalum*, образуя на их колосках шаровидные склероции, содержащие токсические вещества. Отравление, вызываемое грибом у скота, получило название **клавицепстоксикоза**. Наиболее характерный симптом этого заболевания — расстройство координации движения. Профилактика клавицепстоксикоза заключается в недопущении использования корма, если в нем обнаружены склероции. Специфические средства лечения не разработаны.

Тяжелые заболевания людей могут вызвать грибы рода *Fusarium*, развивающиеся на вегетирующих или скошенных злаках. Во влажном климате на злаках может паразитировать ***Fusarium graminearum***. Токсин, накапливаемый этим грибом в зерне, вреден для людей и животных.

Отравления людей наблюдаются при употреблении в пищу несвоевременно убранных, перезимовавших под снегом зерновых культур. На них развивается гриб ***Fusarium sporotrichiella***, образующий сильно токсические соединения. К токсину

чувствительны не только люди, но и многие животные. Отравление больным зерном людей сначала называли септической ангиной, так как оно начиналось с признаков, близких по симптомам к ангине. Позднее этот микотоксикоз стал называться **алиментарно-токсической алейкией** - болезнь сопровождалась склонностью к кровоточивости, резким уменьшением числа лейкоцитов за счет гранулоцитов и другими симптомами алейкии.

Корм, пораженный токсическим грибом **Stachybotrys alternaris**, служит причиной тяжелого заболевания животных. К токсину чувствителен и человек. Данное заболевание называется **стахиботритоксикозом**. При болезни возникают некрозы слизистой оболочки ротовой полости и последующих отделов пищеварительного тракта. Из пищеварительного тракта токсины проникают в нервную систему, вызывая тяжелые поражения мозга.

В случае потребления грубых кормов, на которых развился гриб **Dendrodochium toxicum**, происходит молниеносная гибель лошадей, наступающая при симптомах расстройства сердечно-сосудистой системы и подавления кровообразования. Описанная болезнь носит название **дендрохиотоксикоза**. Химическая природа токсина не установлена.

Отравления животных кормами могут также вызвать грибы на родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Mucor*.

Токсины образуются и другими грибами, развивающимися на кормах, поэтому скармливание заплесневевших кормов недопустимо. Работа с ними также может вызвать заболевание людей, так как споры грибов, содержащие токсические вещества, попадают в полость рта и дыхательные пути и служат причиной остро протекающих заболеваний.

## **1.6 Лекция №6 (2 часа).**

**Тема: «Микробные землеудобрительные препараты и их эффективность. Использование в сельском хозяйстве микробов-антагонистов и микробных метаболитов»**

### **1.6.1 Вопросы лекции:**

1. Биопрепарат ризотрофин на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*
2. Применение препарата *Azotobacter chroococcum* (азотобактерина).
3. Биопрепараты на основе культур цианобактерий.
4. Биопрепараты на основе ассоциативных азотфикссирующих бактерий.
5. Другие микробные землеудобрительные биопрепараты.
6. Микоризация растений
7. Микрофаги-антагонисты и их применение для защиты растений.
8. Применение антибиотиков для защиты растений.
9. Использование микробных препаратов для борьбы с вредными насекомыми.
10. Стимуляция роста растений биологически активными веществами

### **1.6.2 Краткое содержание вопросов:**

- 1. Биопрепарат ризотрофин на основе клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*.**

Вскоре после того, как М. Бейеринк (1888) изолировал клубеньковые бактерии бобовых растений, возникла идея использовать эти бактерии для улучшения образования клубеньков и усиления фиксации атмосферного азота. Впервые препарат клубеньковых бактерий под названием «нитрагин» был приготовлен в 1896 г. в Германии Ф. Ноббе и Л. Гильтнером. В 1907 году в России Л. Т. Будинов начал применять препарат *Rhizobium*, именовавшийся также «нитрагином».

Использование препаратов клубеньковых бактерий для заражения семян бобовых растений совершенно необходимо, когда в данной местности вводятся новые культуры бобовых и в составе флоры нет перекрестно заражающихся с ними растений.

В целесообразности применения инокуляции для новых культур бобовых растений, а также вновь осваиваемых земельных площадей нет сомнения. Значительно труднее решается вопрос о старопахотных, хорошо окультуренных почвах, на которых уже давно возделываются определенные виды бобовых растений. Нужна ли здесь инокуляция и будет ли она себя оправдывать?

В России массовые опыты с инокуляцией разных бобовых культур были проведены Е. Н. Мишустиным и В. В. Бернардом. Результат оказался положительным, и в большинстве случаев инокуляция, дала заметное увеличение урожая.

Объяснить положительное действие заражения бобовых растений культурой *Rhizobium* или *Bradyrhizobium* на освоенных почвах, имеющих в составе своей микрофлоры клубеньковые бактерии можно следующим образом. Во-первых, в природных условиях может происходить перекрестное заражение. В таких случаях клубеньки функционируют неполноценно. Во-вторых, клубеньковые бактерии, имеющиеся в почве, не занятой бобовыми растениями, существуют, как обычные сапрофиты. Поэтому естественное заражение не дает эффективного симбиоза, и здесь хорошо использовать препарат *Rhizobium* или *Bradyrhizobium*.

Поскольку положительное влияние инокуляции распространяется и на корни растений, то после сбора урожая пожнивные остатки более эффективно действуют на последующую культуру севооборота.

Препарат, содержащий клубеньковые бактерии, готовят разными методами. Чаще всего используют торфяной нитрагин - ризоторфин. Он представляет собой стерилизованный  $\gamma$ -облучением низинный торф, к которому добавлены питательные для клубеньковых бактерий вещества. Расфасованную массу выдерживают в термостате. Иногда готовят торфяной препарат, не стерилизуя торф, но вносят в него большое количество клубеньковых бактерий. Препараты для заражения бобовых растений годны лишь ограниченный срок, так как клубеньковые бактерии постепенно погибают. Для каждого бобового растения готовят специальный препарат.

В связи с широким использованием приемов химического пропаривания семян, применением гербицидов, инсектицидов и т. д. возникает вопрос о совместимости химических мер защиты урожая с инокуляцией семян бобовых растений клубеньковыми бактериями. Выявлено, что пропаривание семян не исключает применения культур клубеньковых бактерий. Однако необходимо подбирать соответствующие пропарители и разделять указанные приемы во времени.

Для эффективного симбиоза клубеньковых бактерий и бобовых растений необходимо вести систематическую работу по селекции активных и вирулентных культур

клубеньковых бактерий, а также бобовых растений, обеспечивающих интенсивную деятельность их симбионтов.

## **2. Применение препарата *Azotobacter chroococcum* (азотобактерина).**

Способность *Azotobacter chroococcum* размножаться при соответствующих условиях в ризосфере сельскохозяйственных культур дала основание предполагать, что этот микроорганизм может улучшить азотное питание растений. По предложению академика С. П. Костычева в нашей стране начали применять землеудобрительный препарат, содержащий культуру *Azotobacter chroococcum* - **азотобактерин**.

Позднее, когда выяснилась способность микроорганизма производить биологически активные вещества, его действие на растения стали связывать не только с процессом фиксации азота и улучшением азотного питания, но и с поступлением в растения вырабатываемых микроорганизмом биологически активных соединений.

Важное свойство азотобактера в том, что он вырабатывает фунгистатическое вещество. Обнаруженный антибиотик, по данным Н. И. Придачиной, активен против значительного числа фитопатогенных грибов. Благодаря этому свойству азотобактера при бактеризации в ризосфере угнетается развитие микроскопических грибов, многие из которых задерживают рост растений. Отдельные культуры *Azotobacter* различаются по своим антагонистическим свойствам.

Установлено, однако, что для полевых культур азотобактерин малоэффективен. Лишь в 34% случаев от применения этого препарата получали небольшую прибавку урожая (до 10%). Это связано с тем, что азотобактер может развиваться лишь в хорошо окультуренных почвах.

На неваженных почвах положительное действие азотобактерина возрастает. Этот препарат хорошо влияет на овощные культуры. Здесь бактеризация семян может повысить урожай на 20-30% и, что особенно важно, ускорить его созревание.

Для объяснения эффективности азотобактера прежде всего следует выяснить, может ли азотобактер накопить достаточно азота для развития растения. За счет корневых выделений азотобактер не может усвоить такое количество азота, которое обеспечивало бы высокий урожай растений.

Вместе с тем при определенных условиях азотобактер улучшает рост растений. Объясняется это тем, что азотобактер синтезирует много биологически активных соединений - никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и, возможно, ряд других соединений. Комплекс этих веществ способен стимулировать прорастание семян растений и ускорять их рост в благоприятных условиях среды.

В общем, положительное действие азотобактера легко понять, учитывая физиологические особенности данной бактерии. Она активно размножается лишь в плодородных почвах, обеспеченных органическим веществом, фосфором и влагой.

Известно, что в плодородных почвах имеется спонтанная культура *Azotobacter*. Положительный эффект дополнительного заражения связан с небольшой численностью клеток азотобактера даже в плодородной почве. При бактеризации количество азотобактера сильно возрастает, и это создает благоприятные условия для развития корневой системы растений. Здесь проявляется как стимулирующее влияние ростовых веществ, так и подавление вредной грибной флоры, а также некоторое накопление в почве доступного растениям азота.

В настоящее время азотобактерин используют в основном для оранжерейной и парниковой культуры растений. Препарат азотобактерина обычно готовят, размножая микроорганизм в стерильной почве или низовом торфе, имеющих нейтральную реакцию и высокий процент гумуса. К почве добавляют какой-нибудь источник углерода, доступный азотобактеру. Высеваемые семена смачивают водной суспензией этого препарата. У рассады суспензией можно смачивать корневую систему. Препарат азотобактера не обладает стабильностью и годен для использования в течение ограниченного времени.

### **3. Биопрепараты на основе культур цианобактерий**

Возможность использования цианобактерий для обогащения почвы азотом изучают в ряде стран. Альголизацию широко изучали в зоне субтропиков, преимущественно на рисовых полях. Водоросли влаголюбивы и плохо размножаются на недостаточно влажной почве. В воде рисовых полей цианобактерии могут активно размножаться в течение длительного времени.

Известно до 130 видов синезеленых водорослей, фиксирующих  $N_2$ . Они различаются по некоторым свойствам. Например, для *Cylindrospermum* предпочтительно более слабое освещение, *Aulosira* лучше развивается при интенсивном освещении. Наиболее часто используют для альголизации *Tolyphothrix tenuis*, *Anabaena cylindrica* и *Nostoc linckia*.

Обычно внесение цианобактерий в почву или воду рисовых полей дает хороший эффект. Указанные микроорганизмы накапливают довольно большое количество азота, фиксируя  $N_2$ , производят биологически активные вещества и обогащают почву органическим веществом.

В Индии, Китае и других странах тропической зоны альголизацию применяют довольно широко. Научно-исследовательские учреждения названных стран имеют производственные установки, на которых готовят маточные культуры. Благодаря быстрому размножению за три недели с 1 га бассейна можно получить до 15 т массы цианобактерий. Из указанных водоемов ее поставляют на рисовые поля.

Альголизацию рисовых полей на территории бывшего СССР не применяли по ряду причин. Так, рис здесь удобряют высокими дозами азотных удобрений, обеспечивающих больший эффект, чем цианобактерии. Азотные удобрения к тому же подавляют нитрогеназу микроорганизмов. Кроме того, эти бактерии чувствительны к гербицидам, применяемым в крупных хозяйствах, да и сама альголизация связана с трудоемкими работами.

Для условий южного климата существенный интерес представляет водный папоротник рода *Azolla*. Виды этого растения (*A. caroliniana*, *A. rubra*, *A. filiculoides*, *A. imbricata*) отличаются друг от друга некоторыми свойствами. Обычно представители рода *Azolla* живут в симбиозе с цианобактерией *Anabaena azollae*, фиксирующей атмосферный азот. Эти бактерии быстро размножаются и обогащают рисовые поля азотом.

Для практического применения водный папоротник размножают в небольших водоемах, откуда переносят на залитые водой рисовые поля. С наступлением жаркой погоды, примерно в фазу кущения риса, зеленый ковер размножившегося папоротника отмирает и растительная масса минерализуется. Азолла накапливает за вегетационный период на 1 га около 120 кг азота, часть которого используется в текущем году.

Помимо того, растение образует большое количество органического вещества, удобряющего почву. Иногда азоллу культивируют перед посевом риса в течение трех

недель в чеках, залитых на 3-5 см водой. За этот период масса водоросли достигает 10 т/га и в ней содержится около 20—25 кг азота. Папоротник запахивают, затем сеют рис.

#### **4. Биопрепараты на основе ассоциативных азотфикссирующих бактерий**

Открытие способности ряда азотфикссирующих бактерий к ассоциативному симбиозу с небобовыми растениями обусловило возможность создания биопрепаратов для использования под овощные, технические и зерновые культуры. Впервые ассоциативные азотфикссирующие бактерии, относящиеся к семейству *Azotobacteriaceae* - *Azospirillum brasiliense* и *Azospirillum lipoferum*, были выделены бразильским ученым *И. Доберейнер* из ризосфера травянистых растений тропической зоны, где они часто встречаются. У кукурузы, сорго, риса, сахарного тростника и кормовых растений это обычные компоненты микрофлоры ризосферы.

Азоспириллы находятся на самой поверхности корня и могут даже проникать в его ткани. Тесная связь *Azospirillum* с растениями проявляется в том, что они находятся на стеблях и листьях.

Была изучена возможность использования культур *Azospirillum* для усиления процесса азотфиксации в зоне корня сельскохозяйственных растений. В подавляющем большинстве случаев внесение бактерий дает прибавку урожая в пределах 15-30%. При дозах минерального азота выше 60 кг/га, а также при недостаточном освещении положительного действия азоспирилл не наблюдается.

К настоящему времени выявлено более 200 видов бактерий, обладающих различными уровнями активности азотфиксации. Наиболее распространенные ассоциативные азотфикссирующие бактерии, живущие в ризосфере, ризоплане и гистосфере, принадлежат к родам: *Agrobacterium*, *Arthro-bacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* и др.

На основе отобранных штаммов бактерий в НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН создан ряд биопрепаратов для инокуляции семян и другого посадочного материала многих небобоных растений.

**Агрофил** - создан на основе штамма, относящегося к роду *Agrobacterium* (*A. radiobacter*). Биопрепарат находит широкое применение при выращивании овощей в условиях закрытого грунта. Повышает устойчивость к инфекционным заболеваниям и увеличивает урожайность огурцов, томатов, перца, моркови, капусты, салата и других овощных культур. Препарат хорошо действует при обработке корневой системы клубники, кабачка, малины, яблони, облепихи и других годных и плодовых культур. Улучшает всхожесть семян, стимулирует рост и развитие растений, повышает их устойчивость к корневым гнилям, ускоряет созревание урожая на 7-10 дней.

В условиях закрытого грунта прибавки урожая овощей составляют 2-4 кг/м<sup>2</sup>. В открытом грунте он обеспечивает прибавку урожайности на 20-50 ц/га в зависимости от культуры, сорта, почвенно-климатических условий.

**Агрофор** - создан на основе штамма, относящегося к роду *Agrobacterium* (*A. radiobacter*). Применяется для ускорения детоксикации пестицидов в тепличных грунтах и в почве.

**АЗОРИЗИН** (диазобактерин) и аналогичные им препараты созданы на основе штаммов, относящихся к роду *Azospirillum*. Азоспириллы эффективны при внесении в посевы пшеницы, ячменя, риса, сорго, кормовых злаков и других культур.

**Биоплант-К** - создан на основе штамма бактерий рода *Klebsiella* (*K. planticola*). Рекомендован в качестве бактериального удобрения под овощные культуры. Бактерии обладают высокой азотфикссирующей активностью, способны к синтезу ростовых веществ и проявляют фунгистатическое действие по отношению к фитопатогенным грибам: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor* и др.

**Мизорин** - создан на основе штамма, относящегося к роду *Arthrobacter* (*A. mysorens*). Обработка препаратом увеличивает всхожесть семян, стимулирует рост и повышает устойчивость растений к корневым гнилям и грибным болезням.

**Миколин** - создан на основе штамма, относящегося к роду *Bacillus*, (*B. cereus* var. *muscoïdes*). Бактерии хорошо приживаются в ризосфере капусты и картофеля, проявляя стимулирующее действие на их рост. Особенность используемых бактерий - устойчивость к высоким концентрациям аммиака в почве.

**Ризоагрин** - создан на основе штамма, относящегося к роду *Agro-bacterium* (*A. radiobacter*). Бактерии хорошо приживаются в ризосфере пшеницы, риса, ряда кормовых злаков и других сельскохозяйственных растений. При использовании этого бактериального препарата урожайность пшеницы повышается на 2-5 ц/га, при увеличении содержания белка на 0,5-1,0%.

**Ризоэнтерин** — создан на основе штамма, относящегося к роду *Enterobacter* (*E. aerogenes*). Представляет собой порошковидный торфяной субстрат, обогащенный питательными веществами с влажностью 15-50%. Применяется для повышения урожайности риса, озимой пшеницы и ржи.

**Флавобактерин** создан на основе штамма, относящегося к роду *Flavobacterium* sp. Отличительной особенностью препарата является его широкий спектр действия.

На основе представителей рода *Pseudomonas* создан ряд перспективных препаратов, имеющих широкий спектр действия. К их числу относятся псевдобактерин-2 (*P. aureofaciens* BS 1393) и псевдобактерин-3 (*P. putida* BS 1398). Эффект за счет способности бактерий синтезировать некоторые антибиотические вещества и сидерофоры, связывающие железо и переводящие его в недоступное состояние. Выявлена эффективность против септориоза, бурой ржавчины, твердой головни пшеницы и других болезней. Штаммы продуцируют фитогормоны, которые стимулируют рост растений и переводят труднорастворимые неорганические соединения фосфора в доступные для поглощения корневой системой.

За последние годы во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии была разработана новая группа биопрепаратов комплексного действия - **экстрасол**, являющаяся частью устойчивого биоорганического земледелия. В состав биопрепаратов экстрасол входят следующие представители почвенных и ризосферных бактерий: *Arthrobacter mysorens* K, *Flavobacterium* sp., L20, *Agrobacterium radiobacter* 204, *Azotomnas agilis* 12, *Bacillus subtilis* 4-13, *Pseudomonas fluorescens* 2137, *Azospirillum lipoferum* 137. Для изготовления препаратов указанной серии используют индивидуальные штаммы или несколько видов применительно для данного вида или сорта растения. Выпускается экстрасол в трех модификациях: экстрасол-90 - фунгицидного действия, экстрасол-09 - стимулирующего действия и экс-трасол-55 - фунгицидно-стимулирующего действия.

Указанные выше биопрепараты безвредны для человека, животных и насекомых, не оказывают какого-либо вредного воздействия на окружающую среду.

## 5. Другие микробные землеудобительные биопрепараты

Для практического использования предложен бактериальный землеудобрительный препарат **фосфоробактерин**. Действующим началом в нем служит *Bacillus megaterium*, способная разрушать фосфорорганические соединения и переводить их в доступную для растений форму. *B. megaterium* легко образует споры, которые после размножения культуры смешивают с инертным наполнителем. В жизнеспособном состоянии споры могут сохраняться длительное время.

Фосфоробактерин наносят на семена перед посевом. Предполагается, что в почве бактерии переходят на развивающуюся корневую систему растений. Здесь их размножение и биохимическая деятельность вызывают разложение органических соединений фосфора, что улучшает питание растений.

Препарат оказывает положительное влияние на рост растений и увеличивает урожай примерно на 10%. Эффективность фосфоробактерина на почвах, удобренных суперфосфатом, не снижается.

Установлено, что фосфоробактерин усиливает рост корневой системы растений, так как *B. megaterium* вырабатывает биологически активные вещества, которые усиливают рост растений на первых этапах развития.

Для высвобождения калия из алюмосиликатов в целях улучшения питания растений В. Г. Александров предложил использовать препарат «силикатных» бактерий, который представляет собой спорообразующую культуру - *Bacillus mucilaginosus* var *siliceus*.

**Препарат АМБ** предложен Н. М. Лазаревым для активации биодинамики окультуриваемых почв северной зоны. Готовят препарат на месте использования из измельченного низинного торфа или торфяной почвы. На 1 т торфа прибавляют 100 кг мелко раздробленного известняка, 2 кг фосфоритной муки и 1 кг маточной культуры. Полученный компост увлажняют и выдерживают в теплом помещении при температуре около 20°C в течение трех недель, периодически перелопачивая. На 1 га вносят 0,5 т компоста. В состав маточной закваски препарата АМБ входит большой комплекс микроорганизмов. Препарат целесообразнее применять в защищенном грунте.

**Бактогумин** - отселекционированный биопрепарат микроорганизмов комплексного действия. Биопрепарат предназначен для изготовления биологически активных грунтов, используемых для выращивания овощных и цветочных культур в теплицах.

**Бамил** - биоудобрение из отходов животноводческих комплексов. Содержит значительное количество органического азота, фосфора, широкий набор микроэлементов. Основной исходный компонент - высушенная микробная биомасса, полученная при переработке животноводческих отходов. Бамил наиболее эффективен на овощных культах в закрытом грунте, где он повышает урожай на 40-60%.

**Биотрон** - комплексный биопрепарат почвенных микроорганизмов, применяемый под овощные и плодовые культуры.

**Е-2001** - комплексный биопрепарат почвенных бактерий, применяемый под овощные культуры.

## 6. Микоризация растений

В некоторых случаях существенное значение имеет **микоризация растений**. На полевых сельскохозяйственных культурах нормальная микрофлора обычно формируется без специальной инокуляции.

Сложно обстоит дело с микоризацией сеянцев и саженцев древесных пород. В лесной зоне грибы-симбионты деревьев широко распространены в почве. Однако на юге, где лесная растительность встречается редко, ее нет.

*Г. Н. Высоцкий, А. В. Бараней* и другие пришли к заключению, что при посадке леса на черноземах, темно-каштановых и других южных почвах следует вносить почву, содержащую грибы-микоризообразователи.

Одновременное внесение органических и минеральных удобрений, особенно фосфорных, значительно улучшает развитие микоризы и рост растений. Микоризация, несомненно, полезна при рекультивации земель, так как создаваемый поверхностный слой обычно беден микроорганизмами. В таких случаях микоризация нужна как для древесной, так и травянистой растительности. В Великобритании хорошие результаты получены при микоризации посевов клевера ползучего (белого), высеваемого на бедных фосфором горных торфяных почвах.

Искусственное культивирование грибов-микоризообразователей не удается, поэтому из них нельзя готовить соответствующие препараты. В целом вопрос о микоризе растений, в том числе культурных, изучен пока недостаточно. В будущем, вероятно, будут выявлены наиболее продуктивные симбионты многих других культурных высших растений для использования в сельском хозяйстве.

## **7. Микробы-антагонисты и их применение для защиты растений.**

Растения обладают целой системой защиты от фитопатогенных микроорганизмов. Большое значение в фитоиммунитете принадлежит ряду химических соединений, входящих в состав растений. Значительными защитными свойствами обладают фитонцидные вещества и фитоалексины. Тем не менее, болезни растений широко распространены и причиняют существенный вред. Для борьбы с ними используют химические средства, а также биологические методы. Кроме того, важное значение имеет проведение профилактических мероприятий, так как некоторые патогенные микроорганизмы способны жить на растительных остатках в почве довольно долго.

Освобождению почвы от фитопатогенных организмов способствует усиление размножения в ней микробов-антагонистов возбудителей тех или иных заболеваний.

Установлено, что возделывание некоторых растений (клевер, вика и т. д.) способствует освобождению почвы от сибиреязвенной бациллы, другие растения (житняк, картофель) благоприятствуют размножению этого микроорганизма.

Таким образом, в принципе возможна борьба с болезнестворными микробами, находящимися в почве, введением в севооборот тех или иных растений, однако для широкого практического применения этого приема необходима его экспериментальная доработка.

Внимание микробиологов привлекает вопрос использования микробов-антагонистов для лечения растений. На грибах-паразитах нередко паразитируют другие грибы. Так, на мучнисторосляных грибах паразитирует пикнидиальный гриб *Cicinnobolus cesati*; на возбудителе буровой ржавчины пшеницы (*Puccinia triticina*) пикнидиальный гриб *Darluca filum*.

Хороший эффект дает использование культур микробов-антагонистов для обработки семян, зараженных фитопатогенами, или для внесения на поверхность вегетирующих растений, а также в зараженную почву. Микроб-антагонист, уничтожая вредителя, не причиняет вреда растению-хозяину.

Исследования в этом направлении были начаты в СССР Я. П. Худяковым (1935), который выделил бактерии рода *Pseudomonas*, лизирующие мицелий фитопатогенных грибов *Sclerotinia* и *Botrytis*. Эти микробы-антагонисты успешно использовали для борьбы с фузариозом пшеницы, льна. Культурой *Pseudomonas* бактеризовали семена растений. Оздоровлению саженцев сосны способствовало применение Н. А. Красильниковым микробиологических бактерий при борьбе с фузариозом.

Успешно борясь с мучнистой росой крыжовника, вызываемой грибом *Sphaerotheca morsuvaе*, позволяет опрыскивание растений настоем навоза. В составе эпифитной микрофлоры находятся бактерии-антагонисты, которые после опрыскивания начинают размножаться.

Микробов-антагонистов, вероятно, можно использовать не только против возбудителей болезней растений, но и против растений-паразитов культурных растений. Так, положительные результаты были получены при борьбе с заразихой арбузов (*Orobanche aegyptiaca*) с использованием патогенного для заразихи гриба *Fusarium ooganches*.

Не исключена возможность подбора микробных культур, действующих в качестве гербицидов на определенные группы сорных растений.

Некоторые культуры грибов-антагонистов применяют в борьбе с почвенной инфекцией. Установлено, что грибы рода *Trichoderma* выделяют токсические вещества, поражающие микробов-фитопаразитов.

Микробы-антагонисты не только угнетают фитопаразитов в зоне корня, но и вырабатываемые ими антибиотики проникают в ткани растений, что повышает устойчивость последних к возбудителям болезней.

Кратко остановимся на технике использования микробов-антагонистов. Для обеззараживания семян их опрыскивают культурой микроорганизма, разведенной в воде. Стерилизуется не только поверхность семени, но и зона корня, куда переходят микроорганизмы и начинают там размножаться.

При высадке рассады и саженцев их корни смачивают взвесью в воде соответствующих микробов-антагонистов.

Препараты, предназначенные для борьбы с почвенной инфекцией, вносят в почву при посеве.

Сейчас широко используют микробиологический метод борьбы с грызунами. При борьбе с грызунами размноженную культуру бактерий наносят на хлеб или на ней замешивают тесто. Приманки раскладывают в наиболее посещаемых грызунами местах. Бактериальный метод борьбы с грызунами дешев и имеет преимущество перед химическим.

## **8. Применение антибиотиков для защиты растений.**

В последнее время внимание исследователей привлекает использование для борьбы с некоторыми болезнями растений антибиотических веществ, имеющих ряд преимуществ по сравнению с химическими. Химические препараты вредно действуют не только на фитопаразитов, но и на высшие растения, и микрофлору почвы. Антибиотики обладают селективным действием - убивают вредителя, а на растительный организм не влияют или в некоторых случаях оказывают стимулирующий эффект. Однако вещества, токсически действующие на растения, могут быть и среди антибиотиков, но их не следует использовать в защите растений.

Применение в сельском хозяйстве антибиотиков медицинского назначения может содействовать появлению резистентных форм патогенных для человека и животных микроорганизмов. Поэтому микробиологами была проведена большая работа по изысканию антибиотических препаратов, специально предназначенных для использования в растениеводстве.

В России готовят препарат трихотецин из культуры гриба *Trichothecium roseum*. Этот препарат хорошо действует против корневых гнилей пшеницы и ячменя, а в теплицах - против мучнистой росы огурца. Фитобактериомицин (ФБМ), продуцентом которого является *Streptomyces lavandula*. - обработка семян фасоли и сои в борьбе с бактериозами; семян пшеницы - против корневых гнилей. Триходермин, продуцент *Trichoderma lignorum*, используют для борьбы с вилтом хлопчатника.

Представляет интерес отечественный препарат гризин - продуцент *Streptomyces griseus*, - эффективный в борьбе с рядом грибных и бактериальных болезней растений. Он обладает также стимулирующим действием на растения.

