

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

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«ДЕЙСТВИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
ШТАММОВ *AZOTOBACTER*»

Студент  Рожкова Анастасия Владимировна

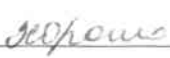
Руководитель  Заплатин Б.П.

Рецензент  Невитов М.Н.

Нормоконтролер  Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 14.06.22 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой 
(протокол заседания ГЭК от 22.06.22 № 4)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Общая характеристика <i>Azotobacter</i>	5
1.1.1 Систематическое положение <i>Azotobacter</i>	6
1.1.2. Морфологические особенности клеток и колоний <i>Azotobacter</i>	8
1.1.3 Экологическая характеристика <i>Azotobacter</i>	12
1.2. Влияние внешних факторов на рост <i>Azotobacter</i>	16
1.2.1 Характеристика пестицидов.....	16
1.2.2 Влияние пестицидов на жизнеспособность <i>Azotobacter</i>	30
1.2.3 Выводы	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 Описание эксперимента.....	35
2.1 Экспериментальная часть.....	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ <i>AZOTOBACTER</i>	41
3.1 Действие пестицида ТМТД на жизнеспособность клеток различных штаммов <i>Azotobacter chroococcum</i>	41
3.2 Влияние ТМТД на активность роста и продукцию ИУК клетками <i>A. chroococcum</i>	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

На основе различных штаммов *Azotobacter* создаются всё новые и новые биологические удобрения, так как его использование уменьшает химическую нагрузку на почву. Следует отметить также и экономичность применения *Azotobacter* из-за широкой области естественного обитания данного штамма, а также простоты культивирования в больших объёмах.

Azotobacter оказывает благоприятное действие на почвы, а также способствует росту и развитию растений.

Самая важная роль *Azotobacter* – фиксация азота.

Главной проблемой является то, что пестициды применяются в сельском хозяйстве для уничтожения вредителей, а значит, они токсичны для всего живого. *Azotobacter* является живым микроорганизмом и использование пестицидов в больших дозах или с неблагоприятным химическим составом оказывает губительное действие на данный вид бактерий, вследствие чего снижается урожайность и качество почв.

Цель исследования: изучить действие пестицидов на жизнеспособность штаммов *Azotobacter*.

В связи с поставленной целью решаются следующие **задачи:**

- Подобрать различные оптимальные питательные среды для культивирования *Azotobacter*.
- Произвести сравнительный анализ штаммов *Azotobacter* и выбрать наиболее подходящие для работы.
- Проверить, как взаимодействует *Azotobacter* с пестицидами при различных условиях (взять пробы почв с нескольких участков, приготовить вариации питательных сред, провести выращивание культур при разных температурах).
- Провести оценку полученных результатов и сделать выводы.

Объектом исследования являются штаммы *Azotobacter*, выделенные из разных типов почв Пензенской области.

Предметом исследования выступает степень воздействия пестицидов на активность роста штамма *Azotobacter*.

Научная новизна работы состоит в:

- определении биоразнообразия штаммов *Azotobacter*, выделенных из различных типов почв Пензенской области на основе анализа культуральных и биохимических характеристик;
- исследовании действия различных доз пестицида на активность роста клеток *Azotobacter*;
- установлении дозы экстремальных воздействий, приводящих культуру к состоянию стресса.

Практическая значимость работы – проведён сравнительный анализ выделенных культур *Azotobacter chroococcum*, позволивший выявить активно растущие штаммы, с наибольшим уровнем устойчивости к действию пестицидов.

Статистика полученных данных в ходе эксперимента объясняет действие пестицидов на почвы, в которых содержатся жизнеспособные и активные культуры клеток *Azotobacter chroococcum*, обитающие в природных биоценозах.

Для раскрытия поставленной темы определена следующая **структура**: работа состоит из введения, трёх глав, заключения и списка литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика *Azotobacter*

Азотобактер – это бактерия рода *Azotobacter*, которая включает в себя как минимум шесть известных видов. Эти бактерии встречаются в почвах по всему миру, живут свободно, не образуя симбиотические отношения с растениями или другими организмами [4]. Образец почвы должен включать в себя достаточное количество бактерий *Azotobacter* для того, чтобы можно было провести микроскопическое исследование и оценить состояния почвы.