За рубежом используют валидомицин — (продуцент *S. hygroscopicus*), — специфично активный против фитопатогенных грибов рода *Rhizoctonia*, вызывающих увядание листового влагалища риса. Данный антибиотик применяют также при борьбе с черной паршой и коричневой гнилью картофеля.

Сейчас для борьбы с пирикуляриозом используют касугомицин (касумин), который получают из культуры *S. casugaeensis*. Он убивает ряд грибов, поражающих овощные, технические культуры и плодовые насаждения, безвреден для людей и животных.

Против увядания листового влагалища риса, альтернариоза груши и яблони в Японии применяют и антибиотик полиоксин.

Помимо отмеченных для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами за рубежом выпускают и другие антибиотики, продуцентами которых служат преимущественно актиномицеты и грибы.

## **9. Использование микробных биопрепаратов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных культур**

Насекомые тоже болеют - это известно давно. Еще Аристотель (IV в. до н. э.) описал болезнь пчел. Итальянский ученый *A. Баси* в 30-х гг. XIX в. обнаружил болезнь тутового шелкопряда, возбудителем которой был гриб, названный им *Botrytis paradoxa*. Басси выяснил способ переноса инфекции и условия, способствующие заражению шелкопряда, что позволило рекомендовать средства борьбы с данной болезнью.

Несколько позднее И. И. Мечников, работая в Пастеровском институте, также столкнулся с бактериальными заболеваниями насекомых. Он считал возможным практическое использование паразитов насекомых и писал, что на них следует возлагать большие надежды для защиты растений. В 1892 г. сотрудник Пастеровского института *И. М. Красильщик* из больных личинок хлебного жука выделил две энтомопатогенные бактерии - *Bacillus tracheites sivegraphitosis* и *B. septicus insectorum*.

Целесообразность микробиологического метода заключается в том, что энтомопаразиты вызывают заболевание какой-то узкой группы насекомых-вредителей. Для человека и других представителей ценоза используемый микроорганизм безопасен.

Кроме того, болезни насекомых принимают характер эпизоотии и широко распространяются. Химические же средства защиты растений действуют локально и нередко загрязняют окружающую среду.

В первой половине XX в. культуры патогенных для насекомых бактерий стали применять на практике и в ряде случаев получили хорошие результаты. Особенно больших успехов добился сотрудник Пастеровского института С. Метальников в борьбе с вредителями некоторых сельскохозяйственных культур. Высокая эффективность биопрепараторов Метальникова, очевидно, объясняется тем, что в их состав входит культура *Bacillus thuringiensis*, выделенная в 1915 г. немецким ученым *E. Берлинером*. К токсину, образуемому данной бактерией, чувствительны многие чешуекрылые.

**Бактерии.** Описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая часть принадлежит к семействам *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae* и *Bacillaceae*.

Большинство промышленных штаммов бактерий принадлежит к роду *Bacillus*, основная часть широко распространенных биопрепараторов изготовлена из *Bacillus thuringiensis*. Представители этого вида токсичны для бабочек, жуков и двукрылых. Штаммы *B. thuringiensis* используются для борьбы с гусеницами, комарами и мошкой. Промышленный вид - *Bacillus popilliae* - используется для борьбы с японским хрущиком. *Bacillus sphaericus*, характеризуется высокой патогенностью и применяется для борьбы с комарами.

В настоящее время в мире выпускается более 50 биопрепараторов, используемых для борьбы со 160 видами насекомых. При этом более 30 биопрепараторов производится на основе *B. thuringiensis*. Такое повышенное внимание к данному организму объясняется его высокой инсектицидностью.

Характеристики и назначения основных инсектицидных биопрепараторов, разработанных в нашей стране. Для борьбы с вредными насекомыми в России выпускаются следующие биопрепараторы:

- битоксибациллин, дендробациллин, лепидоцид, бацикон - для контроля численности вредных видов насекомых, которые заменяют многие химические инсектициды;
- бактокулицид - для подавления численности личинок кровососущих комаров в водоемах;
- бактороденцид - бактериальный препарат для контроля численности мелких мышевидных грызунов - вредителей на посевах, складах, овощехранилищах;
- актинин - актиномицетный препарат, предназначенный для борьбы с паутинным клещом в закрытом грунте.

Применение препаратов позволяет сохранить нецелевые объекты (рыб, полезных насекомых, энтомофагов, опылителей). Они безопасны для человека и теплокровных животных, способствуют уменьшению пестицидной нагрузки на природу и человека, оберегают ландшафты, водные ресурсы, обеспечивают получение экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

**Битоксибациллин (БТБ).** Микробный биопрепаратор на основе *B. thuringiensis* (H-1) subsp. *thuringiensis* широко используется в СНГ в качестве биологического средства защиты растений от вредных насекомых и в первую очередь против колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) и совок (*Noctuidae*).

**Бацикол.** Новое бактериальное средство борьбы с вредными жуками на основе *B. thuringiensis*. Выпускается в режиме опытного производства. Высокоспецифическое средство, безопасное для нецелевых объектов. Эффективен против колорадского жука, крестоцветных блошек, пьявицы. Перспективен в качестве защиты капусты от крестоцветных блошек.

**Бактокулицид.** Высокоэффективное бактериальное ларвицидное средство борьбы с кровососущими комарами, мошками, рисовым комариком непосредственно в водоемах. Основным достоинством препарата является избирательность инсектицидного действия. Он специфически действует на личинок комаров, мошек, рисового комарика и не оказывает отрицательного действия на другие группы насекомых.

**Актинин** - экологически чистый акарицидный препарат. Он безвреден для акарифагов, энтомофагов, пчел. Безопасен для человека и теплокровных животных. Не фитотоксичен. Использование актинина позволит сократить масштабы химических обработок.

**Бактороденцид.** Микробный препарат на основе *Salmonella enteriditis* var. *Issatschenko* широко используется для борьбы с мышевидными грызунами. Человек и домашние животные невосприимчивы к данному микроорганизму.

За рубежом выпускается целый ряд микробных биопрепаратов инсектицидного действия, созданных главным образом на основе *B. thuringiensis*. Следует подчеркнуть, что в целом применение биопрепаратов защитного действия не дороже химических, а зачастую и дешевле.

**Грибы.** Известно более 400 видов грибов, поражающих насекомых и клещей, в том числе вредителей сельского хозяйства. Больше всего полезных для человека видов имеется среди дейтеромицетов и фикомицетов. Грибы обычно заражают насекомых путем прямой инвазии и, следовательно, способны вредить своим хозяевам, не будучи ими съеденными. Кроме того, один из основных признаков грибов - их способность спорулировать в мертвом теле хозяина. Таким образом, они могут распространяться в популяции, вызывая эпизоотии. Они губят те особи, на которых поселяется и контролируют численность всей популяции хозяина в течение длительного периода. К сожалению, эффективность грибов в достаточной степени зависит от влажности и температуры. Если влажность или температура сильно отличаются от оптимального значения, угнетение вредителей будет слабым и желаемая эпизоотия вряд ли начнется.

По этой причине некоторые из ныне существующих промышленных биоинсектицидов на основе грибов нацелены против тепличных и оранжерейных вредителей, поражающих внесезонные овощи и цветы. Ряд грибов уже сейчас широко используется либо исследуется. В частности, применяется *Metarrhisium anisopliae*. Это наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный около 100 лет назад как зеленый мускатный гриб. Он был также первым грибом, который стали производить в промышленных масштабах. Используя отростки, проникающие через эпидермис, грибы образуют субэпидермальную бляшку, из которой прорастают гифы. Пораженное насекомое погибает, а гриб спорулирует на его останках. *M. anisopliae* поражает разные группы насекомых.

Уже много лет в нашей стране используется гриб *Beauveria bassiana* в виде промышленного биопрепарата **боверина**. Его применяют против колорадского жука, также против других видов вредителей сельскохозяйственных растений.

**Entomophthora thaxteriana.** На основе этого гриба создан препарат энтомофторин. Он особенно эффективен против тлей в условиях теплиц и оранжерей.

**Verticillium lecanii.** На основе этого энтомопатогенного гриба успешно выпускаются промышленные биопрепараты. Они в условиях оранжерей могут контролировать численность тлей и алайродид.

**Вирусы.** Описано свыше 1200 вирусных болезней насекомых, причем три четверти из них приходится на болезни чешуекрылых. Основное внимание было обращено на одну группу вирусов-возбудителей болезней насекомых, это - бакуловирусы. В этой группе отсутствовали вирусы, патогенные для позвоночных.

Бакуловирусы - двухцепочечные ДНК-вирусы, среди которых биопестициды образуются в трех группах: вирусы ядерного полиэдроза, вирусы гранулез и фильтрующиеся вирусы. Они заражают насекомых, будучи съеденными; восприимчивость многих видов насекомых варьирует. Эффективность вирусных препаратов определяется временем и частотой применения, дозой, методом и скоростью обработки.

#### **10. Стимуляция роста растений биологически активными веществами**

Вещества, влияющие на рост растений, вырабатывают многие сапротрофные и паразитические микроорганизмы. По химической природе эти соединения весьма разнообразны, но в основном представлены безазотными и сравнительно низкомолекулярными веществами. Вырабатываемые микроорганизмами регуляторы роста можно разделить на следующие четыре группы. Первая группа — **гиббереллины**. Они были выделены в 1926 г. Е. Курасовой из гриба *Gibberella fujikuroi*, поражающего рис и вызывающего его гигантский рост. Гиббереллоподобные вещества найдены и у растений. Они стимулируют рост и цветение, выход из состояния покоя и т. д.

Вторая группа — **ауксины**. Открыты Ф. Кеглем. Они имеются у растений и микроорганизмов и влияют на рост клеток в фазе растяжения, на дифференцировку ксилемы и закладку корней, цветение и т. д.

Третья группа — **кинини**. Это вещества, стимулирующие клеточное деление и влияющие на другие ростовые процессы.

Четвертая группа — **биогенные ингибиторы**. Это сложные вещества, обладающие способностью подавлять активность ауксинов и тормозить рост растений. Они входят в систему, управляющую покоем семян и почек. В группу относят вещества, задерживающие прорастание картофеля и корнеплодов сахарной свеклы при хранении, а также этилен и абсцисовую кислоту.

Биологически активные вещества широко применяют в сельскохозяйственной практике. Большинство из них получают химическими методами, за исключением гиббереллина, который вырабатывается лишь микробиологическим путем.

Гиббереллины обладают поразительно высокой физиологической активностью. Они наиболее сильно стимулируют рост стеблей, побегов, листьев, плодов, в меньшей степени — рост корней. Рост стеблей и побегов происходит вследствие удлинения междуузлий или увеличения их числа. Под влиянием гиббереллинов увеличивается урожай вегетативной массы растений, ускоряется цветение и плодоношение.

Применение гиббереллинов дает хороший результат на виноградниках. Опрыскивание соцветий бессемянных сортов приводит к значительному увеличению размеров ягод и гроздей.

Из фитогормонов, вырабатываемых почвенными микроорганизмами, в том числе находящимися в ризосфере, следует упомянуть ауксины, представителем которых может служить гетероауксин, или  $\beta$ -индолилуксусная кислота.

Гетероауксин применяют для улучшения образования корней у черенков плодовых и ягодных культур и более быстрого укоренения. Получают это соединение химическим путем.

## **1.7 Лекция №7 (2 часа).**

**Тема: «Препараты микробного происхождения, используемые в сельском хозяйстве»**

### **1.7.1 Вопросы лекции:**

1. Биотехнология в животноводстве
2. Биотехнология в растениеводстве
3. Биопестициды, биогербициды и биоудобрения

### **1.7.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Биотехнология в животноводстве.**

Животноводство во всем мире дает основные продукты питания. В промышленно развитых странах для получения продуктов животноводства используются интенсивные технологии. Продуктивность животных зависит от их породы, условий содержания и ряда других факторов. На ранних этапах развития животноводства у животных выявляли полезные свойства и пытались закрепить их у потомства. Благодаря обычной селекции и разведению получены высокопродуктивные породы сельскохозяйственных животных. Дальнейшее увеличение продуктивности с помощью традиционных приемов часто не дает желаемых результатов. Селективное разведение, особенно крупных животных, трудоемкий и медленный процесс, поскольку они имеют длинный период генерации. В связи с этим получение желаемых фенотипических изменений может растянуться на много лет, поэтому постоянно продолжается поиск других путей получения животных с нужными свойствами. Разработка методов технологии рекомбинантных ДНК и ее применение к программам разведения животных может значительно увеличить скорость и расширить возможности селективного разведения.

Ветеринарные препараты. Биопрепараты – средства биологического происхождения, применяемые в медицине и ветеринарии для диагностики, профилактики и лечения неинфекционных, инфекционных и паразитарных болезней человека и животных. Важным направлением биотехнологии стала разработка биопрепаратов, их производство и применение. Возбудители инфекционных болезней вызывают заболевание всех видов сельскохозяйственных животных и рас- тений. Если количество больных животных будет уменьшено или болезнь ликвидирована, то возрастет производство сельскохозяйственной продукции. Кроме того, биопрепараты необходимы также для домашних и диких животных. Одним из видов биопрепаратов являются вакцины. Их производят с применением различных технологий и используют для создания у животных активного иммунитета. В настоящее время разработаны вакцины против многих инфекционных болезней животных. Обычно их применяют с профилактической (вакцинопрофилактика) и реже лечебной (вакцинотерапия) целями.

Наиболее широко применяется вакцинопрофилактика против бактериальных (сибирская язва, бруцеллез, рожа свиней, сальмонеллезы и др.) и вирусных (бешенство, классическая чума свиней, чума плотоядных, ящур и др.) болезней. Ведется интенсивная разработка вакцин против инфекционных болезней животных с применением генноинженерных методов на основе мутантов и рекомбинантов возбудителей и ДНК-вакцин. Это еще 29 раз подчеркивает важную роль биотехнологии в борьбе с инфекционными болезнями сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Методы

диагностики. Кроме классических вирусологических, серологических и иммунологических методов, в настоящее время применяются несколько новых, предложенных биотехнологией, методов, а именно: иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др. Эти методы революционизируют многие аспекты анализа и дают возможность проводить определение *in situ* без применения сложных процедур выделения анализируемого вещества. Кроме того, они легче поддаются автоматизации и более быстро выполняются. Для успешного применения методы должны быть быстрыми, точными и надежными; простыми в выполнении и дешевыми; использовать готовые и стабильные реагенты; требовать небольших затрат труда; иметь высокую чувствительность и специфичность. Обычно эти требования очень трудно совместить. Многие из методов уже применяются или проходят испытание с целью обнаружения возбудителей болезней растений и животных, а также мониторинга физиологического состояния животных. Почти во всех случаях они были разработаны вначале для использования в медицине и очень быстро нашли применение в ветеринарии. Одновременно с этим увеличивается их применение в растениеводстве. ИФА в комплексе с поликлональными и особенно МАт широко используется не только для диагностики, но и для выявления нежелательных примесей в продуктах питания. Метод зондов нуклеиновых кислот основан на принципе гибридизации комплементарных последовательностей ДНК или РНК, ПЦР – на амплификации ДНК. Использование этих методов диагностики позволяет обнаруживать инфекционные заболевания на очень ранней стадии заражения, например путем анализа физиологических жидкостей, что дает возможность выявлять заболевание еще до проявления клинических признаков. Ранняя диагностика значительно облегчает ликвидацию того или иного заболевания. Многие болезни животных можно легко контролировать путем использования наборов (китов) ветеринаром или даже фермером. Широкое применение наборы находят при определении 30 половых гормонов (таких как прогестерон, эстрогенсульфат, тестостерон и др.), гормона роста и антибиотиков в молоке и крови животных. В настоящее время выпускаются сотни наименований таких наборов.

## **2. Биотехнология в растениеводстве.**

С помощью генетической инженерии ставится задача не только улучшить те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционной селекции, но и получить растения, способные производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях деятельности человека. Этими соединениями могут быть, например, особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, «съедобные» вакцины, антитела, интерфероны и другие "лекарственные" белки, новые полимеры, не загрязняющие окружающую среду, и многое другое. Использование трансгенных растений позволяет наладить масштабное и дешевое производство таких веществ и тем самым сделать их более доступными для широкого потребления. По общему мнению, применение методов клеточной и генетической инженерии в сельском хозяйстве позволит улучшить свойства культурных растений

## **3. Биопестициды, биогербициды и биоудобрения.**

**Биопестициды.** Использование химических пестицидов привело к заметному увеличению уровня производства продуктов сельского хозяйства. Их широкое применение привело к тому, что один человек может в настоящее время производить

больше продуктов с меньшими затратами, чем раньше. Однако потребители все больше беспокоятся о качестве продуктов и возможном сохранении остатков пестицидов в готовых пищевых продуктах. Биотехнологи в настоящее время интенсивно ищут замену химическим веществам, с помощью которых можно было бы бороться с вредителями и болезнями. Очевидным подходом является использование существующих в природе биологических методов борьбы. Известно, что все организмы болеют характерными только для них специфическими болезнями, а также имеют хищников, врагов, которые их уничтожают. В данном контексте, биологические методы борьбы связаны с использованием микроорганизмов, применением их в полевых условиях для борьбы с вредителями и болезнями. Кроме того, насекомые-хищники также могут быть использованы для этих целей. Наиболее успешным агентом биоконтроля считается *Bacillus thuringiensis*, которая является спорообразующей бактерией, содержащей кристаллические белковые включения. Её белки очень токсичны для насекомых-вредителей и специфичны в проявлении их активости. Они уже более 30 лет широко используются против насекомых, которые имеют в своем цикле размножения стадию гусеницы. *B. thuringiensis* обычно применяется в виде спор или кристаллических включений, полученных после её разрушения. В настоящее время ген, кодирующий токсин, выделен и секвенирован. Токсин производится и применяется в виде рекомбинантного белка. Ген может быть также включен в различные виды растений. Таким образом, можно использовать готовые микробные белки (биопестициды) или защищать растения путем встраивания гена, кодирующего токсичный белок, который экспрессируется в ткани растения. Большое число компаний в настоящее время включилось в исследования, разработку и производство токсина *B. thuringiensis*. Кроме него на рынке постепенно появляется ряд новых грибковых и вирусных пестицидов. В природе распространены многочисленные виды энтомопатогенных грибков, поражающих широкий круг насекомых, используя различные механизмы, включая контактный, что облегчает их применение. Грибковые биопестициды имеют ряд преимуществ перед бактериальными. Применение вирусов в качестве биопестицидов ограничено из-за сложности получения их в необходимых количествах. Для решения этой проблемы необходимы развитие технологии клеточных культур насекомых, отбор и модификация штаммов вирусов.

Микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые могут использоваться в качестве биологических агентов при борьбе с насекомыми-вредителями, должны отвечать следующим требованиям: действовать не хуже чем химические пестициды; быть безопасными, иметь низкую токсичность для других видов животных, не являющихся мишениями; быть стабильными при хранении и дешевыми при их массовом производстве; применяться с помощью обычной технологии без значительных изменений методов, обычно используемых в сельском хозяйстве. Имея указанные выше характеристики, микроорганизмы найдут постоянный рынок сбыта.

**Биогербициды.** Гербициды – химические препараты, предназначенные для борьбы с сорняками, составляют около 50 % суммарного рынка химикатов для сельского хозяйства. Им свойственны те же недостатки, что и пестицидам. Поэтому необходимость в создании биогербицидов очевидна. Их можно получить на основе микроорганизмов-патогенов растений, ферментов, а также полупродуктов, получаемых биоконверсией. Для борьбы с отдельными видами сорняков, устойчивых к химическим препаратам,

применяют специфические и токсичные для них микроорганизмы. Наиболее часто используют грибковые фитопатогены и фитотоксины. Для расширения сферы их применения необходимо получение грибковых форм, более устойчивых по отношению к изменяющимся условиям внешней среды. Бактериальные фитопатогены, в отличие от грибковых, менее чувствительны к факторам внешней среды, но и в меньшей степени поражают растения. Последние разработки в данном направлении обещают значительные перспективы. Кроме биопестицидов и биогербицидов, для защиты растений все шире применяют биологические препараты для борьбы с возбудителями заболеваний. В целом масштабы применения различных препаратов для борьбы с вредителями и возбудителями болезней сельскохозяйственных культур все более расширяются. 36 Биодобрения. Интенсивное растениеводство обедняет почву азотом, так как значительная его доля ежегодно выносится из нее вместе с урожаем. С древних времен для восстановления и улучшения почв существует практика использования бобовых растений, способных в симбиозе с азотфиксирующими микроорганизмами восполнять почвенные запасы азота в результате диазотрофности. Большой положительный эффект от возделывания бобовых побудил ученых к изучению этого процесса. Как только была выяснена роль симбиотических бактерий рода *Rhizobium* в азотфиксации, стали разрабатывать способы внесения этих микроорганизмов в почву и применять для инокуляции семян. Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы после выращивания на ней бобовых растений. Азотфиксющие микроорганизмы имеют специфический фермент нитрогеназу, в активном центре которой происходит активирование инертной молекулы N<sub>2</sub> и превращение её в NH<sub>3</sub>: N<sub>2</sub> + 8 H<sup>+</sup> + 8 e<sup>-</sup> + n ATP → 2 NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub> + n ADP + n F. В качестве носителя для бактерий были опробованы различные композиции: смеси торфа с почвой, добавки люцерны и соломы, перегнившие опилки, бентонит и активированный уголь. Бактерии рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами и обладают высокой продуктивностью азотфиксации. Помимо связывания атмосферного азота эти бактерии производят биологически активные соединения (витамины, гиббереллин, гетероауксин и др.). В результате этого инокуляция азотобактерином стимулирует прорастание семян и ускоряет рост и развитие растений. Более того, *Azotobacter* способен производить фунгицидные вещества. Этим угнетается развитие в ризосфере растений микроскопических грибов, многие из которых тормозят развитие растений. Однако бактерии рода *Azotobacter* весьма требовательны к условиям среды, особенно концентрации в почве фосфатов и микроэлементов, и активно развиваются только в плодородных почвах. В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики. Обнаружены плазиды, несущие гены азотфиксации, относительно легко передающиеся при конъюгации от одного штамма бактерии к другому. После этого появились надежды на получение методами клеточной и генетической инженерии растений, способных фиксировать атмосферный азот. Однако перенос генов азотфиксации и их экспрессия – чрезвычайно сложная задача. Основными трудностями являются неизученность регуляции взаимосвязи генов фиксации азота с генами, ответственными за синтез переносчиков электронов и кофакторов, необходимых для функционирования нитрогеназы; необходимость проведения интенсивных исследований генетики растений с целью подбора эффективных растений-хозяев, а также исследований, направленных на модификацию генома микроорганизмов для получения

организмов, способных существовать в симбиозе не только с бобовыми растениями, но и, например, хлебными злаками. Снабжение растений фосфатами. Фосфатные ионы в почве, как известно, не очень подвижны, поэтому вокруг корневой зоны растений часто возникает дефицит фосфора. Везикулярно-арбускулярная (ВА) микориза играет существенную роль в плодородии почвы, так как способствует поглощению растениями фосфатов из почвы. Эндо- и экзомикоризы представляют собой особые структуры, формирующиеся внутри или вокруг мелких корешков растений в результате заражения почвенными непатогенными грибами. Благодаря этой микоризе рост растений на бедных фосфатами почвах улучшается. Одновременно с поступлением фосфатов растения также обогащаются микроэлементами. Доказано, что в растениях с микоризой концентрация гормонов роста выше, чем в ее отсутствии. Если ВА-микориза формируется в присутствии азотфиксацией бактерий, у бобовых усиливается процесс образования клубеньков и азотфиксация. Для размножения эндофитов в почве нужна их инокуляция. Однако размножение грибов происходит только в присутствии растения-хозяина. Для получения положительного эффекта необходимо вносить 2–3 тонны инокулята на 1 гектар. Получать такие количества инокулята ВА-микоризы пока не представляется возможным. Для улучшения питания сельскохозяйственных культур фосфатами эффективен метод применения фосфобактерина. Препарат получают на основе спор культуры *Bacillus megaterium* (var. *phosphaticum*). Эти бактерии превращают трудно усвояемые минеральные фосфаты и фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды) в доступную для растения форму. Следует отметить, что фосфобактерин не заменяет фосфорные удобрения и не действует без них. При его наличии урожайность сельскохозяйственных культур повышается на 10 %. Для защиты растений на основе бактерии *Pseudomonas fluorescens* получен препарат «Р-2-79», подавляющий развитие свыше 40 видов микроорганизмов, поражающих пшеницу, ячмень, рожь. С помощью этого препарата проводят защиту семян сорго и кукурузы от антрактоза и ризоктониоза, хлопчатника и сои – от вилта и ряда других заболеваний. Для борьбы с фитофторозом яблонь предложено применение почвенной бактерии *Enterobacter aerogenes*. Защита многих овощных культур от заболеваний, вызываемых некоторыми видами микроскопических грибов, обеспечивается использованием препарата на основе культур *Trichoderma polysporum* и *T. viride*.

## **1.8 Лекция №8 (2 часа).**

**Тема: «Использование продуктов микробного синтеза для кормления животных. Синтез кормового белка и аминокислот. Синтез микроорганизмами витаминов и ферментов»**

### **1.8.1 Вопросы лекции:**

1. Синтез кормового белка и аминокислот
2. Синтез витаминов и ферментов микроорганизмами

### **1.8.2 Краткое содержание вопросов:**

Корма, содержащие недостаточно протеина, незаменимых аминокислот и витаминов, неэффективны и невыгодны. В условиях интенсивного ведения хозяйства важно не только обеспечить достаточное производство кормов, но и получать корма с высоким содержанием белка и сбалансированные по аминокислотному составу.

### **1. Синтез кормового белка и аминокислот**

Белковый и аминокислотный обмен различны у жвачных и нежвачных животных. У последних желудок однокамерный, и микроорганизмы желудочно-кишечного тракта проявляют активность в кишечнике. Существенные синтетические процессы микробиологического характера в желудке нежвачных животных не протекают. Под влиянием желудочного сока здесь из белков корма образуются аминокислоты и осуществляется реакция переаминирования. Однако такие незаменимые аминокислоты, как лизин, треонин, аргинин, в результате переаминирования не синтезируются вовсе или синтезируются в таком малом количестве, что не имеют практического значения. Поэтому для нежвачных животных перечисленные аминокислоты в необходимых количествах должны присутствовать в пищевом рационе.

Жвачные животные менее требовательны к полноценности белков корма, так как обитающая в их преджелудках богатая микрофлора синтезирует даже из простых, содержащих азот веществ все аминокислоты. Микроорганизмы синтезируют белок в своих клетках, после отмирания которых аминокислоты освобождаются и становятся достоянием животного-хозяина.

Указанная особенность жвачных животных позволяет для частичного восполнения дефицита белков использовать в их рационе содержащие азот простые химические вещества - мочевину и соли аммония. В рубце жвачных животных микроорганизмы синтезируют в больших количествах глутамин, глутаминовую кислоту, глицин и валин. Последние транспортируются в печень для синтеза других аминокислот.

В существующих кормовых рационах далеко не всегда достаточно белка, необходимых аминокислот и витаминов. Поэтому необходимо вводить эти вещества в корм. Внимание ученых привлекает вопрос получения кормового белка путем микробного синтеза.

Вследствие быстрого размножения продуктивность микроорганизмов по сравнению с высшими организмами несопоставимо велика.

Освоено производство кормовых дрожжей на отходах спиртовой, сахарной промышленности, а также на целлюлозных гидролизатах. Использование в этих целях целлюлозных гидролизатов началось в нашей стране в 1935 г.

Позднее, в шестидесятых годах, французский ученый *A. Шампань* с сотрудниками разработал метод выращивания дрожжей на средах, содержащих дизельное топливо. Однако получаемая масса нуждалась в очистке, что требовало больших затрат. В России в середине шестидесятых годов XX в. дрожжи начали выращивать на очищенных жидких углеводородах. Ставится вопрос о получении кормового белка на материалах, более дешевых, чем жидкие парафины.

Большое внимание в нашей стране и за рубежом уделяют получению белка с помощью автотрофных водородных бактерий. Используя окисление водорода как энергетический процесс, в качестве источников питания они довольствуются лишь минеральными соединениями. Следует отметить, что по некоторым химическим показателям дрожжевой белок имеет некоторые преимущества по сравнению с бактериальным. Разрабатываются

методы получения кормового белка из различных отходов. Одни методы пригодны для промышленного получения белка, другие - в условиях небольших хозяйств.