Эти бактерии превращают свободный азот в форму, которая может использоваться растениями. Виды *Azotobacter* также имеют ряд потенциальных промышленных применений, поскольку их азотфиксирующие особенности используются при производстве различных сельскохозяйственных препаратов [5].

Бактерии *Azotobacter* подвижны и имеют форму палочек. Они непатогенные, не вызывают заболеваний у людей и других организмов, и многие виды, как известно, образуют густую слизь. Эти бактерии также образуют цисты больших размеров, которые защищают их, когда они находятся в состоянии покоя [7].

Цисты азотобактера хорошо видны при увеличении. Циста не защищает бактерии от чрезвычайно суровой погоды, такой как очень высокие или низкие температуры, но она обеспечивает защиту, позволяя бактериям сохранять жизнеспособность.

1.1.1 Систематическое положение *Azotobacter*

Некоторые примеры видов *Azotobacter* включают *A. Chroococcum* и *A. vinelandii*. Несколько видов были тщательно изучены в лабораторных условиях, чтобы узнать больше о том, как они связывают азот и производят другие ценные для растений вещества, а также узнать больше о жизненном цикле этих бактерий и их устойчивости к различным условиям окружающей среды. Эти бактерии могут культивироваться в больших объемах, для коммерческих компаний, которые используют их для производства различных продуктов [12].

Почва обычно кишит бактериями, и маленький образец почвы может содержать поразительный массив организмов. Здоровье почвы включает в себя очень тонкий баланс бактерий и органических веществ в почве, и его можно легко нарушить из-за плохой практики управления почвой или суровых условий окружающей среды. Исследователи очень заинтересованы в том, чтобы узнать больше обо всех организмах, вовлеченных в здоровье почвы, и определить, как и почему почва становится неуравновешенной и вредной для здоровья, чтобы можно было исправить плохую почву.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности микроорганизмам в обязательном порядке требуются органические и неорганические элементы, которые обеспечивают им правильное протекание процессов роста и развития. Существуют различные способы поступления в организм таких веществ. Но сами микроорганизмы весьма требовательны к субстратам и питательным средам. Для бесперебойного процесса роста и развития им нужны питательные среды. Есть несколько способов энергетического обмена и процессов преобразования питательных веществ для усвоения микро- и макроэлементов.

Азотобактер был впервые открыт учёным Бейеринком в 1901 году, который решил назвать этот род бактерий *Azotobacter chroococcum*, так как он имел большое сходство с сине-зелёными водорослями.

Выделяют три рода азотобактерий: *Azotobacter*, *Azotomonas* и *Beijerinckia* [22]. Позднее с помощью методов микроскопии было выяснено, что клеткам данного рода бактерий свойственна морфологическая форма палочек и кокков, а также наличие слизистой оболочки у зрелых культур. Колонии образуют пигмент жёлто-коричневого иногда чёрно-бурого цвета. *Azotobacter* является грамотрицательными бактериями, не растут на средах, содержащих белок, и в кислотной среде. Они способны окислять вещества, не содержащие в своей структуре азот, превращая их в углекислый газ и воду.

В таблице 1 представлена характеристика штаммов *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii*.

Таблица 1–Показатели *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii*

Род бактерии	Форма	Размер, мм	Внешний вид	Цветовой оттенок
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Округлые, с ребристым краем	5-7	Мутнообразный, блестящий	Коричневый
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Округлые, с ровной поверхностью	3-4	Мутнообразный, блестящий	Тёмно-коричневый

1.1.2. Морфологические особенности клеток и колоний *Azotobacter*

Молодые культуры клеток *Azotobacter* обладают рядом особенностей по морфологическим признакам, а именно имеют вид коротких палочек, диаметром от 2 до 4 мк, чаще всего с толстой оболочкой и тонкой капсулой, плотно прилегают друг к другу.

Цвет колоний варьируется от светло-желтых оттенков до темно-коричневых. Они ведут как подвижный образ жизни, так и не подвижный. Вид *Azotobacter chroococcum* менее подвижный, чем *Azotobacter vinelandii*. Клетки передвигаются с помощью жгутиков, но чем клетка старше, тем их число уменьшается вдвое, а двигательная функция замедляется. Фактором перехода клетки в стадию старения культуры служит появление у неё коричневой окраски, в некоторых местах даже темно серой. Клетки становятся меньше и становятся почти круглыми, площадь их поверхности становится меньше на 7 мк [17].

При неблагоприятных условиях клетки переходят в стадию цист и образуют колонии с плотной слизистой капсулой, в состав которой входят все необходимые питательные вещества необходимые для существования в сложных условиях. При такой обстановке могут создавать различные эволюционные формы с многочисленными морфологическими признаками [21].

Если пересадить зрелые культуры клеток на новую чистую среду, то цисты начнут снова прорастать, образуя небольшие клетки формы кокка с новым циклом развития. Во многом скорость прорастания культуры зависит от условий питательной среды, на которую была посеяна клетка. На твёрдых средах развитие и рост клеток притекает значительно медленнее и занимает больше недели, тогда как на жидких средах процесс занимает всего 3-4 суток. Цикл развития *Azotobacter* сравнительно простой. Деление клеток осуществляется, за счёт разделения клеток вдоль поперечной перегородки.

На протекание процесса размножения влияет множество факторов, такие как: видовое происхождение, возраст клетки, условия культивирования, состав питательной среды [24]. Кроме аммиака, среди азотистых выделений азотобактера были обнаружены самые разнообразные соединения: оксимы, гидроксилламин, гидразин, аминокислоты, пептиды и т.д.

Так как микроорганизмы рода *Azotobacter* обладают способностью фиксации азота, некоторыми особенностями метаболизма и не особо требовательны к среде, то они могут обитать практически во всех почвах с разным экологическим состоянием, насыщая её связанными формами азота, тем самым улучшая условия окружающей среды. Обогащённые почвы и водоёмы с высоким содержанием азота могут в дальнейшем использоваться разными обитателями органического мира, например, простейшими или высшими растениями [27].

Гранулы азотобактера сходны по морфологическим признакам со структурами митохондрий клеток животных. Несмотря на это среди них наблюдается ряд отличий: процессы, связанные с ОВР у этого вида бактерий протекают в ускоренном режиме, в несложных структурных органеллах, поэтому их система регенерации, гораздо проще, чем у остальных организмов. Следует так же отметить, что структурные единицы клеток бактерий гораздо менее стабильны и более подвержены процессам разрушения, при внедрении побочных субстратов, тогда как структура митохондрий относительно стабильная.

Азотобактер обитает в почвах, илах, водоёмах. Его существование зависит от количества растительности на его ареале обитания. Бактерии этого вида очень требовательны к условиям, на которых проходит их рост и размножения. Так, например, в кислотной среде они существовать не могут, а в сухих, плохо аэрируемых, не обогащённых фосфором и органическими соединениями почвах присутствует в очень малом количестве или совсем не фиксируется.

Для *Azotobacter* очень важен температурный режим, так как он обладает способностью принимать на себя тепловые лучи, а, следовательно, и среда их обитания будет зависеть от этого фактора. Влажность почвы должна составлять не менее 40 процентов, иначе процесс азотфиксации может перестать осуществляться. Конечно, лучше чтобы среда, на которой растут азотобактерии, хорошо снабжалась кислородом, однако были зафиксированы случаи их роста при высокой загрязненности мест их обитания углекислым газом. Но существует допустимый порог концентрации CO₂, он должен составлять не более 20 процентов на квадратный метр.

Содержание в почвах фосфора или кальция служит залогом роста большого числа колоний, так как эти макроэлементы необходимы для развития *Azotobacter*, поэтому лучше всего эти бактерии развиваются лучше всего на черноземных землях.

Для использования бактерий в сельском хозяйстве подходят не все культуры, отбираются лишь те, которые способны вырабатывать биологически активные вещества и быстро размножаться. Такие штаммы могут увеличить количество урожая в два раза. Чаще всего используется препарат на основе живых клеток *Azotobacter* – азотобактерин, который применяют в агропромышленности, так как он безопасен и легко усваивается в почвах.

При заборе образцов с почв следует помнить, что бактерии отличаются не только по видовой принадлежности, но ещё могут принадлежать к разным экологическим расам, которые различают по требованиям к условиям среды. Для идентификации *Azotobacter* в пробах почв чаще всего используют метод почвенных комочков или культивирование на жидких средах.

Наиболее благоприятная температура для жизни азотобактера 25-30 °C, поэтому его легко вырастить даже при комнатных условиях. Для культивирования *Azotobacter* нужно использовать питательные среды с высоким содержанием углеводов, например глюкозы, сахарозы, крахмала,

глицерина и др. Чем лучше подобраны условия для выращивания, тем больше колоний образуется, в конечном счёте.