Возможным сырьем для получения микробного белка представляются различные целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства. Для обогащения белком измельченных целлюлозных отходов целесообразнее использовать культуры микроскопических грибов, которые активно разрушают целлюлозу, одновременно накапливая белок.

На молочной сыворотке с успехом размножается базидиальный съедобный гриб *Panus tigrinus*. Выращенный и измельченный мицелий гриба содержит около 45% сырого белка, близкого по составу к животным белкам.

Институт микробиологии и вирусологии Казахстана рекомендует в качестве белковой добавки к бедным кормам кормовые дрожжи *Candida*, выращенные на разваренной зерновой дерти, муке или других субстратах. Перед использованием дрожжевую массу прогревают для разрушения дрожжевых клеток, что повышает их усвояемость. Кормовые дрожжи следует готовить в местах их потребления, а не на заводах.

Перерабатывать на корм можно многие пищевые и промышленные отходы и даже навоз. Изучался вопрос об использовании в качестве корма микроводорослей. Проведенные работы не дали высокого эффекта и практически прекращены, что в значительной степени связано со слабой усвояемостью животными ценных компонентов клеток водорослей.

Тем не менее, в некоторых случаях водорослевые препараты дают положительный эффект. Так, в Институте микробиологии Узбекистана использовали жидкие препараты водорослей рода *Chlorella*. В культуральной жидкости водоросли содержится небольшое количество белка, но присутствует ряд биологически активных соединений. Там же ведутся работы с цианобактерией рода *Spirulina*, которая обитает в водоемах Африки. Местные жители используют ее для кормления скота.

Многие микроорганизмы пригодны для получения на их основе незаменимых кормовых аминокислот и витаминов. Только правильное сочетание всех компонентов корма дает наилучший результат, а недостаток хотя бы одного из них снижает эффективность остальных.

Сбалансированное питание в ряде случаев упрощает и удешевляет набор ингредиентов, входящих в комбикорм. Например, обогащение кормов витамином В12 позволяет заменять дефицитный и дорогой животный белок растительным. При этом продуктивность животных не снижается.

До Второй мировой войны производства аминокислот не было почти ни в одной стране. Сейчас уже доказана целесообразность использования аминокислот в животноводстве, где их применение обеспечивает огромный экономический эффект. Для кормления животных нет нужды в получении чистых препаратов, достаточно иметь концентраты, производство которых дешевле и проще.

Замечательное свойство многих микроорганизмов — накапливать в среде огромное количество некоторых ценных аминокислот. Объем такого «сверхсинтеза» может быть очень большим. Так, некоторые микроорганизмы на 1 л среды производят до 200 г аспарагиновой кислоты, до 100 - глутаминовой, до 16 г валина. Существуют микроорганизмы, синтезирующие значительные количества L-лизина, L-валина, L-метионина и триптофана.

В России микробиологическим способом получают лизин. Для синтеза L-лизина используют культуру *Brevibacterium sp.*, сырьем служат уксусная кислота, минеральные соли, меласса, кукурузный экстракт и некоторые отходы пищевой промышленности. Лизин выпускают в виде жидкого концентрата, сухого концентрата и кристаллического препарата.

За рубежом микробиологическим способом помимо L-лизина получают L-глутаминовую кислоту, используя культуру *Micrococcus glutaminus* и некоторые бактерии рода *Brevibacterium*. В небольших количествах готовят L-аланин, продуцируют который некоторые актиномицеты, а также бактерии рода *Brevibacterium* и *Corynebacterium*. Возможно получение триптофана с использованием культуры гриба *Candida utilis*.

## 2. Синтез витаминов и ферментов микроорганизмами

Витамины представляют собой низкомолекулярные органические соединения, необходимые для поддержания жизни животных, которые должны получать их с кормом. Отдельные витамины организм животного может синтезировать. Витамины комплекса В и витамин К синтезируются микрофлорой рубца взрослых жвачных животных в достаточном количестве. Животные-копрофаги, например кролики, получают витамины, поедая собственный кал, в котором бактерии накапливают значительное количество витаминов.

Однако в ряде витаминов животные нуждаются, так как в обычном корме их не хватает. Это относится прежде всего к витамину В12, каротину и в некоторой степени к витаминам группы В. Последние особенно требуются для откорма свиней и птицы.

Производство витаминов в промышленном масштабе может быть осуществлено микробиологическим путем. В России производят витамин В12. Синтез этого витамина ведут по методу, разработанному в Институте биохимии им. Баха РАН. В качестве субстрата используют ацетонбутиловую барду - отход бродильной промышленности. Процесс непрерывный, осуществляют его в анаэробных условиях при температуре 50°C. В результате образуется ряд продуктов, в том числе витамин В12 и метан. Сброшенная барда поступает в выпарной аппарат, где сгущается, а затем и сушку и расфасовку.

Предложены и другие методы получения витамина В12, например с использованием пропионовокислых бактерий, которые при сбраживании спиртовой барды в анаэробных условиях образуют значительное количество витамина В12. Существуют разработки, позволяющие в ближайшее время организовать крупномасштабное производство ряда других витаминов.

Так, используя гриб *Eremothecium ashbyi*, можно получать препарат витамина В<sub>2</sub> (рибофлавина). Как субстрат для производства рекомендуется питательная среда из соевой муки, кукурузного экстракта и мелассы. Ферментация идет около трех суток при 28 °C. Культуральная жидкость сгущается в вакуум-аппарате при температуре, не превышающей 80 °C, а затем высушивается на вальцовой сушилке. Идет работа по подбору более дешевой среды из непищевого сырья.

Гриб *Blakeslea trispora* продуцирует провитамин А (β-каротин). Процесс может проходить на гидролизате сои или на отходах пищевой промышленности. Брожение осуществляется в течение трех дней при 25 °C, после чего мицелий гриба сепарируют или отделяют фильтрацией. Затем мицелий сушат в вакууме и расфасовывают. Препарат представляет собой мелкопластинчатую или песчаную массу красного цвета.

Некоторые микроорганизмы (*Streptomyces aurantiacus*), культивируемые на отходах животноводческих ферм или гидролизате древесины, позволяют получить массу, содержащую не только  $\beta$ -каротин, но и витамины группы В и антибиотики.

Не представляет сложности получение витамина D (кальциферол), дефицит которого в кормах сельскохозяйственных животных наблюдается наиболее часто. Основным источником витамина D служат облученные кормовые дрожжи. Готовый препарат представляет собой мелкозернистый порошок светло-желтого цвета. За рубежом кроме отмеченных препаратов производят микробиологическим способом треонин, аланин, идет интенсивная работа по синтезу триптофана.

В России и за рубежом изучают влияние различных ферментных препаратов, добавляемых в корм, на продуктивность сельскохозяйственных животных. Как добавки в корм используют амилазу, глюкоамилазу, липазу, пектиназу, целлюлазу и т. д. Стремятся выяснить возможность производства мультиферментных препаратов для различных видов и возрастных групп животных с учетом особенностей их кормления.

Возможно, ферменты найдут широкое применение при производстве заменителей молока для кормления молодняка (телят, поросят, ягнят). Их можно использовать в ветеринарии при лечении желудочно-кишечных заболеваний и т. д.

## **1.9 Лекция №9 (2 часа).**

**Тема: «Превращение микроорганизмами растительного сырья. Биоконверсия. Микробиологическая трансформация отходов АПК»**

### **1.9.1 Вопросы лекции:**

1. Превращение микроорганизмами растительного сырья. Биоконверсия
2. Сущность микробной деструкции органических субстратов
3. Состав микроорганизмов и их трансформирующая активность при переработке навоза и отходов
4. Возможные биохимические механизмы микробиологической трансформации органических субстратов в регулируемом режиме

### **1.9.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Превращение микроорганизмами растительного сырья. Биоконверсия**

Во второй половине XX в. в мировой экономике остро стал ощущаться дефицит энергии, пищи и сырья для промышленности, возникла угроза загрязнения окружающей среды. Эти явления приняли характер глобальных проблем.

Все больше мысль человека стала обращаться к продуктам биосинтеза как возобновляемому и практически неисчерпаемому источнику энергии, как перспективному сырью для получения продуктов питания и производства различных материальных ценностей. Целью биоконверсии является получение из недефицитного возобновляемого сырья пищевых и кормовых продуктов, жидких и газообразных видов топлива, химических продуктов и медикаментов, а также защита окружающей среды.

Мощные фотосинтезирующие системы компенсированы столь же мощными гидролитическими системами, причем главным образом за счет ферментов микробного

мира. Однако в почве разрушение растительных остатков идет медленно - неделями и месяцами. Другое дело - биоконверсия в реакторах в управляемых условиях.

Под **управляемой биоконверсией растительного сырья** необходимо понимать превращение компонентов растительной массы микробиологическим или ферментативным путем в различные полезные вещества и продукты в регулируемых условиях.

Для биоконверсии углеводов растительного сырья используют различные микроорганизмы - бактерии, актиномицеты, дрожжи и микромицеты. Продукты биоконверсии растительного мира широко применяются в питании человека, в кормлении животных, а также в производстве медикаментов, химикатов, жидких и газообразных видов топлива и др.

Растительное сырье делят на растворимое и нерастворимое. Процессы ферментации наиболее изучены при биоконверсии *растворимых субстратов*. Известно много вариантов ферментационных процессов: глубинная и поверхностная ферментация; аэробная и анаэробная; периодическая и непрерывная; монокультурная и поликультурная; спонтанная; мезофильная и термофильная ферментация и др.

Ферментация *нерастворимых субстратов* также существует в разных вариантах. Так, в сельском хозяйстве практикуют твердофазную ферментацию растительной массы в анаэробных условиях с целью консервирования кормов. Твердофазная ферментация представляет большой интерес при биоконверсии такого нерастворимого растительного сырья, каким является большинство крахмал- и целлюлозосодержащих сельскохозяйственных продуктов и отходов производства.

Важное значение в создании процессов получения нужных целевых продуктов методами биоконверсии имеет выбор растительного сырья. Высоким выходом энергии отличаются травы, а поэтому получение различных продуктов из трав считается весьма перспективным направлением. Говоря о биоконверсии крахмалсодержащего сырья, необходимо отметить возможность получения белка из крахмала путем прямого культивирования на этих субстратах микробов с амилазной активностью, в том числе дрожжей.

### **Применение методов биоконверсии в сельском хозяйстве**

Можно выделить ряд перспективных направлений применения микробной биоконверсии растительного сырья для нужд сельского хозяйства: получение белковых концентратов пищевого и кормового назначения из зеленой массы растений с использованием микробиологических процессов; микробная протеинизация крахмала и целлюлозосодержащего сырья; нетрадиционные пути биоконверсии растительных углеводов в этанол; получение биогаза из отходов ферм и растительных остатков; консервирование кормов продуктами брожения.

Биоконверсия местного сельскохозяйственного сырья - зеленой массы, зерновых, а также отходов их переработки и отходов ферм может оказать существенное влияние на рационализацию сельскохозяйственного производства. Исключительно важное значение имеет микробиологическая обработка грубых кормов, например соломы.

Силосование и сенажирование зеленой массы трав являются в настоящее время широко используемыми на практике методами микробиологического консервирования кормов. Показана целесообразность применения в качестве специальных заквасок микробов, обладающих гидролазной активностью в отношении полисахаридов.

Большой интерес представляют работы по обогащению целлюлозо- и лигнинсодержащего сырья микробным белком.

Биологическим способом можно консервировать не только грубые корма. В мировой практике накоплен опыт консервирования влажного зерна как при помощи химических консервантов, так и путем хранения влажного (до 30%) зерна в герметичных емкостях, например траншеях в атмосфере СО<sub>2</sub>.

Таким образом, в области сельского хозяйства биотехнология позволяет более полно использовать урожай, уменьшить количество побочных отходов и потери.

### **Нетрадиционные пути биоконверсии растительных углеводов в этанол**

Один из путей решения глобальной проблемы биотрансформации продуктов фотосинтеза - получение этанола из растительной массы с помощью микроорганизмов.

• Во-первых, этанол, получаемый из растительной массы (биоэтанол), может использоваться для восполнения энергетических ресурсов. В связи с тем, что запасы природных ископаемых - нефти, угля и газа - истощаются, поиск других источников энергии весьма актуален.

- Во-вторых, для получения этанола используется недефицитное сырье.
- В-третьих, спиртовое брожение - самая старая отрасль биотехнологии - имеет готовые технологические системы и развитую промышленную базу.

#### **Микроорганизмы — продуценты этанола.**

- 1) дрожжи, традиционно применяемые для конверсии углеводов в этанол.
- 2) мезофильные бактерии рода *Zymomonas*, обладающие в несколько раз более интенсивным метаболизмом, чем дрожжи. Характерная черта бактерий рода *Zymomonas* состоит в том, что они способны почти полностью перерабатывать глюкозу или фруктозу в этанол и СО<sub>2</sub>
- 3) термофильные этанолобразующие бактерии, привлекшие внимание главным образом тем, что в этой группе имеются микроорганизмы, способные трансформировать растительные углеводные полимеры непосредственно в этанол.

Считают, что с помощью этой группы микроорганизмов есть возможность создать рентабельную технологию трансформации продуктов фотосинтеза в этанол. Наиболее изученный представитель - *Clostridium thermocellum*. Эти бактерии расщепляют целлюлозу и гемицеллюлозу, растут на целлобиозе, глюкозе, но не используют ксилозу. *C. thermocellum* - самый быстрорастущий микроорганизм, разлагающий целлюлозу, из известных на сегодняшний день.

Для этой группы бактерий характерен гетероферментативный тип брожения, конечными продуктами которого являются этанол, ацетат, лактат, СО<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>.

Весьма перспективным представляется использование для получения этанола из растительных субстратов бактерий, обладающих как целлюлозолитической, так и этанолсинтезирующей активностью. Таковы бактерии *C. thermocellum*. Однако у них есть недостаток - сравнительно невысокий выход этанола и узкий спектр используемых субстратов.

#### **Крахмалсодержащее сырье и возможности его биоконверсии.**

В настоящее время имеется достаточно много хорошо изученных непатогенных микроорганизмов с высокой амилазной активностью (*Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Rhizopus delemar*, *Endomycopsis fibuligera*, *Candida japonica*, *C. albicans*, *Lipomyces starkeyi*, *Bacillus subtilis*, *L. mesentericus*, *B. cereus*, *B. mycoides*, а также термофильные бактерии и актиномицеты). Наиболее часто для получения амилолитических ферментов используются мицелиальные грибы рода *Aspergillus* и дрожжи рода *Endomycopsis*.

Используя методы современной биотехнологии, представляется возможным осуществить биоконверсию крахмалсодержащих субстратов как с целью получения гидролаз полисахаридов, так и для обогащения крахмалсодержащего сырья микробным белком.

В качестве продуцента микробного белка используют главным образом дрожжи, а также бактерии и мицелиальные грибы. Грибы целесообразно использовать для получения белка при переработке гетерогенных субстратов. Использование крахмалсодержащих отходов при получении белка важно в экологическом плане. После переработки картофеля остаются сточные воды, содержащие полисахариды. В Швеции применяется процесс под названием «Симба», сущность которого в том, что на отходах переработки картофеля последовательно выращивают две культуры дрожжей: сначала *Endomycopsis fibuligera*, производящую амилолитические ферменты, которые гидролизуют крахмал до сахаров, а затем *Candida utilis*, использующую сахара. Полученный препарат предназначен в качестве добавки к корму свиней и птиц.

Перспективным является получение микробного белка на крахмалсодержащих средах путем выращивания микромицетов.

**Получение комплексных белково-ферментных препаратом,** Многочисленными исследованиями показано, что добавление гидролитических ферментов в корма, комбикорма и премиксы позволяет увеличить прирост массы животных и птицы в среднем на 10-15%, и снизить затраты корма на 1 кг прироста на 5-7%. Ферментные препараты могут использоваться для улучшения усвояемости грубых кормов, содержащих крахмал и целлюлозу, или могут быть непосредственно включены в кормовой рацион животных и птиц.

Для получения комплексных белково-ферментных препаратом с глюкоамилазной активностью применяют как совместное культивирование, так и выращивание монокультур. Применение в качестве продуцента глюкоамилазы дрожжей *End. fibuligera*, а целлюлазы — *Trichoderma lignorum* на комплексной среде, содержащей солому, пшеничные отруби и муку, выявило, что *End. fibuligera* способна использовать продукты гидролиза соломы, образовавшиеся под действием гриба. При совместном культивировании *End. fibuligera* с грибными, дрожжевыми и бактериальными культурами удается повысить активность ферментной системы-продуцента.

В настоящее время разработан технологический процесс по получения белково-ферментного препарата при культивировании *End. fibuligera* на твердых субстратах (пшеничные отруби и комбикорм).

**Биоконверсия целлюлозо-лигниновых материалов** в белок в настоящее время может быть осуществлена только путем выращивания микроорганизмов на этих материалах в качестве субстратов. Внутриклеточный белок ферментов микробов составляет основную долю целевого белка, но некоторое его количество представлено внеклеточными ферментами. Их микроорганизмы выделяют во внешнюю водную среду, их функция состоит в гидролизе полимеров субстрата до мономерных соединений. Только такие соединения могут быть усвоены микроорганизмами, обладающими целлюлозолитической активностью, а также многими другими видами микроорганизмов.

Биоконверсия с целью получения белка может быть осуществлена только в аэробных условиях. В то же время анаэробные условия дают возможность эффективного получения из

целлюлозы летучих низкомолекулярных восстановленных органических соединений - метанола, органических кислот, метана и т. д.

При биоконверсии с целью получения белка задача состоит в многократной интенсификации процесса деструкции целлюлозолигниновых материалов и создании условий, в которых происходит эффективное увеличение биомассы микроорганизмов.

Биоконверсия целлюлозы сводится к двум основным группам биохимических процессов: гидролизу целлюлозы ферментами и росту клеток на продуктах гидролиза. Оба эти процессы могут быть выполнены одним целлюлозолитическим микроорганизмом – прямая биоконверсия (одностадийная).

Но возможна и непрямая биоконверсия (многостадийная). Здесь, как правило, гидролиз выполняется отдельно от стадии выращивания микроорганизмов, образующих белок. Гидролиз может быть выполнен кислотами, целлюлозным ферментным комплексом, микроорганизмами в анаэробных условиях.

**Биоконверсия лигнина.** Лигнин - аморфные высокомолекулярные соединения ароматической природы, которые можно подразделить на три класса: лигнин древесины хвойных пород; лигнин древесины лиственных пород; лигнин травянистых растений.

Биологическая роль лигнина - приданье механической устойчивости стволам и стеблям растений. Предшественниками лигнина являются ароматические фенилпропановые спирты - кумаровый, конифериловый и синаповый. В растительных клетках лигнин связан с другими биополимерами - целлюлозой и гемицеллюлозой.

**Микроорганизмы, разлагающие лигнин.** До начала 70-х гг. XX в. основное внимание исследователей было уделено базидиальным грибам, вызывающим гниение древесины, которые условно были разделены на 3 группы: возбудители мягкой гнили, бурой гнили и белой гнили.

Показано, что представители родов *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aerobacter* и *Enterobacter* могли использовать лигнин в качестве единственного источника углерода, при этом штамм *Aerobacter sp.* разлагал 98% лигнина в течение 5 суток.

**Практика биоконверсии лигнина.** В решении рассматриваемой проблемы биоконверсии целлюлозолигниновых материалов, биоконверсия и деструкция лигнина может обеспечить делигнификацию субстрата, тем самым интенсифицируя процесс биоконверсии всего материала. Хотя исключительная медленность биодеградации лигнина препятствует практическому использованию этого процесса, уже известны микроорганизмы, которые способны в первую очередь в соломе расщеплять лигнин, тем самым способствуя и биоконверсии целлюлозы. Активными лигнолитическими микроорганизмами являются грибы белой гнили. Деградация лигнина может существенно ускоряться при внесении субстрата, легче поддающегося разложению - глюкозы, этанола, солодового экстракта.

**Биоконверсия соломы. Микроорганизмы, применяемые для биоконверсии.** В практике биологического разложения целлюлозы чаще всего используются различные микромицеты-сапротрофы, в изобилии встречающиеся в почве и на органических остатках. Это представители родов *Chaetomium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia* и др. Для разрушения целлюлозы и биосинтеза целлюлозолитических ферментов чаще всего используются микромицеты

*Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* и *A. terreus*, превращающие нерастворимую целлюлозу в растворимые сахара.

В настоящее время разработаны технические средства твердофазного культивирования, технологические режимы и отобранные культуры (*Trichoderma viride* и *Endomycopsis fibuligera*), способные конвертировать термоотработанную солому в препарат с содержанием белка не менее 12% в течение 5,0-5,5 суток при содержании сухих веществ 20-31% и биологических потерях сухой массы около 30%.

**Получение биогаза из отходов ферм.** Как известно, проблема отходов ферм состоит в том, что навоз как органическое удобрение расходуется только периодически и поэтому накапливается у ферм, где занимает большие площади, загрязняя атмосферу, а порой, находясь в сильно разбавленном виде, просачивается из хранилищ в почву и далее попадает в водоемы, и вновь нанося вред окружающей среде. Навоз, кроме того, является источником возбудителей инфекционных болезней и паразитов.

Практика переработки промышленных, коммунальных и сельскохозяйственных отходов базируется на использовании как аэробных, так и анаэробных микробных процессов. При аэробном процессе разложения органического вещества можно получить микробную биомассу кормового назначения в виде ила.

При анаэробной переработки отходов из органических веществ образуется смесь газов - метан,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  и др. В биогаз во время метанового брожения превращается 30-50% органического вещества. Если процесс брожения проводится в термофильных условиях (при 55-57°C), то одновременно достигается обезвреживание субстрата.

Некоторыми исследователями предлагается метановое брожение сочетать с аэробной ферментацией, чтобы помимо биогаза получать большой выход богатой белком микробной биомассы. Обогащенная соломой бражка метанового брожения навоза подвергается аэробной ферментации при помощи микромицета *Chaetomium cellulolyticum*.

**Микрофлора анаэробного метанового брожения.** Метановое брожение является строго анаэробным процессом и осуществляется сложными микробными ассоциациями. На сегодняшний день известно более 20 видов метанобразующих микроорганизмов, или метаногенов, с различной морфологией: округлые, палочковидные, ланцетовидные, в виде спирали, образующие длинные нити и соединения клеток наподобие сарцин. Их относят к архебактериям (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina* и др.). Все известные метанобразующие организмы могут получать энергию в результате окисления  $\text{H}_2$ , используя в качестве акцептора электронов  $\text{CO}_2$ . В результате  $\text{CO}_2$  восстанавливается до  $\text{CH}_4$ . Представители отдельных родов могут использовать еще два субстрата - метanol и ацетат. Поэтому для того чтобы метаногены могли осуществить терминальный этап анаэробного разложения субстрата, необходима его предварительная подготовка: сложные соединения превратить в простые. Первая стадия метанового брожения – кислотная (*Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*), приводит к образованию летучих органических кислот, формиата, ацетата, пропионата, бутират, молочной и янтарной кислот, низших спиртов, альдегидов и кетонов, а также  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ . Вторая стадия (*Synthrophobacter* и *Synthrophomonas*). Третья стадия – метаногенная – превращение  $\text{H}_2$  и уксусной кислоты в метан:

Основным продуктом первичного брожения в метаненках является ацетат. Из ацетата образуется до 73%  $\text{CH}_4$ . Водородный путь дает до 30% метана.

**Биотехнология метанового брожения.** В биотехнологии получения биогаза из отходов ферм должны учитываться особенности метанового брожения. Большое влияние на метановое брожение оказывают температура, pH, состав среды и наличие в ней ингибиторов, концентрация и размеры твердых частиц, гидродинамические условия в ферментационной среде и другие факторы. Несмотря на сложность метанового брожения, существует еще ряд методов интенсификации процесса.

Проблема переработки и утилизации отходов животноводства исключительно актуальна во многих странах мира.

Решение проблемы загрязнения окружающей среды отходами животноводства должно быть направлено на выполнение двух основных задач: предотвращение и исключение загрязнения окружающей среды; эффективное использование вторично переработанных отходов в сельском хозяйстве.

Подробно изучены отходы промышленности многих видов, разработаны способы и технологии их утилизации путем переработки в полезные продукты. Отходы же сельского хозяйства не нашли достаточного внимания технологов. Почти не внедряется современная технология - микробная конверсия отходов животноводства в аэробных и анаэробных режимах, которая предусматривает не только санитарное состояние территории вокруг животноводческих помещений и птицефабрик, но и получение санкционированного, гумифицированного органического продукта высокой биологической активности, без специфического запаха.

Микробная биотехнология способна вовлечь в производство кормовых препаратов и добавок, огромные массы жидких и плотных отходов АПК растительного и животного происхождения. Существует широкий круг микроорганизмов, способных трансформировать отходы в кормовые препараты с образованием микробной биомассы.

## **2. Сущность микробной деструкции органических субстратов**

Исключительность мира микроорганизмов состоит в том, что, несмотря на малые размеры, их клетки обладают огромной поверхностью по сравнению с объемом и весом, и это определяет теснейшую связь микроорганизмов со средой обитания. В 1 кг живой биомассы кишечной палочки содержатся бактерии, общая площадь поверхности которых составляет  $5000\text{ м}^2$ . Активность дыхания у бактерий и особенно у плесневых грибов значительно выше, чем у высших организмов.

Микробная клетка может рассматриваться как биологическая машина широкого спектра действия, пока недоступная для полного понимания всех механизмов ее функционирования, но по своим возможностям далеко превосходящая все технологические системы, сконструированные человеком в XX веке.

Микробиологическая трансформация не идет в сравнение с другими способами биотрансформации органических соединений. Сфера возможного использования ферментативной активности микроорганизмов для превращения экзогенных веществ практически беспредельна.

Активное отношение микроорганизмов к химическим компонентам субстрата позволяет использовать неосвоенные элементы среды, включать их в сферу своей жизнедеятельности. Результатом атаки микробной клетки необычных для нее веществ, может быть дальнейшая ассимиляция вещества или накопление трансформированного продукта, который, в свою очередь, может быть в дальнейшем с успехом освоен. Широкий спектр ферментных систем, чрезвычайно высокая адаптивность дают

совершенно неожиданный эффект активной жизнедеятельности микроорганизмов в любых субстратах.

Вторичные сельскохозяйственные продукты используемые для твердофазного выращивания микроорганизмов, условно можно разделить на малопитательные, трудноусваиваемые микроорганизмами субстраты, которые в основном играют структурную роль, и высокопитательные добавки, значительно стимулирующие рост микроорганизмов.

Особенность микробиологических трансформаций отходов заключается в том, что большая часть органических субстратов расщепляется под действием нескольких ферментов. Результат - изменение молекулярной структуры трансформируемого субстрата, синтез метаболитов из предшественников, перестройка сложных молекул.

### **3. Состав микроорганизмов и их трансформирующая активность при переработке навоза и отходов**

Природная экосистема является основным поставщиком растительности, органическое вещество которой по химическим характеристикам весьма разнообразно и подвержено постоянным изменениям при использовании на корм животным. В пищеварительном тракте животных, под влиянием микробной минерализации и спонтанных химических реакций, состав органических фракций постоянно изменяется. Причем корм, поедаемый жвачными животными, переваривается иначе, чем животными с однокамерным желудком. Бактерии, населяющие желудок жвачных животных, позволяют им усваивать корма, содержащие целлюлозу. В эти корма входит компонент лигнин, который сопутствует целлюлозе в растениях и который плохо переваривается в рубце животного.

В целом, корм, содержащий эпифитную микрофлору, в пищеварительном тракте животного дополнительно обогащается разнообразными группами микроорганизмов - аэробами и анаэробами, среди которых присутствуют патогенные бактерии. Микроорганизмы, благодаря ферментативным процессам, превращают углеводы в кислые продукты, спирты и газы.

В рубце желудка жвачных животных содержатся анаэробные целлюлозоразрушающие бактерии, осуществляющие распад полимерных углеводов до ацетата, пропионата, бутират, молекулярного водорода и метана, валерианата и формиата - небольшие количества. С этими продуктами в навоз попадают также микроорганизмы, способные сохранять длительное время патогенность.

Токсинообразующие микробы проявляют агрессивность из-за хорошей сохранности токсических белков. Различные патогенные микроорганизмы образуют один, два или более токсинов, которые вызывают летальный исход, дермонекроз, гемолиз и др. Возбудителями заболеваний могут быть гельминты - многоклеточные организмы, во множестве встречающиеся у животных.

В последние годы в инфекционной патологии существенно возросла роль условно патогенных микроорганизмов, проявляющих выраженную устойчивость к большинству известных химиотерапевтических агентов. Особенно это проявляется у животных, поедающих корм при добавлении антибиотиков. В навозе здоровых животных присутствует многообразие «нормальной» микрофлоры, участвующей в анаэробном гидролизе корма.

Стабильность химической активности микроорганизмов зависит от условий их пребывания в субстратах. В навозохранилищах или в биофернентах образуются вещества, часто более токсичные для клетки микроба, чем исходный субстрат. Смешанная же микрофлора начального периода компостирования постепенно селектируется технологическими условиями переработки органических соединений и к завершению процесса остаются наиболее активные и устойчивые микроорганизмы, обладающие защитной реакцией.

*Физиологический смысл* микробиологической трансформации отходов может быть различным в зависимости от вида микроорганизмов и используемого субстрата. Многообразие и полифункциональность ферментных систем микроорганизмов составляют функциональную основу микробиологических превращений разнообразных по химическому составу отходов.

Продукты биотермических превращений отходов могут вступать в дальнейший метаболизм. В результате токсические соединения или инактивируются, или служат селективным средством для определенных таксономических групп микроорганизмов.

Показано, что многие микроорганизмы демонстрируют высокую адаптивность и трансформирующую активность при окислении субстратов. Это является для них естественной функцией. Однако к завершению ферментации отходов спектр микроорганизмов сужается, некоторые вновь синтезированные соединения, по-видимому, не способны использоваться широким кругом микроорганизмов в качестве питательного субстрата.

Кроме того, микроорганизмы способны модифицировать субстрат и накапливать определенные продукты.

Иными словами, *биологический смысл* микробной трансформации отходов заключается в способности микроорганизмов атаковать самые разнообразные органические вещества, выделять тепловую энергию и синтезировать большой набор своеобразных соединений. Среди них маловероятно наличие высокотоксичных веществ, так как незначительные перестройки молекул под действием микроорганизмов полностью снимают токсичность соединений для живых микроорганизмов.

*Биохимической основой* трансформации естественных субстратов микроорганизмами является широкий спектр субстратной специфичности ферментов, которые не позволяют соединениям накапливаться в среде.

#### **4. Возможные биохимические механизмы микробиологической трансформации органических субстратов в регулируемом режиме**

Выяснение механизмов, контролирующих активность микроорганизмов в субстратах, чрезвычайно затруднено, поскольку регуляция метаболизма микробной клетки - очень сложный процесс. В превращениях субстратов одна реакция следует за другой в строжайшей последовательности, так как продукты реакции предыдущей стадии процесса, как правило, являются субстратом для последующей.

Такая четкая преемственность возможна благодаря высокой специфичности ферментов, участвующих в обмене веществ.

Химическая активность микроорганизмов зависит от условий их культивирования. Подобранные и стандартизованные условия выращивания микроорганизмов в субстратах при биоконверсии позволяют с достаточным постоянством получать соответствующий конечный продукт.

Оптимизировать состав субстратов для управления ходом трансформации органических отходов сложно, равно как и получение целевого продукта, поскольку круг микробов-трансформаторов очень широк. Он включает представителей грибов, актиномицетов, бактерий. Поиск же наиболее продуктивного отдельного штамма, трансформирующего органические отходы, - непростая задача. С одной стороны, реакции трансформации практически универсальны в мире микроорганизмов, а с другой - состав экзогенного субстрата широко варьируется и продукты превращения весьма разнообразны.

Безусловно, на основе знаний физиологических особенностей микроорганизма можно предсказать качественный состав целевого продукта в том случае, если контролируются технологические режимы переработки отходов. Добавление же компонентов известного химического состава будет изменять в определенных пределах компостируемый субстрат. Вполне вероятно научное обоснование оптимального режима культивирования микроорганизмов и состав конечных продуктов ферментируемой массы навоза. Особенно при наличии контрольно-измерительных приборов, дополнительных биохимических анализов.

Управление микробной ферментацией отходов может интенсифицировать минерализацию исходного субстрата и активизировать биосинтез новых соединений, предназначенных для использования в качестве органического удобрения, кормовой добавки, бактериальных препаратов.

Газовый режим компостируемой массы отходов животноводства непостоянен. При регулируемом режиме микробной ферментации анализ выходящего воздушного потока выявляет высокое содержание метана, амиака, диоксида углерода, сероводорода и др. Причем динамика их образования связана с температурой ферментируемой массы, скоростью прохождения аэробно-анаэробных фаз и ферментативной активностью. Последнее определяется степенью гидролизуемости субстрата и участием определенных групп микроорганизмов.

Биоценоз ферментируемой массы - высокоспециализированное сообщество гетеротрофных организмов, обладающих устойчивыми и термостабильными цеплюлазами. Особенно высоким уровнем минерализационной активности обладают микроорганизмы во второй фазе - термофильной.

Следовательно, в контролируемых условиях микробной ферментации отходов биохимические процессы трансформации органических веществ тесно связаны с температурой, влажностью и ферментативной активностью исходного сырья. Микроорганизмы, вовлекаемые в процесс ферментации, весьма разнообразны в начальной фазе; спектр их во второй фазе - значительно сужается.

## **1.10 Лекция №10 (2 часа).**

**Тема: «Микробиология твердых отходов. Анаэробная и аэробная очистка сточных вод. Микроорганизмы – биологические индикаторы»**

### **1.10.1 Вопросы лекции:**

1. Аэробные процессы биохимической очистки сточных вод.
2. Анаэробная микробиологическая очистка сточных вод
3. Использование микроорганизмов в качестве индикаторов загрязнения окружающей среды.

### **1.10.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Аэробные процессы биохимической очистки сточных вод.**

Существуют две большие группы аэробных процессов биоочистки: экстенсивные и интенсивные. К **экстенсивным** относятся методы, непосредственно не связанные с управляемым культивированием микроорганизмов: поля орошения, поля фильтрации, биопруды. Микроорганизмы, находящиеся в верхних слоях почвы полей орошения и фильтрации или в воде биопрудов, образуют ценозы, за счет деятельности которых и происходит очистка воды.

В основе интенсивных способов лежит деятельность активного ила или биопленки, формирующейся на каждом конкретном производстве в зависимости от состава сточных вод и выбранного режима очистки. Формирование биоценоза - процесс достаточно длительный и идущий постоянно в ходе очистки сточной воды в промышленных аппаратах: аэротенках, биофильтрах.

Активный ил представляет собой темно-коричневые хлопья размером до нескольких сотен микрометров; микроскопия показала, что он состоит на 70% из живых организмов и около 30% составляют твердые частицы неорганической природы.

Живые организмы вместе с твердым носителем образуют *зооглей* - симбиоз популяций организмов, покрытый общей слизистой оболочкой.

Микроорганизмы, выделенные из активного ила, относятся к различным родам: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Desulfotomaculum*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina* и др. Наиболее многочисленны бактерии рода *Pseudomonas*. Они окисляют спирты, жирные кислоты, парафины, ароматические углеводороды, углеводы и др. Широко представлены в активном иле и бактерии родов *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*, которые осуществляют деградацию нефти, парафинов, нафтенов, фенолов, альдегидов и жирных кислот. Алифатические углеводороды окисляются представителями рода *Bacillus*. Окислительная способность перечисленных микроорганизмов для различных органических соединений различна, и лишь для бактерий рода *Pseudomonas* она практически одинакова для разных видов загрязнений.

В зависимости от внешней среды та или иная группа бактерий может оказаться преобладающей, а остальные становятся спутниками основной группы. При изменении состава сточной воды может увеличиться численность одного из видов микроорганизмов, однако другие культуры, проигрывающие в конкурентной борьбе за субстрат, все равно остаются в составе биоценоза. На взаимоотношения микроорганизмов ила влияют и продукты биосинтеза различных групп: возможен не только симбиоз или антагонизм микроорганизмов, но также и взаимодействие их по принципу комменсализма или

нейтрализма. На формирование ценозов активного ила могут оказывать влияние сезонные колебания температуры, обеспеченность кислородом и присутствие в сточных водах минеральных компонентов.

Роль всех этих параметров при формировании активного ила делает процесс достаточно сложным и практически не воспроизводимым: даже для стоков, имеющих одинаковый состав, но возникающих в разных регионах, невозможно получить одинаковые биоценозы активного ила. Существенная роль в создании и функционировании консорциума клеток принадлежит простейшим.

Функции простейших: регуляция видового и возрастного состава микроорганизмов в активном иле. Поглощая большое количество бактерий, простейшие способствуют выходу значительного количества бактериальных экзоферментов, которые могут концентрироваться в слизистой оболочке и принимать участие в деструкции загрязнений. В активных илах встречаются разнообразные простейшие: саркодовые (*Sarcodina*); жгутиковые (*Mastigophora*); ресничные инфузории (*Ciliata*); сосущие инфузории (*Suctoria*).

Одна инфузория пропускает через свой организм от 20 до 40 тыс. бактерий за сутки. Поедание старых ослабленных форм облегчает размножение оставшихся и приводит к появлению большого количества молодых, биологически активных форм. При хорошей работе очистных сооружений представители класса саркодовых развиваются в активных илах в незначительных количествах.

В активных илах высокого качества на 1 млн клеток бактерий должно быть 10-25 клеток *Protozoa*. Это соотношение называется *коэффициентом протозойности Кр.* Простейшие очень чувствительны к присутствию в сточных водах небольших концентраций фенола и формальдегида, которые в незначительных концентрациях угнетают их развитие.

В активном иле идентифицированы бактерии множества различных видов, но, как правило, их определение до вида не представляет большого интереса. Следует выделить **три основные группы: флокулообразующие бактерии, органотрофные нитчатые бактерии, бактерии-нитрификаторы.**

**Флокулообразователи** необходимы для деградации органических веществ и образования стабильных флокул, которые осаждаются с образованием плотного ила в отстойнике.

**Нитрификаторы** превращают аммонийный азот в нитраты. Они необходимы, если процесс направлен на получение выходных стоков с низкой концентрацией аммонийного азота

**Нитчатые** бактерии представляют собой до некоторой степени аномалию. С одной стороны, известно, что они образуют скелет, вокруг которого формируются флокулы, с другой - являются источником двух проблем - плохого осаждения и образования устойчивой пены.

Простейшие потребляют бактерии и обеспечивают низкую мутность выходных стоков. Всего было идентифицировано около 200 видов простейших, но именно инфузории, в частности круглоресничные, такие как *Vorticella* и *Opercularia*, имеют наибольшее значение. Применительно к илу термин «активный» означает, что биомасса:

- представляет собой микрофлору, содержащую все ферментативные системы, необходимые для деградации загрязнений, которые следует удалить;

- имеет поверхность с сильной адсорбционной способностью
- способна образовывать стабильные флокулы, которые легко осаждаются при отстаивании.

Несколько иную картину представляет биоценоз, возникающий на биофильтрах. На поверхности загрузочного материала биофильтра происходит образование биологической пленки. В отличие от биоценоза активного ила, количественный видовой состав которого практически одинаков во всей системе очистки, на разных уровнях биофильтра создаются свои ценозы микроорганизмов, которые порой резко отличаются не только качественным, но и количественным составом. Это вызвано тем, что по мере прохождения сточной воды через биофильтр за счет жизнедеятельности предыдущего ценоза меняется характеристика органических загрязнений воды, попадающей на следующий уровень. При этом сначала потребляются более легкоусвояемые загрязнения. В свою очередь, сточная вода обогащается продуктами жизнедеятельности этого ценоза. По мере дальнейшего продвижения воды происходит потребление все более трудноусвояемых компонентов смеси и развиваются другие организмы, которые функционируют за счет потребления части биопленки, оторвавшейся с поверхности носителя. Созданный таким образом биоценоз способен практически полностью извлечь из сточной воды все органические примеси.

Эффективного управления процессом биологической очистки можно достичь лишь при правильном подборе параметров процесса, обеспечивающих необходимую полноту извлечения загрязнений. Основные параметры, влияющие на биологическую очистку, таковы: температура, pH, количество растворенного кислорода, уровень перемешивания, концентрация и возраст циркулирующего в очистных системах активного ила, наличие в воде токсичных соединений.

**Техника аэробных способов очистки** сточной воды основана на использовании системы аэротенков. Аэротенк - открытое железобетонное сооружение, через которое пропускается сточная вода, содержащая органические загрязнения и активный ил.

Суспензия ила в сточной воде на протяжении всего времени нахождения в аэротенке подвергается аэрации воздухом. В зависимости от способа смешения суспензии активного ила с очищаемой водой и гидродинамического режима движения суспензии активного ила аэротенки делятся на: аэротенк-вытеснитель, аэротенк-смеситель и аэротенк сложного типа.

В *аэротенке-вытеснителе* свежая порция активного ила и очищаемая вода одновременно подаются в аппарат и далее происходит движение суспензии по аппарату в режиме, приближающемся к идеальному вытеснению.

В *аэротенке-смесителе* активный ил и очищаемая сточная вода поступают по всей длине аппарата одновременно и в аппарате создается режим, близкий к полному смешению, одновременно из аппарата отводится суспензия активного ила. В аппаратах *сложного типа* на разных этапах очистки одновременно реализуется и режим смешения, и режим вытеснения.

Различия в гидродинамических режимах аэротенков в первую очередь влияют на физиологическое состояние популяции микроорганизмов, скорость и глубину потребления субстрата. Развитие популяции микроорганизмов в аэротенке-вытеснителе происходит по законам турбулентной культуры. Развитие микроорганизмов определяется законами периодического роста. Поступивший из вторичного отстойника активный ил имеет

определенный исходный состав популяции: вначале развиваются микроорганизмы, которые потребляют наиболее легкоусвояемые компоненты загрязнения. Концентрация загрязнений в сточной воде по мере ее продвижения по аппарату снижается и одновременно в активном иле увеличивается концентрация соответствующих клеток. При достижении концентраций легкоусвояемого компонента, лимитирующих рост, начинают потребляться другие типы субстратов и преимущество в развитии получают другие группы микроорганизмов. При снижении концентраций всех компонентов сточной воды до минимальных, процесс развития популяции останавливается: видовой и количественный состав активного ила возвращается к начальному состоянию.

В аэротенке-смесителе сточная вода практически мгновенно распределяется по объему, при этом концентрация загрязнений снижается до стационарных значений. Развитие популяции бактерий происходит так же, как и развитие микробов в хемостате.

В аэротенках сложного типа сочетаются оба способа проведения процесса.

**Стадии** аэробной биологической очистки: усреднение и осветление сточных вод от механических примесей; аэробная биологическая очистка осветленных сточных вод; доочистка сточных вод; обработка осадков.

На практике применяются одноступенчатые и многоступенчатые системы биологической очистки. Сточные воды поступают в усреднитель, где происходит интенсивное перемешивание стоков с различным качественным и количественным составом. Перемешивание осуществляется за счет барботажа воздуха. При очистке фекальных стоков и отходов нефтепереработки необходимым элементом очистных сооружений является система механической очистки - песколовки и первичные отстойники.

Система биологической очистки: аэротенк, вторичный отстойник, регенератор активного ила.

Очищенная вода и активный ил из аэротенка подаются во **вторичный отстойник**, где происходит отделение активного ила от воды. Часть активного ила вновь возвращается в систему очистки, а избыточный активный ил, образовавшийся в результате роста микробов, поступает на иловые площадки с последующим вывозом его после обезвоживания на поля.

Система более полной биологической доочистки может состоять из множества элементов, которые определяются дальнейшим назначением сточной воды. Возможно применение **биологических прудов**, где биологически очищенная вода проходит дальнейшее осветление и насыщается кислородом.

Интенсификацию процессов биологической очистки можно проводить путем аэрации суспензии активного ила чистым  $O_2$ . Для этого были разработаны аппараты закрытого типа - окситенки с принудительной аэрацией сточной воды.

**Очистка сточной воды с использованием биофильтров.** В отличие от аэротенков в биофильтрах клетки микроорганизмов находятся в неподвижном состоянии, так как прикреплены к поверхности пористого носителя. Очищаемая вода контактирует с неподвижным носителем, на котором иммобилизованы клетки, и за счет их жизнедеятельности происходит снижение концентрации загрязнителя.

Преимущество применения биофильтров состоит в том, что формирование конкретного биоценоза приводит к практически полному удалению всех органических примесей. В качестве загружаемого твердого материала можно использовать керамику, щебень, гравий, керамзит, металлические и полимерные материалы с высокой пористостью. Существенным признаком конструкции является и режим аэрации воды, по которому все

биофильтры можно разделить на: аппараты с принудительной циркуляцией и аппараты с естественной циркуляцией.

Технологические схемы с использованием биофильтров мало отличаются от схем очистки с применением аэротенков.

Принцип вытеснения жидкости с одновременной фиксацией клеток микроорганизмов в иммобилизованном состоянииложен и в основу работы аэротенков-вытеснителей с применением *стеклоерши*. Стеклоерши погружают в аэриированную сточную воду, и на их поверхности происходит накопление биоценоза активного ила, который развивается на каждом участке ершей неодинаково и изменяется в объеме как количественно, так и качественно.

**Экстенсивные способы очистки сточных вод.** Несмотря на очевидную необходимость создания интенсивных методов биологической очистки водных выбросов, до сих пор широко применяются и экстенсивные способы: биологические пруды, поля орошения, поля фильтрации.

Пруды с искусственной или естественной аэрацией также относятся к сооружениям биологической очистки, в которых под воздействием биоценоза активного ила происходит окисление органических примесей. Помимо водорослей и бактерий, в прудах представлена микро- и макрофлора: простейшие, черви, коловратки, насекомые и др. Особую роль играют биопруды в процессах окончательной очистки стоков после очистных сооружений, когда остающиеся примеси осложняют процесс дальнейшей утилизации вод. Применение биопрудов позволяет практически полностью удалить остаточные количества многих соединений.

**Поля фильтрации и поля орошения** также используются для очистки сточных вод, при этом первые служат только для целей очистки. Поля орошения предназначены для выращивания сельскохозяйственных растений. Процесс самоочищения воды осуществляется в этих случаях за счет жизнедеятельности различных групп почвенных организмов - бактерий, микромицетов, водорослей, простейших, червей и членистоногих.

Существенную роль в процессах очистки сточных вод на полях фильтрации и орошения играют нитрификаторы. В летний период на 1 га образуется до 70 кг нитратов, которые с током жидкости поступают в нижние горизонты, где существуют анаэробные условия. Восстановление нитратов денитрификаторами делает возможным окисление сохранившихся в воде органических веществ.

## **2. Анаэробная микробиологическая очистка сточных вод**

**Сравнение способов аэробной и анаэробной очистки.** Известно, что при выборе между аэробными и анаэробными способами очистки сточных вод обычно склоняются в сторону первых, так как эти системы признаны более надежными, стабильными, они лучше изучены.

Однако анаэробные процессы очистки имеют свои преимущества. Во-первых, здесь образуется меньше ила. Во-вторых, образуется метан, который может использоваться как горючее и, в-третьих, потребность в энергии на аэрацию при аэробных процессах очистки превышает потребность в энергии на перемешивание при анаэробных процессах.

Главный недостаток анаэробных систем - меньшая скорость реакции по сравнению с аэробными процессами.

Развитие быстрых анаэробных процессов требует не только оптимизации условий анаэробной биодеградации, но и поддержания высокой концентрации активной биомассы в

аппарате. Это относится большей частью к анаэробным системам очистки сточных вод, работающим в мезофильном интервале температур. Существуют также криофильные и термофильные реакторы; большинство систем, работающих без обогрева, относятся к криофильным.

Преобладающими видами в таких реакторах являются бактерии, однако в силу некоторой специфики продукты жизнедеятельности одних бактерий являются субстратом для других, и, следовательно, должен поддерживаться баланс между численностью бактерий и концентрацией субстрата.

На протяжении долгого времени для описания анаэробного процесса использовалась упрощенная модель, согласно которой сложные молекулы разлагаются до простых «кислотообразующими» бактериями, а эти промежуточные соединения разлагаются до метана и  $\text{CO}_2$  «метанообразующими» бактериями.

Биохимия этого процесса изучена детально. Важнейшими параметрами, регулирующими процесс, служат и промежуточные концентрации летучих жирных кислот. Изучение термодинамики и кинетики анаэробного процесса показало, что для обычных реакторов с мешалкой, в условиях отсутствия какого-либо удерживания биомассы или рециркуляции, минимальное время пребывания жидкости в аппарате составляет 5 суток. В других системах можно уменьшить время пребывания жидкости за счет увеличения времени пребывания биомассы свыше 5 суток.

**Микробиология анаэробной очистки сточных вод.** Недавние успехи в изучении микробиологического и биохимического механизмов анаэробного сбраживания дают возможность оптимизации управления процессом, в частности предупреждения нестабильности в работе сбраживателя. Несмотря на развитие современной технологии выделения и культивирования облигатных анаэробов и наличие некоторых данных о составе микробных популяций в сбраживателях для городских и животноводческих стоков, о таксономии этих микроорганизмов известно пока мало. Хотя биохимические механизмы ферментации в смешанной культуре еще не вполне изучены, все лучшее понимание этих сложных взаимосвязей порождает доверие к широкомасштабному промышленному применению анаэробного сбраживания загрязнений. Процессы, протекающие в основном в бактериальной биомассе, включают конверсию сложных органических субстратов (полисахариды, липиды и белки, в  $\text{CH}_4$  и  $\text{CO}_2$ ). Благодаря тому, что бактериальное сообщество может менять используемые пути ферментации, оно функционирует как саморегулирующаяся система, поддерживающая значение  $\text{pH}$ , окислительно-восстановительного потенциала и термодинамическое равновесие оптимальным для роста образом и, следовательно, обеспечивающая стабильность сбраживателя.

По своим пищевым потребностям эти бактерии могут быть разделены на три обширные группы. Первая включает гидролитические бактерии-бродильщики (*ацидогенные*), они обеспечивают начальный гидролиз субстрата и сбраживание углеводов до низкомолекулярных органических кислот и других малых молекул. Вторая группа представляет собой *гетероацетогенные* бактерии. Третья - это *метаногенные* микроорганизмы, которые производят  $\text{CH}_4$ . Эта последняя группа может быть в дальнейшем подразделена на потребителей водорода, уксусной кислоты и одноуглеродных соединений.

Синергические эффекты, происходящие при сосуществовании этих групп, например различные скорости потребления субстратов и роста, могут быть объяснены

совместным культивированием и возникают в результате взаимодействий, таких как видовой перенос водорода. Субстраты, содержащие серу и азот, могут вызывать рост еще двух дополнительных групп: сульфатредуцирующих бактерий и денитрификаторов.

Кроме характера субстрата, на состав популяции в процессе смешанной ферментации также влияют другие условия культивирования. Один из таких параметров - температура. Сбраживатели могут работать в криофильных, мезофильных или термофильных условиях. Термофильные сбраживатели имеют высокие скорости реакции, но часто получаемая при этом выгода недостаточно велика, чтобы компенсировать стоимость дополнительной тепловой энергии, необходимой для поддержания более высоких температур. К тому же в этих условиях существует мало разновидностей, которые могут влиять на способность системы адаптироваться к различным субстратам или ингибирующим соединениям.

Поэтому большинство установок в настоящее время работает в температурном интервале 34-38 °C, что экономически выгодно и к тому же допускает существование большего числа видов микроорганизмов. Таким образом, дальнейшая информация будет относиться в основном к мезофильному сбраживанию.

Продукты анаэробного сбраживания:

- *органические кислоты* - уксусная, пропионовая, масляная, капроновая, муравьиная, молочная, янтарная;
- *спирты и кетоны* - метанол, этиловый спирт, изопропиловый спирт, бутанол, глицерин, ацетон;
- *газы* - водород, метан, CO<sub>2</sub>;
- *ферменты* - целлюлаза, алкогольдегидрогеназа;
- *витамины* - рибофлавин, витамин B12.

Из других продуктов: малоновая кислота, некоторые жирные кислоты с более длинной цепью и изомерные жирные кислоты, концентрация которых зависит от характеристик источника питания и культуральных условий.

Микроорганизмы анаэробного ила могут быть как облигатными, так и факультативными анаэробами. В иле можно обнаружить представителей различных родов, включая образующие и необразующие спор грамположительные палочки, такие как протеолитические *Eubacterium*, целлюлозолитические *Clostridium*, облигатные анаэробы, такие как *Acetobacterium*, *Bacteroides* и *Bifidobacterium* и факультативные анаэробы *Streptococcus* и сем. *Enterobacteriaceae*.

Грамположительные кокки играют значительную роль в сбраживании стоков свиноферм. Недавние исследования 130 культур, выделенных из таких сбраживателей, позволили идентифицировать, представителей *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*.

Метаногены: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanothrix*.

**Реакторы, применяемые для анаэробной очистки.** Септиктенк представляет собой реактор без мешалки. Который часто работает при температуре ниже 25°C без какого-либо перемешивания. Объем тенка распределяется между двумя камерами, первая из которых занимает 2/3 объема и имеет наклонное днище для удержания ила. Ил периодически удаляется. Некоторое количество ила оставляют в тенке для поддержания анаэробной активности. Среднее время пребывания клеток микроорганизмов определяется по частоте обезыливания. Таким образом биомасса остается в системе в

течение примерно 50 суток. Если такого времени пребывания достаточно для поддержания метаногенной активности при высоких температурах (35 °C), то при температуре окружающей среды и в отсутствие перемешивания метаногенез протекает слабо.

Септикленки широко используются в городских очистных станциях и перерабатывают осадки, удаляемые из первичных отстойников, пену и активный ил из вторичных отстойников. В настоящее время созданы сбраживатели с флокулированной биомассой. Кроме того, имеются реакторы с неподвижной биопленкой. Анаэробные процессы очистки сточных вод не получили еще широкого применения несмотря на ряд очевидных преимуществ перед аэробными биологическими и химическими процессами.

### **3. Использование микроорганизмов в качестве индикаторов загрязнения окружающей среды.**

В последнее время весьма актуальными являются наблюдения за изменениями состояния окружающей среды, вызванными антропогенным воздействием. Система этих наблюдений и прогнозов составляет суть экологического мониторинга. В этих целях все чаще применяется и используется достаточно эффективный способ мониторинга среды - биоиндикация, т.е. применение живых организмов для оценки состояния окружающей среды.

Почвенные организмы отвечают за разложение органического вещества, образовавшегося в наземной экосистеме при фотосинтезе, и снабжают растения доступными ресурсами. Они играют существенную роль в формировании стабильных почвенных агрегатов. Почвенная биота - идеальный пример системы, обеспечивающей устойчивое существование ненарушенных экосистем в течение очень больших промежутков времени.

Отличительная особенность почвы как природного местообитания микроорганизмов связана с ее гетерогенностью. Почвенные микроорганизмы обитают в трехфазной полидисперсной среде.

Одним из последствий деятельности человека на Земле является загрязнение окружающей среды. Загрязнение - нежелательное изменение свойств почвы в результате антропогенного влияния и поступления различных веществ и соединений. Прогрессирующее воздействие деятельности человечества на природную среду достигло уровня, при котором происходят существенные изменения в химическом составе почвенного покрова обширных территорий.

Проблема взаимодействия почвенной биоты с пестицидами: влияние пестицидов на биоту и деградация пестицидов под влиянием почвенной биоты.

Почвенные микроорганизмы испытывают разноплановое воздействие со стороны пестицидов и участвуют в их передаче к высшим организмам и человеку. Воздействуя на отдельные микроорганизмы, пестициды влияют и в целом на экосистемы, модифицируя их. Часто такие модификации приводят к необратимому нарушению экологического равновесия. Почвенные микроорганизмы могут осуществлять трансформацию и минерализацию пестицидов. Они используют пестициды в качестве источника углерода и энергии. С этими процессами связана проблема детоксикации пестицидов в окружающей среде.

Пестициды влияют на активность микробиологических процессов в почве. Гербициды в целом угнетают дыхание почвы и процесс нитрификации.

Численность чувствительных к пестицидам микроорганизмов значительно сокращается, или же они вообще исчезают из почвенных проб, загрязненных пестицидами. Наиболее чувствительны к воздействию пестицидов микроводоросли, нитрификаторы, азотфиксаторы, деструкторы целлюлозы, симбионты. Эти организмы можно рассматривать в качестве индикаторов.

Другой аспект проблемы связан с интенсификацией очищающей способности почвенной биоты по отношению к пестицидам, большинство которых являются ксенобиотиками.