О скорости роста и темпах развития *Azotobacter* на плотных средах судят по количеству, размеру и морфологическим признакам их колоний, на жидких по объёму образовавшейся светлой, мутноватой суспензии или сгустков. Эффективность азотфиксации определяют по процентному соотношению выделенного азота на средах.

Наблюдать за развитием клеток азотобактера можно уже после первых суток культивирования. Молодые клетки имеют форму палочек, концы которых немного закруглены, а середина приобретает достаточно толстое утолщение. Их длина варьируется от 3 до 8 мк, а ширина от 0,5 до 2 мк. В молодом возрасте культуры клеток подвижны, особенно явно это заметно, если выращивать их на средах с небольшим количеством углеводов, так как он является основным источником питания для них, к которому им приходится двигаться. С возрастом эта способность утрачивается, так как в клетках накапливается достаточный запас азот содержащих веществ. Клетки начинают приобретать форму кокков.

Когда условия жизни для *Azotobacter* становятся неблагоприятными, они образуют цисты, покрываясь слизистой капсулой. В такой стадии колонии способны просуществовать долгое время. Цисты могут прорасти в новые молодые коковидные клетки, и тогда цикл развития будет повторяться.

Все вещества, выделяемые благодаря деятельности азотобактера, способствуют ускорению процессов роста и развития растений. Это происходит, только когда в почвенной среде находится достаточное количество колоний бактерий *Azotobacter*, располагающихся около корневой системы. Бактерии этого вида способны ещё и замедлять развитие грибов, вырабатывая подавляющий антибиотик – анисомицин.

Эффект стимуляции роста азотобактера проявляется только на окультуренных почвах, так как данный вид бактерий очень чувствителен к

окружающей среде и не может развиваться при малой концентрации органических веществ, необходимых для питания и процессов окисления.

Чтобы улучшить условия развития *Azotobacter* рекомендуется пропахивать и орошать поля, а так же использовать минеральные удобрения, для лучшего усвоения.

1.1.3 Экологическая характеристика *Azotobacter*

Азотобактер – факультативный аэробный микроорганизм, у которого преобладает дыхательное фосфорилирование в клетке, сопряжённое с окислением субстрата. Основными продуктами окислительных реакций в клетках бактерий являются компоненты промежуточных стадий цикла трикарбоновых кислот [29].

В клетках азотобактера были обнаружены адаптивные дегидрогеназы, переносящие водород от разных веществ [31]. Были проведены многочисленные опыты, направленные на изучение механизмов протекания процессов фосфорилирования в клетках *Azotobacter*. В них были задействованы отдельные изолированные от других органеллы и структурные элементы данных клеток бактерий.

В ходе экспериментов было доказано, что процентное соотношение фосфора к кислороду имеет относительно низкие показатели, которые варьируются от 0,4 до 0,7. Это объясняется разбросом в пространстве окислительных ферментов, с ферментами, участвующими в реакциях фосфорилирования, которые связаны между собой менее крепкими связями и могут с лёгкостью переходить в растворимую фракцию.

На показатели расстояния между молекулами ферментов могут влиять условия, в которых протекают реакции, а именно: воздействие внешних и внутренних факторов, время центрифугирования, степень окисления кислотами, присутствия побочных продуктов реакций и т.д. Время, затраченное *Azotobacter* на дыхательный цикл, изменяется из-за присутствия значительного количества кислорода в клетках. Также большое влияние

оказывает и выбор используемого субстрата, на котором будет протекать реакция.

Процесс азотфиксации напрямую зависит от процессов дыхания, он протекает намного быстрее при меньших показаниях парциального давления кислорода. Так же необходим ещё один важный элемент – это активированный азот, выделяемый при процессах ферментного дегедрирования питательного субстрата. Азот в реакциях цикла выступает акцептором активации водорода.

В процессе эволюции род бактерий *Azotobacter* приобрёл способность механического восстановления молекул свободного азота до аммиака с помощью реакции окисления углеводов, входящих в состав питательной среды. Коэффициент полезности фиксации азота зависит от количества глюкозы и концентрации фосфата. Пируват выполняет две функции: первая – энергетическая, вторая – восстановительная.