Способность к трансформации и детоксикации пестицидов показана для многих форм микроорганизмов. Наиболее велика в этом отношении роль бактерий, затем актиномицетов и грибов. Особое значение принадлежит целлюлозоразлагающим микроорганизмам. Соединения, которые в условиях чистой культуры микробов не подвергаются деградации, в природе все-таки деструктурируются микробиологическим путем вследствие кооперативного воздействия.

При необходимости остаточное токсическое действие пестицидов в почве можно продлить, если одновременно с ними вносить ингибиторы микробиологической активности.

Для разложения пестицидов в почве требуется сочетание определенных экологических условий. Это достигается в основном путем создания оптимальных условий для микроорганизмов-деструкторов. Поиск микроорганизмов-деструкторов ведется давно, их выделяют из природной среды либо конструируют генно-инженерными методами.

Методами биоиндикации и биотестирования определяется присутствие в окружающей среде того или иного загрязнителя по наличию или состоянию определенных организмов, наиболее чувствительных к изменению экологической обстановки. Методом биоиндикации с использованием подходящих индикаторных организмов в определенных условиях может осуществляться качественная и количественная оценка эффекта антропогенного и естественного влияния на окружающую среду.

Проблема сохранения окружающей среды в настоящее время концентрирует на себе внимание исследователей всего мира. Стремительный рост народонаселения, увеличение площадей орошаемого земледелия, а также урбанизация и индустриализация привели к небывалому использованию природных ресурсов. В связи с усилением антропогенной нагрузки становится необходимой разработка методик, позволяющих оценивать экологическое состояние природно-антропогенных сред. Поэтому проблема развития различных мониторинговых подходов в системе экологического контроля и управлении качеством окружающей среды сегодня наиболее актуальна.

Так как все компоненты природы тесно и неразрывно взаимосвязаны между собой, то нарушения одного компонента вызывает изменение состояния всех остальных. Оценивая состояния одного, можно предполагать и изменения других. Наиболее остро изменения окружающей природной среды отражаются на биотических компонентах.

Не всегда есть возможность проводить комплексные научные исследования, требующие больших материальных затрат и специального оборудования. В таких случаях можно использовать методы биоиндикации, получивших в последнее время широкое признание и распространённость. Важным представляется не только оценка

биоразнообразия и устойчивости природных биоценозов, но и привлечение внимания муниципальных органов власти к данной проблеме, что особенно актуально в перспективе дальнейшего ухудшения экологической обстановки.

При решении задач биоиндикации и связанных с ними задач экологического прогнозирования необходимо уделять внимание трем основным аспектам: выделению системообразующих факторов и целям прогнозирования; разработке соответствующих методов и моделей; проблеме оценки достоверности получаемых результатов.

Биоиндикация - оценка качества среды обитания и ее отдельных характеристик по некоторому индикаторному показателю биоты в природных условиях. В качестве биоиндикаторов выступают отдельные таксоны, экологические группировки, физиологически сходные организмы, размерные группы. Отклонение индикаторной биотической характеристики от некоторой заданной нормы свидетельствует о превышении уровней допустимого воздействия абиотических факторов.

**Биондикация** - это метод обнаружения и оценки воздействия абиотических и биотических факторов на живые организмы при помощи биологических систем. Основой задачей биондикации является разработка методов и критериев, адекватно отражающих уровень антропогенных воздействий с учетом комплексного характера загрязнения и диагностировать ранние нарушения в наиболее чувствительных компонентах биотических сообществ.

Биоиндикация может проводиться на уровне макромолекул, клетки, организма, популяции, сообщества и экосистемы. Чувствительными биоиндикаторами могут служить как отдельные процессы в клетке и организме, так и морфологические изменения.

Методы биоиндикации: регистрирующая биоиндикация и биоиндикация по аккумуляции.

**Регистрирующая биоиндикация** позволяет судить о воздействии факторов среды по состоянию особей вида или популяции, а **биоиндикация по аккумуляции** использует свойство растений и животных накапливать те или иные химические вещества.

Какой бы современной ни была аппаратура для контроля загрязнения и определения вредных примесей в окружающей среде, она не может сравниться со сложно устроенным «живым прибором». Регистрирующие индикаторы реагируют на изменения состояния окружающей среды изменением численности, фенооблика, повреждением тканей, соматическими проявлениями, изменением скорости роста и другими хорошо заметными признаками. Не всегда возможно установить причины изменений. Это один из основных недостатков биоиндикации. С помощью биоиндикаторов можно получить информацию о биологических последствиях и сделать косвенные выводы об особенностях самого фактора. Физические и химические методы дают количественные и качественные характеристики фактора, но позволяют лишь косвенно судить о его биологическом действии.

Методы биоиндикации, позволяющие изучать влияние техногенных загрязнителей на растительные и животные организмы, на неживую природу, являются наиболее доступными. Биоиндикация основана на тесной взаимосвязи живых организмов с условиями среды, в которой они обитают.

Существуют различные виды биоиндикации. Если одна и та же реакция вызывается различными факторами, то говорят о **неспецифической биоиндикации**. Если же те или

иные происходящие изменения можно связать только одним фактором, то речь идет о **специфической биоиндикации**.

Микроорганизмы - наиболее быстро реагирующие на изменение окружающей среды **биоиндикаторы**. Их развитие и активность находятся в прямой связи с составом органических и неорганических веществ в среде. На этом основаны принципы биоиндикации с использованием микроорганизмов.

Выявление микроорганизмов и их учет можно произвести путем высеива проб в жидкие и агаризованные питательные среды.

На современном этапе развития науки, техники и сельского хозяйства невозможно представить себе отрасль, где микробиологические процессы не имели бы значения. На свойствах и жизнедеятельности микроорганизмов основаны технологические процессы в различных отраслях промышленности и сельскохозяйственного производства. Микроорганизмы активно участвуют в круговороте веществ в природе.

Возникает необходимость глубокого анализа характера микробиологических процессов, идущих в почвах; знания основных функций, присущих микроорганизмам; умение ориентироваться и оценивать возможные последствия воздействия тех или иных агротехнических приемов в целом на характер микрофлоры и деятельность микроорганизмов. В дальнейшем это позволит выбрать наиболее перспективные из них, успешно управлять процессами повышения плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных культур.

Без понимания сущности микробиологических процессов почвы, умения анализировать роль микроорганизмов, ответственных за их течение, немыслима успешная деятельность будущих агрономов, а также совершенствование современных технологий выращивания сельскохозяйственных культур.

Показатели, характеризующие состояние почвенной биоты и биологическую активность почв, используются для контроля за изменениями в почвах, которые происходят при включении в них разного рода посторонних веществ, чаще всего антропогенного происхождения.

Таким образом, можно сделать вывод, что микроорганизмы в качестве биоиндикатора состояния почвенного покрова являются достаточно информативными. Применение данной группы биоиндикаторов дает возможность получить первое представление о состоянии окружающей среды.

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### 2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

**Тема: «Введение в сельскохозяйственную микробиологию. Приборы и оборудование для микробиологических исследований почвы»**

**2.1.1 Цель работы:** Ознакомиться с техникой безопасности, а также структурой микробиологической лаборатории. Ознакомиться с оборудованием и приборами, используемыми в микробиологических исследованиях почвы.

### **2.1.2 Задачи работы:**

1. Изучить устройство микробиологической лаборатории
2. Изучить технику безопасности в микробиологической лаборатории.
3. Изучить и освоить работу с приборами и на оборудовании, используемом в микробиологических исследованиях почвы.

### **2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Бактериологические боксы, термостат, холодильник, бактериологическая петля, микологические крючки, колбы, чашки Петри, пипетки Пастера, автоклавы, микроскопы, пробирки, автоклав, микроскоп, спиртовки, пипетки.

### **2.1.4 Описание (ход) работы:**

#### **Принципы организации и оборудования микробиологической лаборатории, правила работы в ней**

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля выполняет бактериологические, вирусологические и иммунологические исследования. Микробиологическая лаборатория общего назначения должна иметь следующие комнаты: Лабораторные, Автоклавную, Средоварочную, Бактериологическую с боксами, Моечную, Виварий, Подсобные помещения (душ, склад, гардероб, туалет)

#### Правила работы и поведения в бактериологической лаборатории общего назначения

1. В помещение лаборатории нельзя входить без специальной одежды – халата, шапочки, сменной обуви.
2. Запрещается в помещении прием и хранение пищи. Курение.
3. Нельзя использовать лабораторную спец. одежду за пределами лаборатории.
4. Зараженный материал подлежит уничтожению, инструменты и поверхность рабочего стола, дезинфицируют после окончания работ.
5. После работы с культурой, животными, перед уходом из лаборатории необходимо вымыть руки.
6. Штаммы микроорганизмов, заразный материал должны хранится в сейфе или холодильнике закрытыми и опечатанными.
7. Необходимо проводить обеззараживания предметов, одежды, стола, комнаты, в случае если разбился сосуд с инфицированным материалом или произошел неосторожный разлив заразного материала.
8. Сотрудники лаборатории подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных заболеваний, с возбудителями которых возможна работа в лаборатории.
9. В лаборатории должна быть инструкция по технике безопасности, которую персонал должен знать и строго выполнять. Необходимо обязательно немедленно сообщить руководителю лаборатории обо всех аварийных ситуациях, создающих угрозу биологической безопасности и проводить все мероприятия для предотвращения последствий.
10. Каждая бактериологическая лаборатория должна иметь лицензию на право работы с возбудителями.

#### **Оборудование, посуда и инструменты для работы с культурами микроорганизмов**

В микробиологической лаборатории используется следующее оборудование: термостат, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная для роста микроорганизмов температура; качалки и ферментеры для культивирования микроорганизмов; сушильные шкафы и автоклавы для стерилизации питательных сред, посуды и инструментов; бактерицидные лампы для дезинфекции помещений, ламинарные боксы, микроскопы и т.д.

Для культивирования микроорганизмов используется следующая стеклянная посуда: качалочные колбы, конические колбы, чашки Петри, пробирки, матрацы (рис. 1).

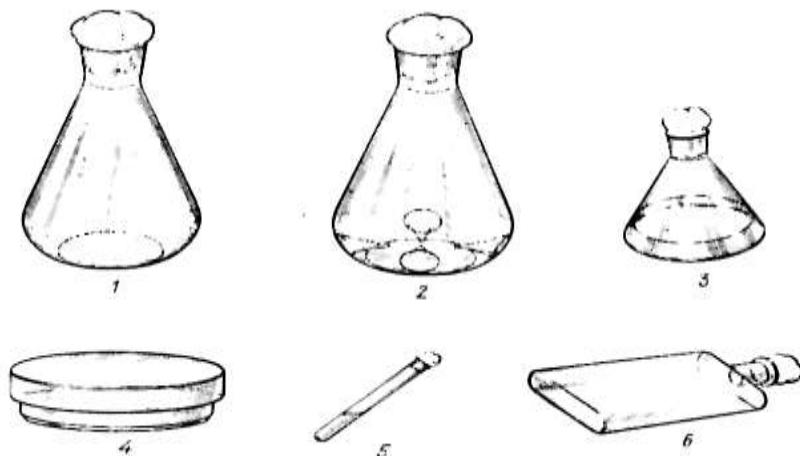


Рис. Посуда для культивирования микроорганизмов: 1- качалочная колба; 2- качалочная колба с отбойниками; 3- коническая колба; 4- чашка Петри; 5- пробирка; 6- матрац.

В качестве инструментов для посева и приготовления препаратов используют бактериологические петли, иглы, крючки, стеклянные пипетки, шпатели Дригальского.

### **Правила работы с культурами микроорганизмов**

В лаборатории микроорганизмы выращивают на жидких и плотных питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, чашки Петри. Посуду и питательные среды предварительно стерилизуют. Процесс выращивания микроорганизмов в искусственных условиях в питательной среде называется культивированием. При этом выращенные клетки определенного вида микроорганизмов называются культурой микроорганизмов.

Все действия следует проводить около пламени горелки (но не в пламени) и по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резких движений и ходить около работающего с чистой культурой, т.к. движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. Для разлива питательной среды в чашки Петри сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки, обжигают горло сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и указательным пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (около 20 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

Внесение клеток микроорганизмов в стерильную среду называется посевом. Распределение микроорганизмов по поверхности питательной среды называют рассевом. Перенос уже выращенных микроорганизмов из одной среды в другую – пересевом. Клетки микроорганизмов для посева или приготовления препаратов берут бактериологической петлей (если микроорганизмы выращены на плотной питательной среде) или стерильной пипеткой (если микроорганизмы выращены в жидкой среде). Перед взятием клеток микроорганизмов петлю стерилизуют, обжигая саму петлю и часть

держателя в пламени спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

### **Работа 1**

**Задание:** Экскурсия по микробиологической лаборатории.

### **Работа 2**

**Задание:** изучить режимы автоклавирования для стеклянной посуды, пластиковых расходников, плотных питательных сред и жидких питательных сред. Заполнить таблицу.

	Режим автоклавирования	Время автоклавирования	Контроль стерильности
Стеклянная посуда			
Пластиковые пробирки			
Плотная питательная среда			
Жидкая питательная среда			
Физиологический раствор			

**Контрольные вопросы:** 1. Устройство и техника безопасности в микробиологической лаборатории. 2. Правила работы в автоклавной. 3. Способы утилизации патогенного материала. 4. Какое оборудование и приборы используются для микробиологических исследований почвы? 5. Правила работы с автоклавом. 6. Правила работы с термостатом.

## **2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).**

**Тема: «Методы выделения и культивирования почвенных микроорганизмов.  
Количественный анализ почвенных микроорганизмов»**

**2.2.1 Цель работы:** Изучить методы культивирования почвенных микроорганизмов. Изучить способы определения количественного состава почвенных микроорганизмов.

### **2.2.2 Задачи работы:**

1. Изучить оборудование, используемое для культивирования почвенных микроорганизмов
2. Освоить методы культивирования почвенных микроорганизмов
3. Изучить оборудование, используемое для количественного определения почвенных микроорганизмов

4. Изучить методы, используемые для количественного определения почвенных микроорганизмов

5. Освоить методы, используемые для количественного определения почвенных микроорганизмов

### **2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Чашки Петри, пробирки с пробками, питательные среды, бактериологические петли, образцы почвы, спиртовки, термостат, физиологический раствор, образцы почвы, микроскоп.

### **2.2.4 Описание (ход) работы:**

Мир почвенных микроорганизмов весьма разнообразен, однако здесь в основном будут рассмотрены бактерии, микроскопические грибы, актиномицеты и близкие к ним существа. Эти организмы обычно изучаются в курсах микробиологии.

Определение числа бактериальных клеток прямым микроскопированием облегчается при использовании люминесцентного микроскопа, красителей микробных клеток.

Иногда прямую микроскопию применяют для микробиологического анализа срезов почвы, помещенных в метилметакрилат, фильтратов почвенных суспензий на фильтрах Зейца, окрашенных дианиловым голубым или метиленовым синим и т. д.

Прямые методы дают представление об общем количестве микроорганизмов в почве. Однако внешний облик микроорганизмов не позволяет судить об их функциях, поэтому необходимо дополнительно определить принадлежность микроскопических существ, обнаруженных в почве, к разным систематическим и физиологическим группам.

Состав отдельных групп микроорганизмов может быть уточнен посевом почвенной суспензии на разные по составу плотные питательные среды.

Общие показатели численности микробов, как бы условны они ни были, представляют интерес. На их основании можно примерно вычислить массу совокупности микроорганизмов в почве.

Предложены и другие косвенные методы определения в почве массы отдельных групп микроорганизмов - для бактерий по специфической для прокариот муравьевой кислоте, для грибов - по хитину, входящему в состав их клеток, для водорослей - по количеству хлорофилла и т. д. Почвенную биомассу можно примерно измерять по компонентам микробной клетки - АТФ и ДНК, но более точным биохимическим методом считают ее установление по содержанию аденоцистозина и аденина при помощи флуорометрии.

При анализе почв нередко учитывают число отдельных физиологических групп микроорганизмов. Это делают так называемым методом титра, при котором плотные или жидкие избирательные питательные среды для определенных групп микроорганизмов засеваются разными разведениями почвенной суспензии.

Для характеристики типа почвы и ее состояния важны не только показатели численности разных групп микроорганизмов, но и анализ состояния в почве отдельных их родов и видов.

Приведенные методы анализа позволяют определить численность микробов или отдельных их групп в почве, но не показывают их состояния. Для выяснения этого вопроса существует ряд подходов. Так, в 30-х годах текущего столетия академик АН

УССР Н. Г. Холодный рекомендовал изучать микробные пейзажи почвы с помощью «стекол обрастаания». При работе по этому методу в почву закладывают предметные стекла и оставляют там, на определенный срок. Поверхность стекол обрастает микрофлорой, характерной для данной почвы. Микроскопический анализ стекол позволяет получить представление, как о составе, так и о взаимоотношениях микроорганизмов в почве.

Новые возможности в области изучения микробных пейзажей почвы открывает капиллярный метод Б. В. Перфильева и Д. Р. Габе. Для изучения группового состава микроорганизмов почв ими сконструирован капиллярный прибор - педоскоп, который может быть использован и для работы с грунтами. Педоскоп представляет собой набор капиллярных ячеек с 5-6 прямоугольными каналами. Ячейки закладывают в пазы широкого стеклянного держателя и заполняют полужидкой агаризованной средой, содержащей в качестве органического субстрата гумусовые вещества. Это создает для микроорганизмов условия, близкие к почвенным. Педоскоп выдерживают в почве 1,5-2 месяца, затем просматривают его под микроскопом. С помощью этого метода удается выявить характерные для почвы микробные ассоциации.

Среди методов количественного анализа наиболее объективным является **метод прямого микроскопирования почвы**, принцип которого был предложен С. Н. Виноградским. При этом способе готовят почвенную суспензию и в определенном объеме ее с помощью микроскопа подсчитывают общее число микроорганизмов. Последующим пересчетом можно установить, сколько микроорганизмов приходится на 1 г исследуемой почвы. С. Н. Виноградский готовил препараты на предметном стекле и просматривал их под оптическим микроскопом. В поле зрения можно было видеть палочковидные бактерии, мелкие и крупные кокки, иногда обрывки мицелия грибов и актиномицетов и другие микроорганизмы.

Прямое микроскопирование почвы облегчается при использовании флюорохромов, позволяющих легче различать микроорганизмы среди мелких минеральных частиц.

Б. В. Перфильев и Д. Р. Габе для подсчета микроорганизмов в почве рекомендовали пользоваться сконструированной ими капиллярной камерой, глубина которой не превышает 30-40 мкм, а ширина не более поля зрения микроскопа. Подсчитав число микроорганизмов в капилляре, можно затем сделать пересчет на 1 г почвы.

Отдельные группы микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, грибы и т. д.) могут быть определены посевом почвенной суспензии на плотные питательные среды. В практике обычно используются агаризованные или желатинизированные питательные среды. Для прямого подсчета микроорганизмов почвы используют электронный микроскоп. Для прямого анализа микрофлоры почвы применяют и сканирующий электронный микроскоп, дающий объемное изображение анализируемых объектов.

Прямые методы дают представление об общей численности микроорганизмов в почве, но не позволяют судить об их видовой принадлежности и функциях.

#### **Косвенные методы определения численности микроорганизмов.**

Состав отдельных групп микроорганизмов может быть уточнен посевом почвенной суспензии на различные плотные питательные среды. После инкубации подсчитывается число выросших колоний, допуская, что каждая колония – это потомство одной бактериальной клетки. Такой пересчет имеет ряд условностей – колония может вырасти

не из одной клетки, колонии грибов и актиномицетов вырастают из обрывков мицелия и спор.

### Работа 1

**Задание:** Провести посев образов почвы на чашки с плотной питательной средой. Протокол оформить в тетради (заполнить таблицу).

образец	Характеристика колоний, выросших на плотной питательной среде	Морфология микроорганизмов (рисунок)
Чернозем		
Глина		

### Работа 2

**Задание:** Изучить готовые чашки Петри с ростом почвенных микроорганизмов. Определить количественный состав почвенных микроорганизмов. Протокол оформить в тетради (заполнить таблицу).

Образец	Число микроорганизмов в 1г почвы	Морфология микроорганизмов (рисунок)

**Контрольные вопросы:** 1. Какие питательные среды используют для культивирования почвенных микроорганизмов? 2. Какие методы и приборы используют для изучения почвенных микроорганизмов? 3. Какие методы и оборудование используют для количественного определения почвенных микроорганизмов? 4. Какие питательные среды применяют для количественного определения почвенных микроорганизмов?

## 2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

**Тема: «Оценка бактериального разнообразия почв и идентификация почвенных бактерий»**

**2.3.1 Цель работы:** Иметь представление о методам, применяемых для изучения разнообразия почвенных микроорганизмов

### 2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить существующие методы определения бактериального разнообразия почвы

2. Освоить чашечный метод определения бактериального разнообразия почвы

### **2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Чашки Петри с плотной питательной средой, пробирки, пробы почвы, физиологический раствор, бактериологические петли, спиртовки, предметные стекла, иммерсионное масло, микроскоп.

### **2.3.4 Описание (ход) работы:**

Методы изучения разнообразия бактериальных сообществ: чашечный метод посева на питательные среды, изучение спектров утилизации различных субстратов, анализ профилей метиловых эфиров жирных кислот, модификации молекулярно-биологических методов.

#### **Чашечный метод.**

Этот метод стал реже применяться, так как в почве достаточно много некультивируемых бактерий. Однако такие методы в настоящее время продолжают давать информацию об изменении разнообразия на уровне популяции видов. Преимущества чашечного метода – быстрота, дешевизна, надежность в полученном результате. Эти методы полезны для сравнительного изучения различных типов почв. Выделенные штаммы используются для оценки фенотипического разнообразия бактерий.

#### **Изучение спектров утилизации субстратов.**

Используются для интегральной оценки анализируемых сообществ. Полученные этим методом результаты служат показателем метаболического потенциала сообщества и характеризуют разнообразие трофических гильдий внутри сообщества. Модели спектров утилизируемых субстратов отражают количественные соотношения и качественный состав сообщества. Анализ спектров утилизируемых субстратов дает возможность различать почвы по уровню внесения удобрений и урожайности сельскохозяйственных культур. Эта система оценки микробных сообществ довольно чувствительна и может служить для оценки сдвигов в сообществе при антропогенных нарушениях среды.

#### **Молекулярная техника.**

Анализ метиловых эфиров жирных кислот, экстрагируемых из почвы, широко используется для выявления различий в микробных сообществах. Клетки бактерий содержат липиды, состав которых отражает как таксономическую принадлежность, так и влияние условий окружающей среды. Разнообразие живых микроорганизмов, входящих в состав почвенных микробных сообществ, оценивают с помощью анализа жирных кислот, присутствующих в составе фосфолипидов, поскольку они содержатся только в мембранах живых клеток. Фосфолипидные профили довольно точно позволяют определить размеры биомассы отдельных групп бактерий в почве.

#### **Анализ нуклеиновых кислот.**

В последние десятилетия исследователи подошли к пониманию сложной структуры почвенных микробных сообществ через молекулярную технику анализа нуклеиновых кислот. Наиболее широко в настоящее время используются для филогенетического анализа последовательности малых субъединиц 16S рРНК. Использование этого метода показало, что разнообразие почвенных микроорганизмов не распределено равномерно среди главных известных таксонов.

## Работа

**Задание:** Определить бактериальное разнообразие почвы чашечным методом. Протокол оформить в тетради (заполнить таблицу).

Номер образца	Питательная среда	ПМО	Морфология	Вид

**Контрольные вопросы.** 1. Какие вам известны методы определения бактериального разнообразия почвы? 2. Какой метод наиболее распространен? 3. В чем достоинства и недостатки каждого метода?

### **2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).**

**Тема:** «Методы определения структуры комплексов почвенных актиномицетов и грибов».

**2.4.1 Цель работы:** Изучить виды актиномицетов и грибов, обитающих в почве и методы их определения.

**2.4.2 Задачи работы:** Освоить методы определения структуры комплексов почвенных актиномицетов и грибов

#### **2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Чашки Петри, пробирки, питательные среды, бактериологические петли, спиртовки, термостат, микроскоп, предметные стекла, красители, физиологический раствор.

**2.4.4 Описание (ход) работы:** Численный состав микроорганизмов в почве отличается большой динамичностью. Это следствие динамики температуры и влажности почвы, состояния растительного покрова и т. д. Кроме сезонных изменений, в численности почвенной микрофлоры отмечаются и кратковременные флюктуации. Некоторые исследователи допускают, что число бактерий может резко снижаться вследствие уничтожения их фагами или простейшими. Предполагают также накопление каких-то токсических веществ в почве, временно подавляющих развитие определенных групп микроорганизмов.

**Актиномицеты.** Типичные формы, относящиеся к аэробам и образующие мицелий, широко распространены в почве. Стрептомицеты бедно представлены в северных почвах, но в южных их численность резко возрастает, что подтверждается всеми методами исследования. Некоторые актиномицеты распространены чрезвычайно широко (группы *albus*, *griseus*, *globisporus*, *violaceus* и аспорогенные формы *albus*). Некоторые актиномицеты (*fradis*, *flavus*, *chromogenes*, *rubroaurantiacus*) в заметных количествах обнаружены в серых лесных зонах. Группа *verticillatus* и аспорогенные формы *flavus* и *chromogenes* также тяготеют к наиболее южным почвам. Виды рода *Actinomadura* широко

распространены повсеместно, но их видовое разнообразие значительно богаче в южных почвах.

**Грибы.** Северные почвы, имеющие кислую среду, наиболее богаты грибами. В почвах южной зоны родовой и видовой состав микроскопических грибов более разнообразен, чем в северных. В первых доминируют представители рода *Aspergillus*, а во вторых – *Penicillium*. Род *Penicillium* в северных почвах представлен 35-40 видами, а в южных – лишь 10-15. Обратная картина наблюдается для грибов рода *Aspergillus*: в северных почвах в небольшом числе встречаются 3-5 видов рода, в южных – 15-20.

Северные почвы беднее, чем южные, грибами рода *Fusarium*, которые особенно обильно размножаются в каштановых почвах и сероземах. Мукоровыми грибами богаты почвы северных районов, однако некоторые роды (*Choanephora*, *Cunninghamella*, *Rhizopus*) приурочены к южным почвам.

В почвах обычно встречаются грибы с темнопигментированным мицелием (*Dematium*, *Cladosporium*, *Macrosporium*, *Alternaria*).

По данным И.П. Бабьевой, тундре, при большом пестроте почвенного покрова основная часть дрожжей сосредоточена на мхах и торфе.

В лесных биогеоценозах много дрожжей имеется в подстилке. Они составляют группу базидиальных грибов (*Candida*, *Trichosporium*). В минеральных горизонтах почвы дрожжей значительно меньше. Здесь доминируют типичные педобионты – из аскоспоровых грибов *Lipomyces starkeyi*, из базидиомицетов – виды *Candida* и *Cryptococcus*.

В степном биогеоценозе травяной опад также богат дрожжами. Здесь встречаются до 14 видов родов *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Rhodosporidium*.

В биогеоценозах полупустынь и пустынь на растительности доминируют дрожжи родов *Sporodiobolus*, *Tilletiopsis* и *Sporobolomyces*, образующие баллистоспоры, рассеивающиеся токами воздуха и имеющие в жизненном цикле стадии, устойчивые к засухе – хламидоспоры.

## Работа

**Задание:** Микроскопировать готовые мазки грибов и актиномицетов. Заполнить таблицу.

Морфология (картичка)	Вид микроорганизма

**Контрольные вопросы:** 1. Какие микроскопические грибы распространены в почве? 2. С чем связано богатство видового состава грибов в почвах? 3. Какие виды актиномицетов встречаются в почвах? 4. От чего зависит распространение актиномицетов в почвах? 5. Опишите морфологию грибов. 6. Опишите морфологию актиномицетов.

## **2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).**

**Тема: «Роль микроорганизмов в биологическом круговороте веществ. Преобразование органических безазотистых соединений»**

**2.5.1 Цель работы:** Охарактеризовать роль микроорганизмов в биологическом круговороте веществ

**2.5.2 Задачи работы:** Изучить роль микроорганизмов в преобразование органических безазотистых соединений

### **2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Картофель, мел, льняная солома, пробирки, пипетки, ножницы, водяная баня, раствор Люголя (I + KI), 5%-ный раствор FeCl<sub>3</sub>, предметные и покровные стекла, микроскопы., пробирки, пинцеты, скальпели.

### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

Микроорганизмы в основном получают энергию при высвобождении её из безазотистых органических веществ. В зависимости от того, каким путём идёт разложение органических веществ, различают брожение, при котором высвобождение энергии идёт без доступа свободного кислорода, и дыхание или окисление, когда выделение энергии происходит в аэробных условиях. Поэтому среди конечных продуктов брожения находятся неполностью окислившиеся вещества, содержащие запасы химической энергии – спирт, молочная кислота. В зависимости от основного продукта, образующегося в ходе этих процессов, брожения получили соответствующие названия: спиртовое, молочнокислое, маслянокислое и др.

Брожения, осуществляемые микроорганизмами, имеют большое значение в природе и широко используются в практической деятельности человека. Они лежат в основе пивоварения, квашения овощей, силосования, переработки молока в кисломолочные продукты и сыр и т.д.

**Спиртовое брожение** – это процесс превращения углеводов, вызываемый дрожжами и некоторыми видами бактерий (*Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi* и др.) и отдельными представителями мукоровых грибов. Однако практическое значение имеет спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами.

Дрожжи сбраживают углеводы с образованием этилового спирта по схеме: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> = 2CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH+2CO<sub>2</sub>

Только бактерии рода *Sarcina* образуют этанол тем же путём, что и дрожжи. Этanol как побочный продукт образует и гетероферментативная молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides*.

Спиртовое брожение лежит в основе виноделия, пивоварения. В хлебопекарной промышленности дрожжи выполняют роль разрыхлителей теста: при брожении и дыхании образуется диоксид углерода, благодаря чему увеличивается объём теста при выпечке и пористость хлеба.

**Молочнокислое брожение** осуществляют филогенетически неродственные микроорганизмы, объединяемые по признаку образования молочной кислоты. Они различны по морфологии, но все грамположительны, не образуют спор, не подвижны.

Схема сбраживания сахаров через гликолиз характерна для гомоферментативного молочнокислого брожения, когда лактата образуется 90 % и только 10% приходится на другие продукты. При гетероферментативном молочнокислом брожении сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь и лактата образуется  $\approx$  50%.

Свойство образовывать лактат при брожении используется при квашении капусты, засолке огурцов, приготовлении молочнокислых продуктов, силосовании кормов, в заквасках для ржаных сортов хлеба и добавках в сыроподобные колбасы, а также для получения чистой молочной культуры.

Возбудителями **маслянокислого брожения** являются строгие анаэробы, подвижные палочки с клостридиальным или плектридиальным типом спорообразования. По преобладанию тех или иных конечных продуктов маслянокислое брожение подразделяют на истинно маслянокислое, ацетонобутиловое брожение, брожение пектиновых веществ.

Процесс маслянокислого брожения протекает по схеме:

$$4\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 8\text{H}_2$$

Кроме масляной в процессе брожения в заметных количествах образуется уксусная кислота, а при подкислении среды (до pH 5,5) – значительные количества бутилового спирта и ацетона.

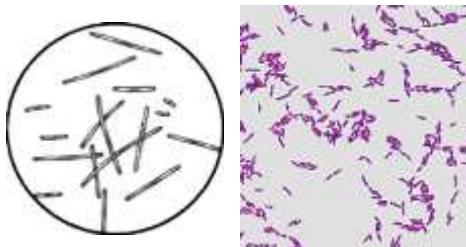


Рис. *Lactobacillus*

## Работа 1.

**Задание.** Изучить молочнокислое брожение.

Разливают молоко в колбы по 50-100 мл, доводят молоко до кипения. Колбы с кипяченым и некипяченным молоком помещают в термостат при 30 °C. Через 10-12 ч некипяченое молоко скисает. В колбе образуется ровный плотный сгусток без следов газа.

Микроскопирование молочнокислых бактерий. При хранении простокваша при комнатной температуре на ее поверхности появляется белая или кремовая бархатистая морщинистая пленка - это молочная плесень - *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), которая всегда сопутствует молочнокислому брожению, являясь его нежелательным спутником.

Для микроскопических наблюдений за молочнокислыми бактериями готовят препарат из прокисшего молока. Бактериологическую петлю вводят в сгусток и, повернув вокруг оси извлекают, прикасаясь ею к пленке, которую образует молочная плесень. Сгусток размазывают по предметному стеклу очень тонким слоем без воды. Сушат на воздухе. Фиксируют смесью спирта с эфиром, несколько раз нанося смесь на мазок и сливая ее. Фиксированный препарат окрашивают метиленовым синим 2-3 мин, промывают водой, высушивают и микросcopируют с иммерсией. На препарате преобладают мелкие округлые клетки *Lactococcus lactis*, соединенные в короткие цепочки.

Нередко на препарате видны разных размеров тонкие палочки обычно правильной формы рода *Lactobacillus*, иногда содержащие зерна волютина. Чаще встречается *Lactobacillus bulgaricus* – возбудитель естественного скисания молока в южных широтах.

Если на поверхности прокисшего молока появилась пленка, то в мазке обнаруживается также и молочная плесень. Прямоугольные или овальные клетки ее отличаются от молочнокислых бактерий большими размерами.

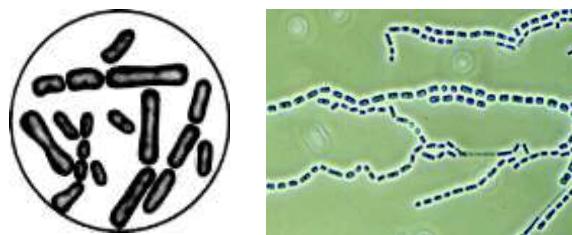


Рис. Молочная плесень *Geotrichum*

## Работа 2.

**Задание.** Изучить брожение пектиновых веществ.

Снопик льняной соломы высотой 6-7 см перевязывают в двух местах ниткой и вносят в крупную пробирку, наполненную на 2/3 водопроводной водой. Пробирку, зажав пинцетом, кипятят на горелке 2-3 мин. Вода приобретает желто-зеленый цвет. Воду сливают. Вновь наполняют пробирку водопроводной водой, кипятят несколько минут и сливают. Эту операцию повторяют 5-6 раз. После последнего кипячения жидкость не сливают. Охлаждают пробирку под краном, и в снопик вводят свежую соломину, не подвергавшуюся нагреванию.

Пробирку со снопиком помещают в термостат при 30-35 °C. Через 2-3 дня начнется брожение, а через 5-8 сут. оно закончится.

**Микроскопирование.** Извлекают снопик из пробирки, из его середины вынимают несколько соломинок и отжимают из них немного жидкости на предметное стекло. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате - крупные палочковидные бактерии с плектридиальным типом спорообразования и прерывистым расположением гранулезы, окрашенной в синий цвет. Это *Clostridium pectinovorum*. Нередко обнаруживается *C. felsineum* - палочки меньшего размера сигарообразной формы со спорой на конце. Гранулеза может заполнять всю вегетативную часть клетки.

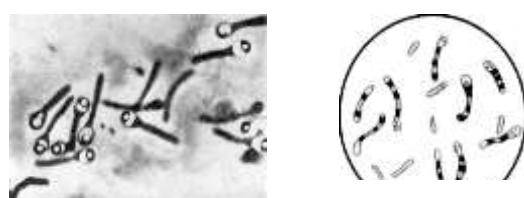


Рис. *Clostridium pectinovorum*.

**Контрольные вопросы:** 1. Суть спиртового брожения (условия, конечный продукт). 2. Микроорганизмы, вызывающие спиртовое брожение. 3. Суть молочнокислого брожения (условия, конечный продукт). 4. Микроорганизмы, вызывающие молочнокислое брожение. 5. Суть маслянокислого брожения (условия, конечный продукт). 6. Микроорганизмы, вызывающие маслянокислое брожение. 7. Методы изучения молочнокислого брожения. 8. Методы изучения брожения пектиновых веществ.

## **2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).**

**Тема: «Симбиотическая и несимбиотическая азотфиксация в почве»**

**2.6.1 Цель работы:** Изучить азотфиксацию микроорганизмов в почве

**2.6.2 Задачи работы:** Освоить методы изучения способности микроорганизмов к азотфиксации

### **2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Среды: МПБ и пептонная вода, пробирки с пробками, полоски лакмусовой бумаги и фильтровальной бумаги, пропитанной насыщенным раствором уксуснокислого свинца, реактив Эрлиха, целлофан, стерильные пипетки, спиртовки, термостат, суспензия клеток микроорганизмов.

### **2.6.4 Описание (ход) работы:**

Некоторые виды микроорганизмов с выраженной протеолитической активностью обладают способностью расщеплять белок и пептон до продуктов глубокого распада: амиака, сероводорода, индола. Образование амиака свойственно микроорганизмам, дезаминирующим аминокислоты. Этую способность выявляют по изменению цвета лакмусовой бумажки (из красного в синий) в процессе роста микроорганизмов в мясопептонном бульоне (МПБ). Сероводород является конечным продуктом расщепления серосодержащих аминокислот. Выявление способности микроорганизмов продуцировать  $H_2S$  основано на реакции образования сульфидов металлов. Микроорганизмы выращивают в МПБ, содержащем 0,01% цистина и цистеина. Если в среде накапливается  $H_2S$ , то он вступает в соединение с бесцветным уксуснокислым свинцом, образуя сернокислый свинец, окрашивающий индикаторную бумажку в чёрно-бурый цвет.

Некоторые микроорганизмы в процессе развития, расщепляя сложную гетероциклическую кислоту триптофан, образуют индол. Индол обнаруживают по качественной реакции с реагентом Эрлиха.

### **Работа 1.**

**Задание.** Разлить МПБ в пробирки по 8-10 мл, простерилизовать при 1 атм.

1. Засеять пробирки суспензией клеток (0,2 мл) изучаемого организма.
2. Над средой поместить, укрепив между пробкой и горлышком, лакмусовую бумажку и полоску фильтровальной бумаги, пропитанную насыщенным раствором уксуснокислого свинца. Пробки пробирок обернуть целлофаном.

3. Пробирки поместить в термостат на 7-10 дней при температуре 30<sup>0</sup>С.
4. По истечении времени инкубирования отметить изменение цвета лакмусовой бумажки и фильтровальной бумаги. Сделать вывод о способности микроорганизмов к образованию аммиака и сероводорода.

## **Работа 2.**

**Задание.** Приготовить пептонную воду следующего состава (г/100 мл): пептон – 2,5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2; NaCl – 0,3; pH среды – 7,2-7,4.

1. Разлить среду в пробирки по 8-10 мл и пристерилизовать при 0,5 атм 20 мин.
2. Произвести засев среды суспензией клеток микроорганизмов (0,2мл).
3. Пробирки поместить в термостат на 5-7 суток при температуре 30<sup>0</sup>С.
4. По окончанию времени культивирования провести качественную реакцию на индол в культуре и контроле – стерильной среде. Для этого на поверхность среды нанести 1-2 мл реактива Эрлиха. Появление красной окраски свидетельствует об образовании индола.

**Контрольные вопросы:** 1. Понятие «симбиотической азотфиксации». 2. Понятие «несимбиотической азотфиксации». 3. Методы изучения азотфикссирующей способности микроорганизмов

### **2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).**

**Тема: «Нитрифицирующая способность почвы»**

**2.7.1 Цель работы:** Изучить нитрифицирующую способность почвы

**2.7.2 Задачи работы:**

1. Изучить методы по определению нитрифицирующей способности почвы
2. Освоить методы по определению нитрифицирующей способности почвы

**2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Ноутбук, мультимедиа, презентация.

**2.7.4 Описание (ход) работы:**

Биологическая природа образования в почве нитратов была установлена во второй половине XIX в. Т. Шлезингом и А. Мюнцем. Первое предположение об участии микроорганизмов в этом процессе было высказано Л. Пастером. Однако выделить микроорганизмы, ответственные за процесс образования нитратов, долгое время никому не удавалось. С.Н. Виноградский применил для их выделения 'элективную' среду, представляющую собой раствор чистых минеральных солей, в том числе и сернокислого аммония, которым он пропитал пластиинки кремнекислого геля. Отсутствие органических соединений в такой среде исключало возможность развития гетеротрофов. В 1891 г. ему удалось выделить микроорганизмы, названные нитрификаторами. Они были

представлены двумя группами, каждая из которых проводила один из двух этапов окисления азота: сначала образовывались нитриты, а затем - нитраты.

Первую группу нитритных бактерий представляют роды *Nitrosomonas*. *Nitrosococcus*. *Nitrosoospira*, *Nitroso/obus*. *Nitrosovibrio*. вторую - *Nitrobacter*. *fitmspina*. *Nitrococcus*.

По современным представлениям, процесс окисления аммиака и нитритов локализуется на цитоплазматической мемbrane. Окисление аммиака до нитрата происходит ступенчато с потерей электронов. Сначала образуется гидрокисламин, который далее окисляется до нитрита.

Вторая фаза нитрификации сопровождается потерей двух электронов. Донором кислорода при окислении нитритов до нитрата служит вода.

Широко распространенные в почвах бактерии родов *Anhrobacter*, *Pseudomonas* и другие окисляют оксимы и гидроксаматы, где гидроксиламин связан с органическими молекулами. Окисление может быть связано с ростом или образованием метаболитов в стационарной фазе. Возможно, окисление происходит с участием активного кислорода, образующегося при разложении перекиси водорода пероксидазой. Таким образом, гетеротрофная нитрификация не служит источником энергии для микроорганизмов.

После того как академик Д.Н. Прянишников доказал, что растения используют соединения аммония, произошла переоценка значения нитратов для питания растений. Ранее нитраты считались наилучшей формой азотных удобрений для растений. Было показано, что растения используют не более 30-50% вносимого азота нитратов, а остальная часть в превращенном виде закрепляется в составе органического и минерального вещества почвы, иммобилизуется в клетках микроорганизмов, подвергается восстановлению до газообразных продуктов - закиси азота и  $N_2$ , вымывается в грунтовые воды, откуда они выносятся в реки, моря и океаны.

Судьба образующихся при нитрификации продуктов неоднозначна. Нитраты претерпевают следующие превращения: 1) используются высшими растениями в процессах ассимиляции. 2) вымываются в водоемы и вызывают их эвтрофизацию. 3) используются микроорганизмами в процессе ассимиляционной нитратредукции, 4) восстанавливаются до молекулярного азота в результате диссимиляционной нитратредукции или денитрификации.

Азот аммонийных и нитратных соединений, поглощенных микробными клетками, включается в органические полимеры и временно выводится из круговорота, так как он становится недоступным для растений. Процесс иммобилизации оказывается на применении удобрений: происходит снижение коэффициента использования азотных удобрений растениями в условиях микробной конкуренции за субстрат. Доля иммобилизованного азота зависит от применяемого удобрения и почвенных условий. В случае одновременного внесения в подзолистые почвы минеральных удобрений и соломы количество не превышает 20%.

Процессы микробиологического закрепления азота следует учитывать при выборе способов обработки почвы, проливоэрозионных мероприятий и при внесении удобрений.

## Работа

**Задание:** Изучить виды и морфологию микроорганизмов, способных к нитрификации. Зарисовать. Протокол оформить в тетради.

**Контрольные вопросы:** 1. Какие существуют методы по определению нитрифицирующей способности почвы? 2. Назвать основные виды микроорганизмов, способных к нитрификации

## **2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).**

**Тема: «Активность денитрификации. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы в почве»**

**2.8.1 Цель работы:** Изучить активность денитрификации и фосфатмобилизирующие микроорганизмы, обитающие в почве

### **2.8.2 Задачи работы:**

1. Изучить методы по определению активности денитрификации
2. Освоить методы по определению нитрифицирующей способности почвы
3. Освоить методы изучения фосфатмобилизирующей активности микроорганизмов, обитающих в почве

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**  
Культуры микроорганизмов, пробирки, чашки Петри с питательной средой, бактериологические петли, спиртовки, термостат.

### **2.8.4 Описание (ход) работы:**

Денитрификация – это процесс восстановления нитратов до нитритов и далее до какой-либо из газообразных форм азота (окиси азота, закиси азота и молекулярного азота).

Способность к денитрификации обнаружена у многих почвенных и водных прокариот, среди них фото- и хемотрофы. Наиболее часто она встречается у грамположительных бактерий из рода *Bacillus* и *Micrococcus*, а также у грамотрицательных микроорганизмов, принадлежащих к роду *Pseudomonas*.

Денитрификаторы – факультативные анаэробы, переключающиеся на денитрификацию только в отсутствии кислорода. В аэробных условиях эти микроорганизмы осуществляют процесс кислородного дыхания.

В анаэробных условиях денитрификаторы используют нитраты и нитриты как конечные акцепторы электронов при окислении органических субстратов для получения энергии.

В процессе денитрификации каждый из четырех восстановительных этапов катализируется специфической мембраносвязанной редуктазой. Выход энергии при денитрификации на 10% ниже, чем при кислородном дыхании.

Денитрификация – одна из причин обеднения почв азотом и неполного использования растениями вносимых в почву азотных удобрений. В то же время этот процесс имеет большое экологическое значение в связи с тем, что он восстанавливает баланс азота в атмосфере, являясь единственным источником атмосферного азота, а также предохраняет водоемы от чрезмерного накопления в них нитратов, вымываемых из почв.

Фосфор содержится в почве, как правило, в виде труднодоступных минеральных и органических соединений, которые становятся доступными для растений только после их

минерализации микроорганизмами. Минеральные вещества представлены главным образом ортофосфатами кальция (нейтральные и щелочные почвы), железа и алюминия (кислые почвы). Органические соединения фосфора встречаются в виде инозитфосфатов, фосфорсодержащих белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов и др. Микроорганизмы, синтезирующие фосфатазу, способны отщеплять от органических фосфатов фосфорную кислоту, которая, взаимодействуя с катионами, переходит в соли фосфорной кислоты, доступные для растений.

Одним из самых удобных методов выделения фосфатрастворяющих микроорганизмов является чашечный, когда активный микроорганизмы отбирают из колоний в зоне растворения фосфата. Эти зоны формируются четкими в случае, когда среда равномерно мутна, а количество нерастворимого фосфата в ней не велико. Поэтому наилучший эффект дает внесение в среду свежеосажденных солей.

Для выделения из почвы микроорганизмов, способных к растворению ортофосфатов Fe и Al, используют свежеосажденные фосфаты, которые получают из солей алюминия и железа.

## Работа 1

**Задание:** Количественное определение денитрификаторов.

На среду МПА, содержащую 0,1% KNO<sub>3</sub> и 1% агара. Провести посев методом предельных разведений. Учесть результат. О содержании денитрифицирующих бактерий в посевном материале судят по пузырькам и разрывам в агаре, образовавшимся вследствие выделения денитрификаторами газа.

## Работа 2

**Задание.** Выделить из почвы микроорганизмы, растворяющие ортофосфаты кальция. Для этого используют глюкозоаспарагиновую среду Муромцева состава (г/л): глюкоза – 10; аспарагин – 1; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,2; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; агар выщелоченный - 20; кукурузный экстракт – 0,02; вода водопроводная, pH 6,8. Стерилизация при 0,5 атм. 25 мин.

Приготовить среду, разлить по чашкам, провести посев микроорганизмов. Учесть результат. Оформить протокол в тетради.

**Контрольные вопросы:** 1. Какие микроорганизмы обладают денитрифицирующей способностью? 2. Дать определение понятию «Денитрификация». 3. Какие вам известны способы изучения денитрифицирующей способности бактерий. 4. Понятие «фосфатмобилизирующая активность микроорганизмов». 5. Способы изучения фосфатмобилизирующей активности микроорганизмов. 6. Какие вам известны питательные среды, используемые для выделения фосфатмобилизирующих микроорганизмов.

## **2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).**

**Тема: «Микробиологическое превращение соединений серы».**

**2.9.1 Цель работы:** Изучить микробиологические превращения соединений серы.

**2.9.2 Задачи работы:** Изучить методы определения способности микроорганизмов трансформировать серу.

### **2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Культуры микроорганизмов, пробирки, чашки Петри со средой, бактериологические петли, спиртовки, термостат.

### **2.9.4 Описание (ход) работы:**

Сера является одним из элементов, без которых невозможно представить существование живых организмов. В неорганической форме сера встречается в почве в виде окисленных форм – сульфатов, накапливающихся в результате биогенных процессов. Восстановленные формы – сульфиды – обычно присутствуют в первичных горных породах, особенно изверженных, в почвах с нарушенным режимом аэрации.

Сульфаты и сульфиды – основные формы минеральной серы в почвах. Все другие минеральные формы серы (тиосульфаты, политионаты и даже элементарная сера) трансформируются микроорганизмами и не накапливаются в почве.

В круговороте серы ключевые позиции микроорганизмов сохраняются. Движение серы в цикле возможно восстановительным или окислительным путями. На всех этапах цикла присутствуют микроорганизмы: аэробы и анаэробы, хемо-, фото- и гетеротрофы, истинные бактерии и археи.

**Восстановление сульфатов до органической серы.** Микроорганизмы ассимилируют сульфаты в метаболических процессах как источник серы, необходимый для биосинтеза.

**Аммонификация.** Сера – обязательный компонент серосодержащих аминокислот цистина, цистеина, метионина, входящих в состав белка и обеспечивающих связи между полипептидными цепями в белковой молекуле. Аммонификация – это один из основных источников биогенной эмиссии серы в атмосферу и почву.

**Сульфатредукция** – восстановление сульфатов до  $H_2S$ . Сульфатредуцирующие бактерии используют сульфаты в качестве окислителя органических соединений. Это узкоспециализированная группа бактерий, ведущих сульфидогенез.

Восстановление тиосульфатов до молекулярной серы ведут облигатные термофилы *Clostridium thermosulfurogenes*; в восстановлении молекулярной серы до  $H_2S$  участвуют многое анаэробные археи, в частности гипертермофильные *Pyrobaculum islandicum*. Растут они при pH 5-7, диапозоне температур 74 – более 100 °C, оптимум – 100 °C. Используют серу, тиосульфаты в качестве акцепторов водорода, факультативные хемолитоавтотрофы. Место обитания – кипящие сольфатарные поля.

В плодородных, хорошо аэрированных почвах, если при сульфатредукции и образуется локально сероводород, обычно сразу происходит реакция с образованием сульфатов и  $H_2S$  не выделяется.

Окисление восстановленных минеральных соединений серы и молекулярной серы. Активные окислители восстановленных соединений серы – скользящие трихомные серобактерии рода *Beggiatoa* с внутриклеточными включениями серы, а также *Achromatium oxaliferum* и бактерии рода *Thiothrix*. Пурпурные фотосинтезирующие серные бактерии родов *Chromatium*, *Thiospirillum* откладывают серу в виде капель, окруженной белковой мембраной; как и *Beggiatoa*, они могут окислять ее до серной кислоты.

## Работа

**Задание:** Заполнить таблицу в тетради.

Вид микроорганизма	Вид трансформации серы	Способы учета

**Контрольные вопросы:** 1. Какие виды микроорганизмов способны трансформировать серу? 2. Какие методы изучения сульфатредуцирующей активности микроорганизмов вам известны. 3. Назовите и охарактеризуйте этапы превращения серы.

### 2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

**Тема: «Дыхание почвы. Продуцирование почвой диоксида углерода (дыхание почвы) как показатель ее биологической активности»**

**2.10.1 Цель работы:** Изучить способность микроорганизмов использовать соединения углерода

**2.10.2 Задачи работы:** Освоить методы изучения способность бактерий использовать различные углеводы

#### 2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Стерильная среда с углеводом и индикатором, стерильные пробирки с пробками, исследуемая культура, стерильные пипетки, спиртовки, термостат, поплавки, спиртовки, термостат, компоненты для приготовления среды: пептон,  $K_2HPO_4$ , углеводы, 1,6 %-ный спиртовой раствор индикатора бромэтилового синего, суспензия клеток микроорганизмов в стерильной водопроводной воде.

#### 2.10.4 Описание (ход) работы:

Для выяснения способности микроорганизмов использовать те или иные углеродосодержащие вещества их высевают на плотные и жидкие среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды.

Для определения способности микроорганизмов использовать различные углеводы или многоатомные спирты часто используются цветные среды Гисса, включающие

основной фон, определённый углевод или спирт и индикатор кислотности среды. Чаще всего микроорганизмы потребляют углеводы: арабиноза, ксилоза, глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза и спирты: глицерин и маннит. Рост на средах, содержащих эти соединения, может приводить к накоплению органических кислот (вследствие чего изменяется pH среды), нейтральных продуктов или газов (вследствие чего на поверхности среды образуется пена и среда вытесняется из поплавка).

### ***Определение способа утилизации углеводов гетеротрофными бактериями.***

Для определения способа утилизации углеводов используются среды с относительно высокой концентрацией углеводов и небольшим количеством пептона, к которым добавляется индикатор. Для каждого углевода используют две пробирки. В одной из них создают анаэробные условия добавлением слоя парафина или водного агара.

Аэробные микроорганизмы, осуществляющие дыхание и не способные к брожению, развиваются на поверхности среды только в пробирках без парафина и образуют небольшое количество кислот лишь в верхнем слое среды. Микроорганизмы, способные к брожению, развиваются и образуют кислоту в обеих пробирках, но кислотность в анаэробных условиях выше, чем в первом варианте, что хорошо заметно по изменению цвета индикатора. Если брожение сопровождается образованием газов, то происходит разрыв агаризованной среды.

## **Работа 1**

**Задание:** Определить способность бактерий использовать различные углеводы и многоатомные спирты.

1. Приготовить среду следующего состава (г/ л): углевод – 10; пептон – 5,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; индикатор бромтимоловый синий – 2 мл 1,6 %-ного спиртового раствора на 1 л воды.

2. Разлить приготовленную среду в пробирки с поплавками по 9 мл и простерилизовать при 0,5 атм в течение 20 минут.

3. Произвести засев среды суспензией клеток микроорганизмов (0,2 мл).

4. Поместить пробирки в термостат при температуре 30-37°C на 2-5 суток.

5. По истечении времени инкубирования определить:

а) Наличие или отсутствие роста м/о на среде с данным источником углерода по помутнению среды, образованию плёнки или осадка.

б) Изменение цвета индикатора вследствие образования кислых или щелочных продуктов метаболизма (при pH 7,6 индикатор бромтимоловый синий имеет синий цвет, а при pH 6,0 – жёлтый).

в) Образование газа по накоплению его в поплавке.

г) Сравнить результаты наблюдений с показателями роста в контрольной (фоновой) среде, не содержащей источника углерода и занести их в таблицу. Сделать вывод по полученным результатам.

**Таблица. Использование культурой различных соединений углерода**

№	Источник углерода	Характер роста	Образование кислоты	Образование газа
1	Контрольная среда без источника углерода			
2				

3	Глюкоза			
4	Сахароза			
5	Лактоза			
6	Мальтоза			
7	Арабиноза			
8	Фруктоза			
9	Галактоза			
10	Глицерин			
11	Маннит			

## Работа 2

### Задание.

1. Приготовить среду следующего состава (г/л): углевод – 10; пептон – 2,0; NaCl – 5,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,3; агар – 3,0; индикатор бромтимоловый синий – 3 мл 1 %-ного водного раствора на 1 л среды; дистиллированная вода; рН среды 7,1 – 7,2 и простерилизовать ее при 0,5 атм в течение 20 минут.
2. Среду разлить в стерильные пробирки слоем 5-6 см.
3. Засеять ее исследуемой культурой (уколом) или суспензией клеток (0,2 мл).
4. Поверхность среды в одной из пробирок залить стерильным парафином слоем 1 см или водным агаром (15 г/л) слоем 1-2 см.
5. Пробирки поместить в термостат на 2-7 суток при температуре 30-37°C.
6. По окончании опыта проанализировать полученные результаты, занести их в таблицу и сделать вывод.

**Таблица. Способы утилизации углеводов культурой микроорганизмов**

№	Источник углерода в среде	Характер роста	Образование кислоты	Образование газа	Способ утилизации углеводов

**Контрольные вопросы:** 1. Что такое «дыхание почвы»? 2. Методы изучения способности микроорганизмов утилизировать углеводы.

### 2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

**Тема: «Методы изучения ассоциаций микроорганизмов. Выявление ризосферных микроорганизмов».**

**2.11.1 Цель работы:** Изучить методы выявления ризосферных микроорганизмов

#### **2.11.2 Задачи работы:**

1. Изучить ризосферные микроорганизмы
2. Изучить и освоить методы выявления ризосферных микроорганизмов

#### **2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Культуры микроорганизмов, чашки Петри, питательные среды, пробирки, спиртовки, бактериологические петли, термостат.