Содержание белковых компонентов в клетках *Azotobacter* зависит от способов его культивирования и высевания. Если осуществлять посев на твёрдые среды, то колонии азотобактера образуют слизистую оболочку белого цвета в виде капсул, в состав которых не входят азотсодержащие компоненты, из-за чего процент содержания белка в клетках очень мал. А если на жидких, то клетки почти не будут образовывать вокруг себя слизистую капсулу.

Содержание белка в клетках *Azotobacter*, культивируемых на жидкой среде с процессом аэрации, составляет 60–70% белка на высушенном остатке. Если это делать на агар-агаре, то процент значительно снизится и составит 30–37%.

Культуры бактерий, выращенных на агарных средах, содержат белок в количестве от 20 до 25%. В процессе старения клеток процентное соотношение увеличивается. Общий процент содержания азота в клетках составляет 3%. Концентрация белка у разных видов *Azotobacter* представляет собой обратную зависимость от насыщения культуры кислородом. В

среднестатистической культуре содержание белка составляет 80%. А в обогащённой кислородом всего лишь 25,5%. Факторами влияния служат видовая принадлежность и возраст культур. В молодых суточных культурах содержится 21–23 % белка, в зрелых семисуточных культурах 30–40 %.

В старых культурах накапливаются побочные белковые компоненты, из-за чего процентное содержание белков не пропорционально процессам фиксации азота, итогом являются сниженные показатели продуктивности работы клеток.

Состав аминокислот в клетках *Azotobacter* изучают с помощью метода двумерной хроматографии на бумажной основе. Такой способ позволяет определить весь спектр содержащихся в белках кислот. Азот, монокислоты и небольшое количество триптофана – 0,22%, тирозина – 0,85 %, цистина – 0,37 % по азоту. Клетки вида *Azotobacter chroococcum* и *vinelandii* обладают уникальным составом белков, в них содержание лизина в процентном соотношении больше, чем аргинина.

Важным фактом является то, что показатели содержания аминокислот повышены из-за внедрения во фракции продуктов гидролиза нуклеиновых кислот, поэтому белки вида *Azotobacter vinelandii* и *chroococcum* нельзя относить к белкам типа гистонов. Комплекс ферментов, оказывающий воздействие на нуклеиновые кислоты и на их части, у азотобактера разнообразен.

Количественное содержание и нуклеотидный состав нуклеиновых кислот азотобактера не меняется при выращивании в различных условиях аэрации – с продувов воздуха и со встряхиванием. Ассимиляция нитрита влечёт за собой значительное изменение состава запаса нуклеотидов. Количественный состав нуклеотидных соединений в клетках *Azotobacter* зависит от способа высева культур и воздействия внешних факторов. Так, качественный состав свободных нуклеотидов в клетке азотобактера зависит от условий его культивирования.

Аппарат синтеза белков клеток *Azotobacter* плотно прилегает к мембране. На её стенках протекают циклы активного синтеза.

Синтез белка у азотобактера, как и у других бактерий, проходит через промежуточные стадии, сходные в общих чертах с этапами синтеза у животных и растительных организмов: активация аминокислот, образование РНК производных, включение C_{14} аминокислот в рибосому. Клетки *Azotobacter* содержат 0,83% общего фосфора, процентное содержание нуклеинового фосфора составляет 80%, лецитинового 7,7% от общего фосфора [39].

Если в питательной среде нет фосфорсодержащих веществ, то процесс окислительных реакций усиливается, следовательно, и процент фиксированного азота становится выше.

Общего фосфора 3%, минерального 0,5% от сухого остатка клеток. В процессе эволюции в клетках *Azotobacter* меняется количественное содержание фосфора. В латентной и в начальной логарифмических фазах развития затрачивается самое большое количество ортофосфата, который уходит на синтез основных фосфорных компонентов клетки, таких как ДНК, РНК, фосфолипиды и АТФ.

Как только культуры клеток переходят в фазу старения, то количество фосфора в соединениях начинает заметно снижаться и медленно приходит в норму. Исключениями являются только фосфопротеины, количественное содержание которых у рода *Azotobacter chroococcum* и *vinelandii* возрастает.

В клетках азотобактера содержится 30% липидов, а именно полиоксимасляной кислоты на сухом остатке, 15% из которых составляют насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и 10 % эфиры [13].

Фосфолипиды располагаются вдоль клеточной стенки и наружной оболочки мембраны. Клетки *Azotobacter* состоят в большей степени из высокомолекулярных полисахаридов. Содержание углеводов в клетках *Azotobacter chroococcum* и *vinelandii* в агаровой культуре около 33% на сухой остаток.

На основании описываемых сведений выяснено, «что капсулы азотобактера непосредственно состоят из высокомолекулярного полисахарида. В культурах *Azotobacter chroococcum* и *vinelandii*, которые не были подвержены продуванию воздухом, содержится в среднем 6,1% редуцирующих веществ, а в аэрируемой 2,5% на сухой вес клеток.

Разросшиеся оболочки клеток азотобактера состоят из пектиновых веществ. Капсулы азотобактера состоят из углеводов – пентозанов и схожих с ними. Процентное соотношение целлюлозы 0,34%, гемицеллюлоз 0,26%, лигнин подобных веществ 45,2%. Такой вид бактерий скапливает в себе излишнее количество d-глюкозы, уменьшена доза d-галактозы и небольшое содержание маннозы и глюкуроновой кислот.

Любое побочное действие внешних и внутренних факторов окружающей среды на культуры клеток *Azotobacter* может вызывать у них нарушения в структуре и отклонения в функциях, которые они выполняют. Вот почему так важно правильно подбирать питательные среды для их культивирования, чтобы на выходе получить чистые культуры с желаемыми характеристиками.

Совместно с пищей, растительного происхождения микроорганизмы поступают в пищеварительную систему организма, складывая его внутреннюю среду. Элективной средой являются побочные продукты, с помощью которых осуществляется перенос на основной субстрат.

1.2. Влияние внешних факторов на рост *Azotobacter*

1.2.1 Характеристика пестицидов

Под термином пестициды подразумевается комплекс химических веществ, используемых для обезвреживания и защиты растений от сорняков, вредоносных насекомых, животных и микроорганизмов, а также для деактивации побочных химических веществ и других внешних факторов.

В агропромышленности используется большой спектр пестицидов. Методы и способы их применения постоянно модернизируются. С развитием

науки всё больше проводятся эксперименты с подбором приемлемых доз концентраций пестицидов для нормального развития растений. Очень важны способы внесения и число обработок препаратами. На данный момент разработаны и широко используются такие формы пестицидов как: водорастворимые капсульные препараты, порошки, дусты, эмульсии, микрогранулы, растворимые в органических растворителях.

Классификация пестицидов по областям использования:

- Инсектициды – используются для борьбы с насекомыми;
- Гербициды – применяются против сорняков;
- Фунгициды – предназначены для уничтожения микрогрибов;
- Бактерициды – применяют для борьбы с бактериями;
- Акарициды – для истребления клещей;
- Ротентициды – против грызунов;
- Ретарданты – для удаления перегноя, соломы и травы.

По усреднённым данным за год в мире используется около 4 миллионов тонн пестицидов.

Инсектициды представляют собой углеводородные соединения или же соединения фосфорной кислоты с органическими веществами. Чаще всего применяются такие вещества, как линдан и альдрин. Больше всего гербициды используются в сельском хозяйстве. Они могут оказывать глобальное или местное действие. Фунгициды состоят из эфиров и фосфокислот.

При использовании пестицидов возникают три основные проблемы:

- 1) Некоторые пестициды, в состав которых входит фтор или ртуть, имеют свойство накапливаться в организме, со временем увеличивая количество. Такая реакция имеет название – эффект биологического усиления, так как он передаётся по цепям питания. Например, пестицид ДДТ может попасть в организм животного с растительной пищей и отложиться в жировых тканях. Количество

пестицида, полученное организмом, идущим следующим в пищевой цепочке, будет увеличено.

- 2) После обработки и опыления почв пестицидами на протяжении долгого времени в них или в культурах растений могут накапливаться остаточные вещества. Как правило, это устойчивые к внешним факторам соединения мышьяка или ртути, которые не разрушаются за один вегетационный цикл и не подвергаются разложению под действием лучей солнца или активности микроорганизмов.
- 3) Насекомые и различные вредители приобретают способность устойчивости к пестицидам. Это происходит из-за геномных мутаций у выборочных особей, так как потомство очень многочисленно. Вследствие этого становится необходимым увеличивать дозы пестицидов, что приводит к повышению их отложений в продуктах.

Все перечисленные проблемы заставляют с каждым годом увеличивать количество пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, так как они теряют свою эффективность в борьбе с вредоносными организмами и сорняками, которые приспосабливаются и начинают их использовать себе во благо.