#### **2.11.4 Описание (ход) работы:**

##### **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, макоризные, эндо- и эктомакоризные грибы) и типичные патогенны.

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

Пространство и почву, окружающие формирующийся корень, называют ризосферой. Считается, что первое определение понятия ризосфера 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.

Корневые ризодепозиты включают не только экссудаты, но и все другие вещества – высокополимерные слизи полисахаридной и белковой природы, ферменты, отмирающие и слущивающиеся поверхностные клетки с их содержимым, куски тканей, корневой чехлик, корневые волоски, летучие органические вещества и др. В виде ризодепозитов растение теряет более 30-40% продуктов фотосинтеза.

Имеет место и чисто механическое воздействие растущего корня на окружающую его эконишу.

Активная секреция клетками корня различных веществ обеспечивает питательными субстратами микроорганизмы, образующие с ним прочные ассоциации как внутри корневых тканей, так и на корневой поверхности (rizoplane), а также в почве, непосредственно окружающей корни (rizosferе). В связи с этим в ризосфере и ризоплане в значительных количествах концентрируются бактерии, актиномицеты, грибы, водоросли и нематоды, существенно превышая количество этих же организмов в обычной почве. Одной из характеристик ризосферы различных растений, отражающей ее заселенность микроорганизмами, является количественное отношение R / S (rhizosphere / soil – ризосфера / почва). Величина R / S показывает, во сколько раз количество микроорганизмов определенной таксономической группы в ризосфере данного растения

превышает количество этих микроорганизмов в почве. Для большинства бактерий величина R / S колеблется от 2 до 25. 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)].

Феномен более высокой плотности микроорганизмов вокруг корня за счёт потребления экссудатов и ризодепозитов называется ризосферным эффектом. Численность микроорганизмов в ризосфере может превышать их численность в окружающей почве от нескольких % до десятков % и даже на порядок.

Общая численность микроорганизмов зависит от типа почвы, растения и др. факторов.

### Работа

**Задание:** Выделить ризосферные микроорганизмы. Подобрать питательные среды и условия культивирования. Протокол оформить в тетради.

Среда	Условия культивирования	Результат (морфология микроорганизмов - рисунок)
		

**Контрольные вопросы:** 1. Что такое ризосферные микроорганизмы? 2. Способы выделения ризосферных микроорганизмов. 3. Влияние ризосферных микроорганизмов на хранение и урожайность растений.

## 2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

**Тема:** «Методы исследования метаболитов почвенных микроорганизмов. Методы изучения ассоциаций микроорганизмов. Выявление эпифитных микроорганизмов».

**2.12.1 Цель работы:** Изучить методы исследования метаболитов почвенных микроорганизмов и выявления эпифитных микроорганизмов

### 2.12.2 Задачи работы:

1. Изучить метаболиты почвенных микроорганизмов
2. Изучить и освоить методы исследования метаболитов почвенных микроорганизмов

3. Изучить представителей эпифитных микроорганизмов.
4. Изучить методы выделения эпифитных микроорганизмов.

#### **2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Чашки Петри, питательные среды, культуры микроорганизмов, пробирки, спиртовки, термостат, растения, пробирки, бактериологические петли, предметные стекла, наборы для окраски по Граму, микроскоп, иммерсионное масло.

#### **2.11.4 Описание (ход) работы:**

##### **Методы изучения метаболизма.**

1. Определение продуктов метаболизма, которое накапливается в питательной среде.
2. Определение продуктов метаболизма, которое накапливается в самой клетке (гистохимические методы в НИИ).

Обмен веществ у бактерий может протекать только с помощью ферментов, у них их более 1000.

*По локализации делятся на:*

1. Экзоферменты
2. Эндоферменты

*По значению ферменты делятся на:*

- 1) конститтивные – Это группа ферментов, которые постоянно продуцируют в клетке. Именно они определяют основные свойства клетки.
- 2) индуцибельные – это ферменты, синтез которых начинается при появлении субстрата их действия.

Регуляция синтеза ферментов у бактерий *подчиняется определенным законам.*

Информацию о синтезе белка посыпает структурный ген, который находится под действием гена – оператора. Ген – оператор находится под действием гена – оператора. В активном состоянии ген – регулятор посыпает информацию в клетку и вырабатывается вещество репрессор. Репрессор – блокирует ген – оператор и поэтому структурный ген не работает. Такой механизм называется – репрессия. По этому механизму синтез большинства ферментов подавлен.

Если во внешней среде появляется субстрат то он начинает взаимодействовать с репрессором и ген – оператор освобождает структурный ген. В клетку идет информация о синтезе соответствующего фермента – это механизм дерепрессии, он лежит в основе синтеза индуцибельных ферментов.

В ряде случаев возможна мутация либо в гене – регуляторе, либо в гене операторе и тогда соответствующий фермент будет синтезироваться в клетке постоянно, т. е. индуцибельные ферменты превращаются в конститтивные.

Регуляция синтеза ферментов осуществляется на генетическом уровне, подавляются или активируются не ферменты, а гены, отвечающие за их синтез.

Химический состав принципиально не отличается от химического состава остальных живых существ, с той лишь разницей, что значительная доза массы приходится на долю воды. Основные химические компоненты – O<sub>2</sub>, N, H, C. По типу питания зависимость от характера источника получения углевода и азота бактерии делятся на две группы – *аутотропы и гетеротропы.*

*Аутотрофы* – это микроорганизмы, которые используют источник углерода и азота неорганические соединения – гетеротрофы – органические соединения.

Прототрофы – это микроорганизмы, способные синтезировать все необходимые органические соединения.

Аутотрофы – это микроорганизмы, которые не способны самостоятельно синтезировать необходимые соединения из внешней среды или организма хозяина.

Микроорганизмы поверхности растений называют микроорганизмами филлосферы ил эпифитными. Эпифиты представлены как типичными, характерными для данного вида растений микроорганизмами, так и случайными. Источник типичных эпифитов – растения, семена, растительные остатки, почва. Случайные могут быть занесены ветром, водой, насекомыми, птицами, грызунами из почвы и так далее.

Типичные эпифиты существуют на здоровых растениях как олиготрофы, т. е. за счет незначительных количеств питательных веществ, постоянно выделяющихся на поверхность органов растений – продуктов экзосома.

Многие эпифиты вырабатывают биологически активные вещества и существенно влияют на продуктивность растений. Способность к синтезу стимуляторов роста растений – ауксинов, гиббереллинов и цитокининов – присуща грамотрицательным протеобактериям рода *Pseudomonas*. Многие бактерии известны как продуценты витаминов. Так, молочнокислые бактерии – распространенные эпифиты – синтезируют витамины группы В. В определенных условиях эпифиты проявляют антагонизм по отношению к ряду фитопатогенных грибов и бактерий благодаря синтезу антибиотиков. Осваивая поверхность растений, эпифиты постепенно внедрялись и в их ткани, завоевывая в процессе эволюции новые экологи, что приводило к возникновению эндофитных сообществ: бактерии-эндофиты-растение-хозяин.

До 80% общего количества эпифитов составляют клетки *Erwinia herbicola*. Это грамотрицательная неспорообразующая бактерия, на МПА формирует золотисто-желтые колонии. В некотором количестве на поверхности растений обнаруживаются бактерии, фиксирующие молекулярный азот. Бациллы и актиномицеты среди эпифитных микроорганизмов мало, чаще встречаются споры разных видов грибов (*Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*).

Микрорганизмы обитают не только на стеблях, листьях и других надземных органах растений, но и на семенах. Исключение составляют семена, плотно закрытые плодовыми или семенными оболочками (плоды бобовых культур). При подмокании зерна свойственная ему эпифитная микрофлора исчезает. Начинают развиваться мицелиальные грибы (плесени – *Penicillium* и *Aspergillus*). Из бактерий в зерне сначала обильно размножаются микрококки, позднее появляются неспорообразующие палочки, а при повышенной температуре - бациллы (*Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*).

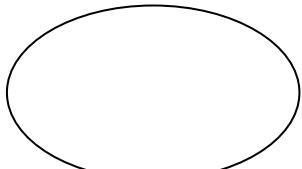
## Работа 1

**Задание:** заполнить таблицу:

Ферменты по локализации	Ферменты по назначению	Методы определения

## **Работа 2**

**Задание:** Выделить эпифитные микроорганизмы растений. Подобрать питательные среды и условия культивирования. Протокол оформить в тетради.

Среда	Условия культивирования	Результат – морфология микроорганизма (рисунок)
		

**Контрольные вопросы:** 1. Назовите деление ферментов по их назначению. 2. Назовите ферменты по их локализации в клетке. 3. Что такое эпифитные микроорганизмы? 4. Условия культивирования эпифитных микроорганизмов. 5. Влияние эпифитных микроорганизмов на хранение и урожайность растений.

### **2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).**

**Тема: «Микробиология кормов. Микробиологический анализ силоса»**

**2.13.1 Цель работы:** Изучить микробиологию кормов

**2.13.2 Задачи работы:**

1. Изучить микробиологию силоса
2. Освоить методы изучения микрофлоры силоса

**2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Весы, разновесы, метиленовый синий, раствор Люголя, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки на 1 мл, стерильная вода в пробирках по 9 мл и колбах по 50 мл, предметные стекла, микроскопы, иммерсионное масло, сусло-агар с мелом, капустный агар с мелом, пептонный агар, сусло-агар со стрептомицином, картофельная среда с мелом, МПБ, МПА, среда Кесслера, среда Булира.

**2.13.4 Описание (ход) работы:**

**Микрофлора силоса.** Силосование - консервирование кормовой массы без доступа воздуха. Силосование является наиболее распространенным способом заготовки сочных кормов. В основе силосования лежит молочнокислое брожение. Молочнокислые бактерии сбраживают сахара силосующихся растений в молочную и частично - в уксусную кислоты, подавляющие развитие гнилостных, маслянокислых и других бактерий, ухудшающих качество корма.

Молочнокислые бактерии снижают pH корма до 4,2-4,0. Если pH силоса становится выше 4,7, то создаются условия, благоприятные для жизнедеятельности микроорганизмов,

ухудшающих качество корма. В нем накапливаются масляная кислота, амины, аммиак и другие продукты.

Для обеспечения нормального развития молочнокислых бактерий в процессе силосования необходимы достаточное содержание сахара в силосующихся растениях и анаэробные условия. Плесневые грибы переносят сильное подкисление, но являются строгими аэробами, поэтому в хорошо спрессованном, укрытом, заквашенном корме размножаться не могут.

Во время брожения с распадом сахаров увеличивается количество органических кислот. Снижение pH зависит от образования молочной и уксусной кислот, от буферности растительного материала, которая, в свою очередь, обуславливается присутствием белка, солей. Чем выше буферность растительной массы, тем больше нужно кислот, чтобы снизить pH корма. Поэтому, несмотря на накопление кислот, pH среды почти не снижается до тех пор, пока не будет израсходован весь материал, обеспечивающий буферность. Связанные буферным материалом кислоты образуют в силюсе запас связанных кислот. Более буферное исходное сырье для получения силюса хорошего качества должно иметь больше сахаров, чем менее буферное. Силосуемость растений определяется их специфическими буферными свойствами.

Сахарный минимум данного растительного сырья - наименьшее количество сахара, необходимое для образования такого количества молочной и уксусной кислот, которое может сместить pH до 4,0.

Растения хорошо силосуются, если в них много сахара, а сахарный минимум небольшой. Если фактическое содержание сахара в растениях примерно равно сахарному минимуму, то они силосуются плохо и малейшее отклонение в процессе силосования приводит к порче корма. Если фактическое содержание сахара меньше сахарного минимума, то растения вовсе не силосуются.

Хороший силюс характеризуется следующими показателями: цвет - оливково-зеленый, запах - приятный, pH – 4-4,2, общая кислотность – 2-2,5%, влажность - 70%.

Микрофлора хорошего силюса представлена молочнокислыми палочками и лактобактериями, часто в небольших количествах встречаются дрожжи. Последние образуют эфиры, придающие силюсу приятный запах, и обогащают корм белком и витаминами. Однако в больших количествах дрожжи ухудшают качество силюса - снижают его кислотность, так как являются конкурентами молочнокислых бактерий в потреблении сахара.

В первый период после закладки силюса бурно развивается микрофлора смешанной фазы брожения, обычно обитающая на поверхности здоровых растений: гнилостные бактерии, бактерии группы кишечной палочки и др. При подкислении корма их сменяют молочнокислые лактобактерии, а затем более кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Через две недели микробиологические процессы в силюсе, в основном, заканчиваются.

## Работа

**Задание.** Провести количественное и качественное исследование микрофлоры силюса.

Для анализа из торцевой части траншеи, ямы или наземных буртов берут среднюю пробу силюса. Сняв стерильным ножом верхний слой, вырезают кубики по средней линии бурта с интервалом в 1 м. Их складывают в стерильную стеклянную банку на 1-2 л с

притертоя пробкой так, чтобы силос был уложен плотно и доверху. Пробы перемешивают в стерильном кристаллизаторе, измельчают стерильными ножницами и берут навески для анализов. Исследование проводят не позднее одних суток после взятия пробы.

Готовят мазок-отпечаток: для этого берут пинцетом немного силоса и плотно прижимают его к предметному стеклу без добавления воды так, чтобы на стекле остался отпечаток. Препарат сушат на воздухе, фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим (2-3 мин). Смыв краситель водопроводной водой и высушив, препарат микроскопируют с иммерсионной системой.

На препарате видны тонкие спорообразующие палочки, варьирующие в размере, и молочнокислые лактокоокки. Среди них обычно преобладают *Lactobacillus plantarum* - гомоферментативные мезофильные короткие палочки, часто располагающиеся параллельными рядами. Встречаются клетки почкообразующих дрожжей, спорообразующие бактерии обнаруживаются редко. В некачественном силосе на препарате видны спорообразующие палочки, а также плесневые грибы.

Для количественных исследований микрофлоры, навеску силоса 5 г помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 2-3 г песка. Колбу взбалтывают круговыми врачаательными движениями 10 мин. Из полученной вытяжки готовят разведения ( $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ), из которых 1 мл суспензии глубинным посевом и 0,05 суспензии поверхностным засевают на элективные питательные среды. Посевы инкубируют при  $28^{\circ}\text{C}$ .

Для определения количества молочнокислых бактерий используют глубинный посев на сусло-агаре или на капустном агаре с добавлением мела. Вокруг колоний молочнокислых бактерий вследствие накопления через 5-6 суток молочной кислоты образуются зоны растворения мела.

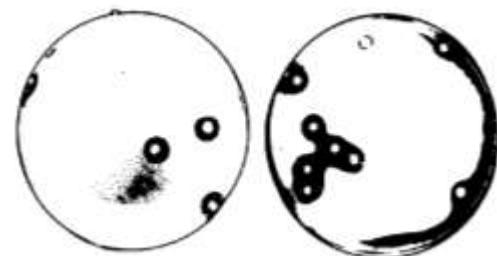


Рис. Колонии молочнокислых бактерий в зоне растворения мела

Для определения количества аэробных гнилостных микроорганизмов исследуемый материал засевают глубинным посевом на пептонный агар. Подсчет колоний ведут на 5-7-е сут.

Количество микроскопических грибов и дрожжей определяют на сусло-агаре со стрептомицином поверхностным посевом. Подсчет колоний ведут на 3-4-е сут, при необходимости повторно - на 7-8-е сутки.

Титр маслянокислых бактерий устанавливают на картофельной среде. Для определения количества спор маслянокислых бактерий делают посев из суспензии после ее пастеризации в течение 10 мин при  $75^{\circ}\text{C}$ . Учет ведут по интенсивности выделения газа (кусочки картофеля всплывают), титр маслянокислых бактерий и их спор устанавливают методом предельных разведений по Мак-Креди.

Аэробные протеолитические бактерии учитывают на МПБ по накоплению газа в поплавках. Посевы выдерживают при 28°C 2 недели.

При анализе силоса определяют наличие спор аэробных гнилостных бацилл. Для этого на МПА делают поверхностный посев, чашки инкубируют при 28°C в течение 4-ёх суток.

Бактерии группы кишечной палочки учитывают на среде Кесслера или среде Булира по выделению газа и накоплению его в поплавках. Пробирки выдерживают 48 ч при 40-42 °C.

Доминирующие на плотных средах выросшие колонии микроскопируют. Для обнаружения маслянокислых бактерий из пробирок с картофелем готовят препарат в раздавленной капле с добавлением раствора Люголя.

По окончании анализа заполнить таблицу и сделать вывод о качестве силоса.

**Таблица. Микрофлора силоса**

№ пробы	Молочно-кислые бактерии (КОЕ/г)	Аэробные гнилостные микроорганизмы (КОЕ/г)	Грибы (КОЕ/г)		Аэробные протеолитические бактерии (КОЕ/г)	БГКП (КОЕ/г)
			Микромицеты	Дрожжи		

**Контрольные вопросы:** 1. Какое брожение лежит в основе силосования кормов? 2. Что такое сахарный минимум? 3. Какие группы микроорганизмов развиваются при созревании силоса? 4. Каковы фазы развития микрофлоры? 5. Каковы значения pH хорошего силоса? 6. Какие условия способствуют получению силоса хорошего качества?

## **2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).**

**Тема: «Изучение культур, используемых при получении биопрепаратов».**

**2.14.1 Цель работы:** Изучить культуры, используемые для приготовления биопрепаратов

### **2.14.2 Задачи работы:**

1. Изучить критерии отбора микроорганизмов
2. Изучить технику приготовления биопрепаратов
3. Изучить методы контроля качества биопрепаратов

### **2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Ампула с биопрепаратом, чашки Петри, питательные среды, пробирки, бактериологические петли, спиртовка, термостат.

#### **2.14.4 Описание (ход) работы:**

##### **Биопрепараты для сельского хозяйства**

Микроорганизмы играют большую роль в повышении плодородия почвы, так как в процессе роста и развития улучшают ее структуру, обогащают питательными веществами, способствуют более полному использованию удобрений.

Интенсивное растениеводство обедняет почву азотом, для восстановления и улучшения почв существует практика использования бобовых растений, способных в симбиозе с азотфиксирующими микроорганизмами восполнять почвенные запасы азота в результате **диазотрофности**.

Впервые наличие бактерий в клубеньках на корнях бобовых растений описали Лахман в 1858 и Воронин в 1866 году.

Чистая культура азотфиксаторов была получена Бейеринком в 1888 году. Виноградский в 1893 году впервые выделил анаэробную спороносную бактерию, фиксирующую молекулярный азот, назвав ее в честь великого Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*;

в 1901 году Бейеринк открыл вторую свободноживущую азотфиксирующую бактерию *Azotobacter*. Высокая продуктивность азотфиксации у *Azotobacter* стала использоваться для интродуктирования этих бактерий в почву с целью восполнения ресурсов азота.

Практическое применение нашли также симбиотические бактерии рода *Rhizobium*, развивающиеся в клубеньках бобовых растений.

Как только была выяснена роль симбиотических бактерий рода *Rhizobium* в азотфиксации, стали разрабатывать способы внесения этих микроорганизмов в почву и также для инокуляции семян.

**Технология получения азотных биоудобрений.** Наиболее простой способ инокуляции основан на использовании почвы после выращивания на ней бобовых растений. Недостаток метода – необходимость перемещения достаточно больших объемов почвы, а также возможность распространения болезней. Более эффективным оказалось применение для инокуляции семян специальных препаратов азотфиксирующих бактерий.

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, развиваясь в корневой системе бобовых растений, в симбиозе с ними фиксируют атмосферный азот, обеспечивая этим азотное питание растений.

Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью по отношению к растению-хозяину. Эта особенность азотфиксаторов положена в основу их классификации внутри рода *Rhizobium*.

Взаимоотношение бактерий с растениями зависит от физиологического состояния и условия роста растений, а также физиологической активности и вирулентности бактерий. Существенное влияние на процесс образования клубеньков оказывают температура и влажность почвы, наличие в ней биогенных элементов.

**Первая коммерческая разновидность культуры для инокуляции семян («Nitragin»)** была запатентована в Великобритании Ноббе и Хилтнером в 1896 году.

Бактерии выращивали на агаризованных средах, далее соскабливали с поверхности плотной среды и суспендировали в молоке. Суспензию бактерий выливали на кучу семян, перемешивали и далее семена высушивали в тени. Вскоре семена высевали. Данный метод пригоден для инокуляции сравнительно небольших объемов семян и применялся во

многих странах с конца тридцатых до начала семидесятых годов. Затем в ряде европейских стран объемы использования метода сократились. Такие препараты азотфикссирующих бактерий после высушивания быстро погибают, этого недостатка лишены препараты инокулята на торфяной основе. Бактерии выращивают обычным способом в глубинной культуре в стерильных условиях до достижения достаточно высокой плотности культуры. Далее просушенный, измельченный торф доводят до pH 6.5–7.0 и смешивают с жидкой культурой. Препарат бактерий на торфяной основе в течение нескольких суток созревает. Затем его вновь перемешивают и фасуют в полиэтиленовые мешочки, которые герметизируют. При хранении препарата в условиях пониженной температуры жизнеспособность инокулята сохраняется до 90 недель. При благоприятных условиях культуру можно хранить в течение года.

В настоящее время для поддержания жизнеспособности симбиотических азотфикссирующих бактерий лучшим носителем считается торф.

Выпускают сухой нитрагин – препарат бактерий с содержанием в 1 г не менее 9 млрд. жизнеспособных клеток, в качестве наполнителя используют мел, каолин, бентонит.

Аналог азотных удобрений – другой препарат азотфикссирующих бактерий – «Азотбактерин», который выпускается промышленностью в нескольких вариантах. Бактерии рода *Azotobacter* являются свободноживущими азотфикссирующими микроорганизмами и обладают высокой продуктивностью азотфиксации.

Технология получения сухого препарата азотбактерина включает получение посевного материала и культивирование бактерий в контролируемых условиях в глубинной стерильной культуре до начала стационарной фазы.

Промышленностью выпускаются также торфяной и почвенный препараты азотбактерина. Для этого в качестве наполнителя используют разлагающийся торф с нейтральной реакцией среды или богатую перегноем почву. Способ применения азотбактерина определяется посевным материалом: семена зерновых культур опудривают сухим препаратом механизированным способом; клубни картофеля и корневую систему рассады овощных культур равномерно обрабатывают водной суспензией препарата.

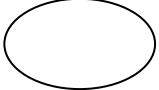
В последние годы для изучения биологической азотфиксации стали применять методы молекулярной биологии и новейшие методы генетики. Установлена возможность с помощью колифага  $R_1$  размножать свободноживущую азотфикссирующую бактерию *Klebsiella pneumoniae* M5 и с ее помощью трансдуцировать *nif*-гены (гены азотфиксации).

Конструирование самопереносящихся плазмид, несущих гены азотфиксации, позволило передать диазотрофность нефикссирующим азот видам: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia herbicola*, *Ps. fluorescens*; без получения экспрессии *nif*-гены были клонированы также в дрожжах.

## Работа

**Задание:** Выделить из биопрепарата культуру микроорганизмов. Для этого подобрать питательную среду и условия культивирования. Протокол оформить в тетради.

препарат	Питательная среда	Результат (рисунок)

		
--	--	-------------------------------------------------------------------------------------

**Контрольные вопросы:** 1. Какие микроорганизмы используют для приготовления биопрепаратов? 2. Какие биопрепараты, применяемые в сельском хозяйстве, вам известны? 3. Как применяют биопрепараты в сельском хозяйстве? 4. Контроль качества биопрепаратов.

## **2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).**

**Тема: «Использование антибиотиков в кормлении животных».**

**2.15.1 Цель работы:** Изучить возможность использования антибиотиков в кормлении животных.

### **2.15.2 Задачи работы:**

1. Определить допустимые количества антибиотиков в кормлении животных
2. Изучить действие антибиотиков на организм животных и человека

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:** ампулы с антибиотиками, микроорганизмы, чашки Петри, бактериологические петли, пробирки, спиртовки, термостат, холодильник.

### **2.15.4 Описание (ход) работы:**

Введением в рацион молодых животных небольших количеств антибиотиков (5-10 г на 1 т) можно ускорить рост и уменьшить отход молодняка в период выращивания.

Так, в опытах А. Х. Саркисова с сотрудниками при добавке в корм цыплятам (поголовье более 200 тыс.) пенициллина (40 мг/кг) или биомицина (20 мг/кг) отход молодняка был сокращен в 2-3 раза, а приросты живой массы повысились на 6-15%.

Куры-несушки при введении в корм антибиотиков дают значительно больше яиц. Например, А. Мюллер (Чехословакия) провел опыт по испытанию действия прокайнпенициллина на яйценоскость кур.

В первый месяц яйценоскость повысилась на 15%, во второй - на 40, в третий - на 79, в четвертый - на 50 и в пятый - на 22%. Стимуляционный эффект от антибиотиков был получен также исследователями, работавшими с водоплавающей птицей.

Весьма рентабельно введение антибиотиков в рационы свиней. Поэтому в свиноводстве антибиотики широко применяются. Опыты показывают, что пороссята, которым в корм добавляли антибиотики, в двухмесячном возрасте весили на 1,5-1,7 кг больше, чем не получавшие препаратов. Свиньи при мясном откорме с добавлением антибиотиков весили на 8-10 кг больше контрольных. В общем, антибиотики увеличивают массу животных за период откорма на 15-20%.

Значительное число опытов по кормлению телят с использованием антибиотиков было проведено как в СНГ, так и за рубежом. Показано, что телята в возрасте 7-8 недель под действием антибиотиков увеличивают прирост живой массы на 22-85%, а в возрасте около 12 недель - на 20-35%.

Введение антибиотиков в рацион дойных коров заметного влияния на лактацию не оказывает. В условиях пастбищного содержания антибиотики не влияют на животных,

положительное действие препаратов проявляется, когда коровы находятся в стойле. При кормлении ягнят антибиотики имеют главным образом профилактическое значение против желудочно-кишечных заболеваний, авитаминозов и пневмонии.

Подкормка жеребят антибиотическими веществами способствует их развитию и, в частности, повышению плотности костей. Введение в корм антибиотиков улучшает рост собак, лисиц, норок и т. д. Для добавки в комбикорма и в кормовые рационы использовали разнообразные антибиотические вещества - биомицин, тетрациклин, стрептомицин, пенициллин и т. д.

Некоторые антибиотики, использованные в животноводстве, применялись в медицине и ветеринарии. Поэтому возникает опасность появления в окружающей среде устойчивых форм патогенных микроорганизмов и снижения (а возможно, и уничтожения) лечебного эффекта антибиотических веществ при заболевании людей и животных. В связи с этим возникла проблема ограничения использования медицинских антибиотиков для кормовых целей и консервирования продуктов. Особенно это относится к соединениям, фиксируемым тканями животных. Ставится вопрос о применении для нелечебных целей специальных антибиотиков.

Как же влияют антибиотики, добавляемые в незначительных количествах в корм, на организм животных? Несмотря на большую исследовательскую работу, этот вопрос еще окончательно не решен.

Не исключено, что антибиотики повышают защитные свойства животного, благодаря чему снижается влияние субклинических инфекций, которые нередко служат главной причиной замедленного развития молодняка. При этом активно подавляются клинические проявления инфекционных болезней.

Отмечен стимуляционный эффект низких доз антибиотиков при скармливании их стерильно выращенным животным. Подобные опыты ставились с цыплятами и поросятами. Стерильных поросят получали путем кесарева сечения и воспитания животных на стерильном корме. Отсюда можно заключить, что антибиотики оказывают положительное действие, не только изменяя микрофлору желудочно-кишечного тракта.

У нестерильных животных, получавших рацион с антибиотиками, повышалась средняя масса рождающегося потомства, что свидетельствует о положительном влиянии антибиотиков на рост эмбрионов.

Таким образом, ростовой эффект антибиотиков - сложный и комплексный. Частично он связан с воздействием на микрофлору кишечника. Однако антибиотики и непосредственно влияют на организм животного - у него усиливается аппетит, секреция пищеварительных ферментов, гормонов и т. д. Поэтому антибиотики могут считаться стимуляторами роста, то есть соединениями, проявляющими функцию, свойственную и другим химическим веществам.

Среди ученых, много сделавших в области изучения кормовых антибиотиков в СНГ следует отметить Н. А. Красильникова - автора ряда ценных препаратов (кормогризина, витамицина и др.), работавшего в Институте микробиологии.

Кормогризин получают при глубинной ферментации микробы на среде, содержащей кукурузную муку, крахмал и минеральные соли (продуцент *Str. griseus*). Антибиотик обладает малой токсичностью, но угнетает развитие значительного количества бактерий, грибов и дрожжей. Используют высушеннную массу мицелия *Str. griseus*, которую добавляют в корм. Препарат предложен как ростостимулирующая добавка, оказывающая положительное влияние на обмен веществ у животных. Хороший эффект получен при использовании кормогризина для откорма свиней, а также индеек, гусей и другой птицы. Антибиотик не проникает из кишечного тракта в организм животного.

Продуцентами кормового антибиотика бацитрацина являются *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis*. Антибиотик дает хорошие результаты при откорме телят и введении в

рацион кур-несушек. Бацилларин почти не всасывается из пищеварительного тракта и не накапливается в тканях.

Витамицин продуцируется стрептомицетом *Str. aureverticillatus*. Препарат представляет собой высушеннную культуральную жидкость вместе с мицелием. Установлено, что биологическая активность витамина может компенсировать недостачу в кормах витамина А. Препарат ускоряет рост животных и позволяет экономить корма.

Кормарин вырабатывается культурой *Str. aurigineus*. Препарат готовят из смеси культуральной жидкости и мицелия-продуцента, высущенных на распылительной установке. Он содержит витамины группы В, гормоноподобные вещества и другие факторы роста. Использование кормарина в рационах животных и птицы повышает приросты живой массы, улучшает обмен веществ и усвояемость компонентов корма.

Кормовые антибиотики широко используют за рубежом. Например, в США в последние годы они были выработаны на сумму около 300 млн. долларов. Список зарубежных препаратов достаточно велик, здесь отметим лишь некоторые, наиболее распространенные.

Флавомицин (продуцент *Str. bambergiensis*) применяют как стимулятор роста свиней. Кормовой антибиотик виргиниемицин (продуцент *Str. virginiae*) продается более чем в 40 странах. Это хороший стимулятор роста, с длительным действием при выращивании животных. В значительных количествах применяют румензин (продуцент *Str. cinnamonensis*), улучшающий переваривание ости корма за счет замедления скорости его прохождения по пищеварительному тракту. Имеются сведения о широком использовании тилозина (продуцент *Str. fradiae*), обладающего широким антимикробным спектром, но в основном действующим на грамположительные микроорганизмы. На кишечную палочку, в частности, он действует слабо. Введение препарата в кормовой рацион свиней способствует большему приросту живой массы, чем другие антибиотики.

Таким образом, для выработки кормовых антибиотиков в основном используют культуры актиномицетов.

## Работа

**Задание:** Заполнить таблицу

Антибиотик	Эффект

**Контрольные вопросы:** 1. Какие антибиотики используют для кормления животных? 2. Что такое кормовые антибиотики? 3. Влияние антибиотиков на организм животных и человека.

### 2.16-17 Лабораторная работа №16-17 (2 часа).

**Тема:** «Микробиологическая трансформация отходов в АПК».

**2.16-17.1 Цель работы:** Изучить способы микробиологической трансформации отходов в АПК

#### 2.16-17.2 Задачи работы:

1. Изучить методы трансформации отходов в АПК
2. Изучить группы микроорганизмов, используемые для трансформации отходов в АПК.

**2.16-17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:** культуры микроорганизмов, чашки Петри с питательной средой, бактериологические петли, спиртовки, термостат, холодильник, предметные стекла, микроскоп.

**2.16-17.4 Описание (ход) работы:**

Старые технологии утилизации отходов стали убыточными. Возросла стоимость энергоносителей, а для хранения навоза или помета приходится выводить из оборота тысячи гектаров сельскохозяйственных угодий. Кроме того, размещение вблизи больших городов крупных животноводческих комплексов и птицефабрик приводит к загрязнению водных бассейнов и в целом окружающей среды.

Использование навоза в качестве только удобрения (традиционный способ) уже не может считаться универсальным и эффективным. Необходимы современные энергосберегающие эффективные технологии.

Технологии переработки помета, навоза путем обезвоживания и дальнейшей стерилизации весьма энергоемки. Термическая обработка жидкой или твердой фракции высокими температурами приводит не только к потерям элементов питания для растений, но и образованию канцерогенов. К тому же основными требованиями к технологиям переработки отходов животноводства и получения из них органических удобрений являются сохранение их биологической активности и максимальное содержание соединений азота, фосфора и других элементов.

Одним из возможных способов утилизации отходов животноводства является биологическая переработка с использованием микро- и макроорганизмов, позволяющая быстро и эффективно перерабатывать значительное количество навоза и помета.

Перспективным способом биологической утилизации отходов животноводства является культивирование на них микроорганизмов. Для ферментации навоза используют главным образом мицелиальные грибы (твердофазное культивирование), а на навозных стоках осуществляют глубинное культивирование бактерий, дрожжей и грибов. Выращивание бактериальных культур на отходах животноводческих комплексов не получило широкого распространения из-за ограниченного применения бактерий на кормовые нужды. Выращивание дрожжей позволяет произвести «облагораживание» стоков (свиноферм и ферм крупного рогатого скота) и получить дешевые кормовые добавки и бактериальные препараты.

Микробная биотехнология способна вовлечь в производство кормовых препаратов и добавок огромные массы жидких и плотных отходов агропромышленного комплекса растительного и животного происхождения.

Существует широкий круг микроорганизмов, способных потреблять вторичные продукты сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности с образованием микробной биомассы. Самыми перспективными являются быстрорастущие микроорганизмы, способные усваивать не гидролизованные сельскохозяйственные отходы. В наибольшей степени этим требованиям соответствуют мицелиальные грибы и дрожжи. Жидкие и плотные отходы могут быть трансформированы в кормовые препараты, обогащенные микробным белком. Известно, что концентрированные стоки являются, по существу, готовой питательной средой для этих микроорганизмов, так как содержат все необходимые компоненты, включая витамины и микроэлементы.

Компостирование органических отходов с добавлением микроорганизмов, биоферmentationия помета и навоза при 70-85°C позволяют получать ценное органическое удобрение, необходимое для повышения плодородия почвы и получения экологически чистой сельскохозяйственной продукции.

Кроме того, рациональное использование животноводческих стоков позволяет получить дополнительный урожай, в денежном выражении оценивающийся эквивалентно использованию 650 тыс. т азотных, 300 тыс. т фосфорных и 600 тыс. т калийных удобрений на всей пашне Российской Федерации.

В целом же наилучшим способом удаления отходов по экономическим и экологическим соображениям является их использование в качестве вторичного сырья. Указанные выше способы биоконверсии отходов могут дать, иногда неожиданно, весьма существенный результат с благоприятными последствиями для развития биотехнологии и энергетики. К сожалению, большинство из них реализуется очень плохо.

По мере развития животноводства количество и качество отходов будет существенно увеличиваться и изменяться, и острота проблемы их утилизации усугубится. Усилия специалистов должны быть направлены на сохранение отходов, переработку и использование для увеличения продуктивности дешевого топливно-энергетического ресурса (жидкого или газового биотоплива).

Энергоемкие технологии по переработке навоза и помета не могут быть использованы в настоящее время, несмотря на их достоинство (технологическое). Ставится вопрос о разработке особой дешевой системы обработки и удаления отходов, их эффективного использования. Прежде всего это касается биотехнологических методов переработки отходов и превращения их в ценное сырье для получения кормов, горючих материалов, удобрений и сырья для химической промышленности.

Разработаны технологии утилизации отходов сельского хозяйства в специальных установках — биореакторах, биоферmentерах (биоферментаторах), модулях, метантенках и т.д. В них, как правило, микробиологическая трансформация отходов осуществляется за счет аэробно-анаэробных процессов. Биотехнологии имеют существенные преимущества перед компостированием за счет снижения потерь питательных веществ в перерабатываемом исходном сырье, значительного повышения экологической чистоты конечных (вторичных) продуктов и сокращения времени переработки сырья.

Управление процессом биоферментации отходов позволяет интенсифицировать минерализацию исходного субстрата, активизировать биосинтез новых соединений и улучшить питательные свойства конечных целевых продуктов. «Сгорание» органической массы можно регулировать физическими, химическими и биологическими воздействиями. В последнем случае активизируются микроорганизмы исходного субстрата или внесенные смешанные микробоценозы, а их ферментные системы преобразуют субстрат в необходимом направлении, ускоряя процессы распада органического материала и микробного синтеза. Получаются продукты заданного качества, будь то органические удобрения или кормовые добавки, субстраты для микробиологической промышленности или почвогрунты для теплиц.

**Получение водорода** микробиологическим путем — биотехнологическое решение XXI в. Водород является идеальным химическим носителем энергии. Сжигание его при высоких температурах дает большое количество полезной энергии с высоким КПД.

Микробиологическое получение водорода в настоящее время развивается, хотя прямое биотехнологическое получение водорода на основе процесса, аналогичного фотосинтезу, или анаэробного сбраживания дискутируется. Уже сейчас кажется, принципиально возможным путем комбинации техники фиксированных биокатализаторов и генной технологии на основе фотосинтезирующих биосистем достичь результатов, аналогичных результатам с фотоклетками. Для получения водорода из органических отходов путем анаэробной ферментации селекционируются новые виды микроорганизмов, способные производить водород вместо метана.

В Японии исследован процесс образования водорода из метана при сбраживании рисовой соломы, кухонных отходов, лошадиного навоза и метанового ила. Исследователи Великобритании изучили процесс образования водорода с помощью использующих метан бактерий *Methylomonas alvus*, *Methylosinus trichosporium*.

**Производство биогаза** в процессе метанового брожения широко распространено в мире. За счет конверсии отходов системой метаногенеза может быть получено условное топливо, измеряемое миллиардами тонн. Оставшуюся в результате метановой ферментации биомассу можно использовать как удобрение. Переработка отходов за счет метанового брожения — наиболее экономичный и эффективный метод очистки территорий, прилегающих к животноводческому комплексу. Конверсия биомассы животноводческих комплексов в газообразное топливо служит дополнительным энергоносителем в сельском хозяйстве. Переработка отходов метановым брожением — наиболее экономичный и эффективный метод очистки сточных вод, утилизации твердых отходов промышленности, сельского хозяйства, коммунально-бытовых отходов. Более 30 лет работают биореакторы на получение очищенного метана. Разрабатываются в основном методы очистки биогаза от примесей.

Для получения газа во Франции городские отходы подвергают ферментации в смеси с водорослями. Производительность таких установок составляет 421 л газа на 1 кг органического вещества. Газ содержит 60% CH<sub>4</sub> и 40% CO<sub>2</sub>.

Большой производительностью по метану обладают разработанные в США биореакторы, использующие магнитотаксисные бактерии. В конструкцию биореактора включают устройство для создания внутреннего локального магнитного поля, привлекающего магнитотаксисные бактерии. Бактериальные продуценты биогаза мигрируют в область магнитного поля, концентрируются в окружающей зоне биореактора и не вымываются из него при вводе свежих порций органических отходов и удалении остатков.

Показана целесообразность добавок целлюлозосодержащих материалов в качестве косубстрата при осуществлении анаэробной ферментации свиного навоза в биогаз. Оптимальная концентрация целлюлозы в составе субстрата (навоз с содержанием сухих веществ 2,8-3,0%) - 40 г/л, выход биогаза - 0,6 л на 1 г целлюлозы.

**Технология получения молочной кислоты.** Рекомбинантный штамм дрожжей, содержащий ген лактатде-гидрогеназы (*ldh*), в больших количествах может продуцировать молочную кислоту. При производстве молочных продуктов (сыра, творога) в процессе получения белкового сгустка из молока выделяется молочная сыворотка, которая содержит 50% сухих веществ молока. Молочная сыворотка — нестойкое сырье, которое необходимо либо немедленно использовать, либо консервировать. Используют ее для добавления в корма, получения напитков и лактозы, обогащения пищевых продуктов и полуфабрикатов, а также в качестве питательной среды для микроорганизмов при получении молочной кислоты, спирта, кормовых дрожжей и др. По статистическим данным. 48-88% получаемой во всем мире сыворотки идет на корм скоту, 0,5-4,0% - на технические и 7-52% - на пищевые цели.

Состав молочной сыворотки заметно варьирует в зависимости от качества исходного сырья, характера готового продукта, способа отделения белка (сквашивание, ферментный способ). Наличие в сыворотке легкоусвояемых источников углерода (лактоза - молочный сахар, в меньших количествах - глюкоза, галактоза и др.) и ростовых веществ позволяет считать ее перспективным сырьем в биотехнологических процессах.

На молочной сыворотке можно выращивать поверхностным и глубинным способами микроскопические грибы (*Penicillium roqueforti*, *Rhizopus oligosporus*, *Morchella* и др.). В Канаде разработан способ выращивания культуры сморчков с выходом биомассы гриба около 25-26 г/л. Известны способы получения кормовых биомасс на основе смешанной культуры микроскопических грибов и бактерий (*Lactobacterium*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Candida utilis*, *Brettanomyces anomalus* и др.). При культивировании дрожжевых микроорганизмов на сыворотке необходимо внесение дополнительных источников азота в виде мочевины, сернокислого аммония и амиака в количестве до 1%, что способствует повышению содержания белка в дрожжах в 2-4 раза.

Главное достоинство перспективных биотехнологий переработки отходов — экономичность и экологичность. Снижение количества загрязнений при внедрении новых технологических приемов и процессов должно достигаться за счет использования отработанных продуктов, автоматизированного управления процессами, использования быстрорастущих суперактивных штаммов микроорганизмов, адаптированных к деградации определенных субстратов, или полученных методом генной инженерии новых микроорганизмов или их сообществ.

В любом случае по теории стабильного развития органические отходы должны рассматриваться как источник питательных веществ, как носитель энергии. Существующие отходы должны утилизироваться, когда это технически возможно и когда стоимость этого является разумной. Только в исключительных случаях отходы отправляются на свалку или длительное хранение.

**Получение спирта-сырца из муниципальных отходов.** Просеянные и измельченные отходы в количестве 6—8% сухого вещества от рабочего объема вместе с питательными солями и водой стерилизуют, что позволяет одновременно запарить сырье и деаэрировать питательную среду. Подают засевной материал из инокулятора в количестве 15—20% от рабочего объема. Ферментацию продолжают семь суток при периодическом перемешивании и pH 5,0. В ходе ферментации периодически создают вакуум (46,1 кПа) для отделения и конденсации паров этанола (спирта-сырца). В зависимости от степени конверсии углеводных фракций субстрата предусматривается замкнутый цикл непереработанного сырья. По окончании ферментации твердый осадок отделяют от жидкости и используют в качестве удобрения или структуриатора почвы. Культуральную жидкость направляют в инокулятор для дальнейшего наращивания биомассы бактерий. Спирт-сырец отправляют на дальнейшую очистку ректификацией.

Биоконверсия теоретически позволяет получать спирт при рентабельности 65—70%. При ферментации древесных опилок с содержанием лигнина 22% с учетом 86%-ной (минимальной) степени конверсии углеводной части сырья выход этанола составляет 28,7% от исходного количества сырья. Для ферментации соломы теоретический выход этанола — 32,6% от исходного сырья; для пшеничных отрубей — 15,2%. Продолжительность ферментации при этом 7—10 суток (для опилок и древесных отходов).

В ФРГ получают этанол из растительных, сельскохозяйственных и пищевых отходов с помощью катализаторов, потребляя менее 1% энергии. Микроорганизмы полностью перерабатывают исходное сырье, побочные продукты (витамины, белки, биологические удобрения) разделяют на ионообменниках. При переработке домашних отходов получают спирт и метан, используемые в качестве энергоносителей.

Главным преимуществом биоконверсии является экологическая чистота, связанная с сокращением или полным отсутствием фенола, фурфурола, формальдегида, неорганических кислот и других токсичных веществ, накапливающихся в местах размещения целлюлозно-бумажных комбинатов и мусорных свалок. Технология переработки является безотходной, так как все продукты могут реализоваться (этанол, этанол-ацетатная смесь, незакисленный лигнин для адсорбирующих препаратов, диоксид углерода). При этом используется широкий список потребляемых (перерабатываемых) субстратов и смешанные и монокультуры бактерий, способные конвертировать целлюлозосодержащие материалы.

Для обеспечения стабильности ассоциаций микроорганизмов разработаны различные комбинации (например, одна из них: *Clostridium*, *Thermoanaerobium* и *Thermonaerobacter*) и методы их хранения, выбор рабочей смешанной культуры бактерий в зависимости от вида целлюлозосодержащего сырья и типа целевого продукта.

Кроме того, для ферментации отработаны режимы аэрации, способствующие сусpenдированию твердой фазы и активизации процесса, а дробная подача исходного

субстрата в ферментационный объем повышает степень конверсии сырья на 50%. Предлагаются возможные схемы процессов утилизации различных промышленных, сельскохозяйственных и муниципальных целлюлозосодержащих отходов.

**Продукты вермикультуризации.** В животноводстве биомасса червей — эффективный корм для кур, уток, индеек, морской и пресноводной рыбы. Она содержит 60–80% протеина, 9% липидов и 7–16% азотистых веществ. Высокое содержание сбалансированных аминокислот, в том числе и незаменимых, провитаминов D, водорастворимых витаминов свидетельствует о том, что биомасса червей является ценной кормовой добавкой. Черви пригодны для скармливания свиньям, бычкам в сыром и вареном виде. Биомассу красного червя можно использовать в виде пасты для кормления аквариумных рыб. Обезвоженная биомасса червей также представляет собой весьма ценный материал, полезные минеральные вещества. В их состав входят макро- и микроэлементы.

В фармакологии могут использоваться экстракты из биомассы червей для обработки лишаев как противораковые препараты, как лечебное средство при заболеваниях глаз, в косметической промышленности — как биодобавки в шампуни, защитные кремы, лосьоны и др. Дождевые черви в китайской медицине используются около двух тысячелетий. В настоящее время в Китае изготовлена антивирусная и антиопухолевая сыворотка Е76.

В питании человека используются черви, выращенные определенным способом. При подборе способа разведения червей для приготовления блюд важным является не только размер особей, но и субстрат, на котором их разводят, так как он определяет окраску и вкус дождевых червей. Нельзя использовать для пищевых целей дождевых червей, питающихся навозными компостами. Дождевые черви содержат 60—70% белка, дешевого и полезного. Приготовление блюд из дождевых червей требует специальных знаний по отбору, чистке, хранению и использованию исходного материала. Готовят червей с крабами, омлет с червями, паштеты и др. В зависимости от применяемых специй рецептура блюд меняется.

В земледелии вермикультура и «биогумус» положительно влияют на плодородие почвы. В процессе переваривания органического вещества в кишечнике червей формируются гумусовые вещества, в том числе высокомолекулярные органические кислоты. Концентрация их в копролитах червей, питающихся навозом, в несколько раз выше, чем в исходном субстрате. При переработке дождевыми червями 1 т навоза в перерасчете на сухое вещество получается 600 кг сухого удобрения с содержанием органического вещества 25—40% и более. В этом удобрении содержится азот, фосфор, калий, а также многие микроэлементы. При удобрении почвы биогумусом повышается ее биологическая активность, а выращенная продукция практически не содержит нитратов и тяжелых металлов.

Из микрофлоры, выращенной на стоках свинокомплексов, получают новые виды микробных удобрений. Микробная ассоциация их на почвах всех типов проявляет фосфатомобилизующую активность. Содержание доступного фосфора увеличивается на 15—29% при внесении одной дозы. Введение в компостируемую массу муниципальных отходов микробных удобрений (БАМИЛ) положительно влияет на интенсивность процесса компостирования, главным образом за счет изменений в микробном сообществе, ответственном за биоферментацию.

## Работа

**Задание:** Заполнить таблицу

Способ трансформации	Группа микроорганизмов	Суть способа

**Контрольные вопросы:** 1. Какие способы трансформации отходов в АПК вам известны? 2. В чем суть перечисленных методов? 3. Какие группы микроорганизмов используются для трансформации отходов в АПК? 4. Какие условия необходимо соблюдать для осуществления микробной трансформации отходов в АПК?

## **2.18 Лабораторная работа №18 (2 часа).**

**Тема: «Микробиология твердых отходов».**

**2.18 Цель работы:** Изучить микрофлору твердых отходов

**2.18 Задачи работы:** Изучить микрофлору и условия жизни бактерий в твердых отходах

**2.18 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:** чашки Петри, питательные среды, бактериологические петли, спиртовки, термостат, холодильник.

## **2.18 Описание (ход) работы:**

Человечество для своих нужд с давних пор широко использовало многие процессы, не догадываясь об их микробиологической природе. К такой «полезной» деятельности микроорганизмов можно отнести:

1. производство продуктов питания (кваса, пива, вина, спирта, уксуса, хлеба, молочнокислых, квашеных и соленых продуктов, рыбных и мясных продуктов ферментации);

2. производство пищевого и кормового микробного белка, пищевых добавок и кормов для животных;

3. получение индивидуальных химических веществ (растворителей, газов, ферментов, витаминов, органических и аминокислот, нуклеотидов, биополимеров, токсинов и т.д.), причем некоторые продукты вообще не могут быть получены химическим путем или их образование чрезвычайно дорого;

4. получение препаратов для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства ([вакцин](#), сывороток, антибиотиков, алкалоидов, стероидов, гормонов, стимуляторов роста растений, микробных удобрений и т.д.);

5. участие микроорганизмов в ряде непищевых производств (биогидрометаллургии, изготовлении льняных волокон и табачных изделий);

6. переработка промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов и очистка окружающей среды от загрязнений;

7. применение различных физиологических групп микроорганизмов (фототрофов, гидролитиков, бродильщиков, метилотрофов, метаногенов и т.д.) для создания замкнутых систем жизнеобеспечения на космических станциях и подводных лодках, находящихся в автономном плавании. В таких системах продукты жизнедеятельности человека служат питательным субстратом для микроорганизмов, производящих пищевой белок и кислород для дыхания;

8. использование микроорганизмов в качестве тест-систем, биосенсоров, моделей и инструментов научных исследований.

«Вредными» микробными процессами являются:

- порча пищевых продуктов;
- микробная коррозия промышленных и бытовых объектов и материалов;
- болезнетворность микроорганизмов для человека, животных и растений.

## Работа

**Задание:** Заполнить таблицу

Группа микроорганизмов	Способ переработки твердых отходов

**Контрольные вопросы:** 1. Какие группы микроорганизмов используют для переработки твердых отходов? 2. Какими микроорганизмами представлена микрофлора твердых отходов? 3. Что относится к твердым отходам?

### **2.19 Лабораторная работа №19 (2 часа).**

**Тема:** «Анаэробная и аэробная очистка сточных вод».

**2.19 Цель работы:** Изучить анаэробную и аэробную очистку сточных вод

**2.19 Задачи работы:**

1. Изучить группы микроорганизмов, используемые для анаэробной очистки сточных вод.
2. Изучить группы микроорганизмов, используемые для аэробной очистки сточных вод.

**2.19 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:** питательные среды, сточные воды, чашки Петри, пробирки, бактериологические петли, спиртовки, предметные стекла, микроскоп, термостат, холодильник.

**2.19 Описание (ход) работы:**

Основные методы очистки сточных вод, согласно типу применяемых микроорганизмов, классифицируются на два вида:

- аэробные;
- анаэробные.

Анаэробные и аэробные организмы отличаются способом жизнедеятельности — для работы анаэробным бактериям не требуется кислород, тогда как аэробные микроорганизмы функционируют исключительно в насыщенной кислородом среде.

Минусы использования анаэробной очистки в частном доме

- Низкая эффективность удаления из стоков минералов фосфора и азота (60-65% от первоначального количества), что не позволяет использовать прошедшие очистку твердые осадки как удобрения;
- Неэффективность в плане уменьшения объема твердых веществ — потребуется регулярно вызывать ассенизатор для откачки выгребной ямы.

Анаэробные бактерии являются первым этапом биологической очистки стоков — они используются комплексно, вместе с аэробными организмами. Для жизнедеятельности последних необходимо перманентное поступление в септик кислорода, что обеспечивается за счет подключения к нему нагнетающего воздух аэратора (в промышленных условиях) либо добавления специального активатора.

Аэробная очистка сточных вод не сопровождается выработкой метана и характерным ему неприятным запахом, поскольку органика расщепляется на углекислоту (реакция происходит с выделением тепла). Аэробные организмы обеспечивают эффективную очистку (отходы можно использовать как удобрения) и уменьшение объема твердого осадка, что снижает требуемую частоту откачки септика. Бактерии для септика могут быть абсолютно разными, главное чтобы был эффект.

Микроны для септика развиваются и функционируют в определенных условиях окружающей среды, что нужно учитывать при использовании биологически активных средств:

1. Диапазон температур от +5 до +50 градусов (очистка септика менее эффективна при низких температурах, на морозе бактерии не погибают, а переходят в пассивное состояние);

2. Обязательно наличие жидкой среды (перед использованием препарат разбавляется в воде и в таком виде добавляется в выгребную яму);

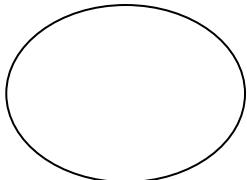
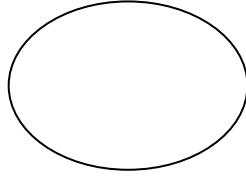
3. Микроорганизмы гибнут при контакте с химически агрессивными, содержащими хлор веществами;

4. Бактерии гибнут при отсутствии «питания» — если септик работает нерегулярно, добавлять микроны потребуется после каждого простоя.

Класс комплексных препаратов для биологической очистки стоков, в состав которых входят анаэробные и аэробные бактерии, именуется биоактиваторами. Помимо микроорганизмов, они содержат специальные ферменты, ускоряющие расщепление молекул кислорода, что необходимо для поддержания жизнедеятельности аэробных микробов.

## Работа

**Задание:** Заполнить таблицу

Группа микроорганизмов для очистки сточных вод	Морфология
	
	

**Контрольные вопросы:** 1. Что такое аэробная очистка сточных вод? 2. Что такое анаэробная очистка сточных вод? 3. Какие группы микроорганизмов используются для очистки сточных вод? 4. Назовите и охарактеризуйте показатели качества очистки сточных вод.

## **2.20 Лабораторная работа №20 (2 часа).**

**Тема: «Итоговое занятие за 4 модуль».**

**2.20.1 Цель работы:** Проверить знания студентов по пройденному материалу

**2.20.2 Задачи работы:** Проверить умения студентов, полученные в результате освоения материала

### **2.20.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

Чашки с ростом культур микроорганизмов, микропрепараты, микроскоп, иммерсионное масло.

### **2.20.4 Описание (ход) работы:**

#### **Контрольные вопросы:**

1. Какое брожение лежит в основе силосования кормов?
2. Что такое сахарный минимум?
3. Какие группы микроорганизмов развиваются при созревании сенса?
4. Каковы фазы развития микрофлоры?
5. Каковы значения pH хорошего сенса?
6. Какие условия способствуют получению сенса хорошего качества?
7. Что такое «дыхание почвы»?
8. Методы изучения способности микроорганизмов утилизировать углеводы.
9. Какие микроорганизмы обладают денитрифицирующей способностью?
10. Дать определение понятию «Денитрификация».
11. Какие вам известны способы изучения денитрифицирующей способности бактерий.
12. Понятие «фосфатмобилизирующая активность микроорганизмов».
13. Способы изучения фосфатмобилизирующей активности микроорганизмов.
14. Какие вам известны питательные среды, используемые для выделения фосфатмобилизирующих микроорганизмов.
15. Какие виды микроорганизмов способны трансформировать серу?
16. Какие методы изучения сульфатредуцирующей активности микроорганизмов вам известны.
17. Назовите и охарактеризуйте этапы превращения серы.
18. Что такое эпифитные микроорганизмы?
19. Условия культивирования эпифитных микроорганизмов.
20. Влияние эпифитных микроорганизмов на хранение и урожайность растений.
21. Что такое ризосферные микроорганизмы?
22. Способы выделения ризосферных микроорганизмов.
23. Влияние ризосферных микроорганизмов на хранение и урожайность растений.
24. Какими методами проводят учет эпифитной микрофлоры зерна?
25. Для чего зерно перед закладкой в чашки Петри дезинфицируют в 70 %-м спирте?
26. Бактерии каких родов наиболее распространены в филлосфере растений умеренной зоны?