Новые виды пестицидов после выпуска проходят целый комплекс анализов и проверок, прежде чем допустить их к масштабному производству и дальнейшему применению. Особое внимание обращают на их трансформации и разложение в окружающей среде. После аналитического заключения, составляется чёткая инструкция по применению пестицидов, с допустимыми дозировками. В первую очередь начинают применять препараты, не токсичные для человека. В некоторых случаях разрешается применение малотоксичных средств, если они находятся в непроницаемых капсулах или гранулах и вносятся непосредственно техническим путём.

Если срок разложения остаточных веществ пестицидов превышает один год или их взаимодействие с другими продуктами оказывает более ядовитое воздействие, то они не допускаются к применению. Так же они

отсеиваются, если вызывают сильное раздражительное действие или же мутации.

Существует особая классификация гигиенической опасности пестицидов. На данный момент разрешено использование более 700 препаратов, на основе 400 безопасных соединений, относящихся к различным химическим группам.

Самые токсичные пестициды это – хлорорганические (ХОП), фосфорорганические (ФОП) и ртутьорганические (РОП), а также их производные метаболиты и изомеры.

ХОП обладают устойчивостью к внешним факторам окружающей среды, из-за чего они становятся сильными загрязнителями. Им присуща особенность кумуляции – накопление биологически активных веществ (БАД) вследствие разложения остатков.

Период полураспада ХОП в слоях почв превышает срок два года, а в случае с их метаболитами более 100 лет. Они могут откладываться даже в живых организмах. Хлорорганические пестициды не распространяются через воду, так как они гидрофобны по своей структуре, но зато могут легко проникать через воздушную среду. Хоп опасны тем, что угнетают работу почвенных ферментов (липазы, дегидролазы), замедляя распад клетчатки и скорость обогащения почв кислородом.

ФОП или РОП менее токсичны и устойчивы по сравнению с ХОП, но обладают способностью оказывать негативное действие спустя два или три месяца после применения. Они могут долгое время задерживаться в продуктах питания, впитываясь в их покровные ткани, например кожуру цитрусовых и зерновых культур. Остаточные вещества пестицидов могут соединяться с продуктами, выделяемыми при процессах разложения и гниения, и вызывать интоксикацию организма. Токсичность определяется по критерию количества смертельных доз, поступающих за один раз в организм через кожные покровы или пищеварительную систему.

Риск опасности рассчитывается по процентному соотношению нескольких критериев, а именно: поступление пестицидов в организм через окружающую среду, через продукты питания и непосредственном контакте с веществами.

Степень опасности при работе с пестицидами определяется величинами средней смертельной и пороговой (вызывающей минимальные нарушения) доз и концентраций при различных путях поступления в организм. Областью токсического действия, отношением летальной концентрации к пороговой дозе (чем эта зона уже, тем больше опасность острого отравления), способностью проникать через неповреждённые кожные покровы и оказывать токсическое действие, наличием и выраженностью кумулятивных свойств.

Основным документом, регламентирующим содержание пестицидов в продуктах питания, является постановление «Требования к применению, условиям перевозки и хранения пестицидов (средств защиты растений), агрохимикатов и минеральных удобрений» [12].

Согласно этому документу «Для продовольственного сырья растительного происхождения обязательна информация о пестицидах, использованных при возделывании сельскохозяйственных культур, фумигации помещений и тары для их хранения, борьбе с вредителями продовольственных запасов, а также дата последней обработки ими. Для продовольственного сырья животного происхождения обязательна информация об использовании (или отсутствии такового) пестицидов для борьбы с эктопаразитами или заболеваниями животных и птицы, для обработки животноводческих и птицеводческих помещений, прудовых хозяйств и водоёмов для воспроизводства рыбы, также с указанием наименования пестицида и конечной даты его использования. Ввоз, использование и оборот продовольственного сырья растительного и животного происхождения, не имеющего информации о применении пестицидов при его производстве, не допускаются.

«Во всех видах продовольственного сырья и пищевых продуктов контролируются пестициды: ГХЦГ (альфа, бета, гаммаизомеры), ДДТ и его метаболиты. В зерне и продуктах переработки контролируются также ртутьорганические пестициды, 2,4Д кислота, её соли и эфиры. В рыбе и продуктах переработки контролируются 2,4Д кислота, её соли и эфиры».

Для уменьшения поступления пестицидов в продукты питания требуется проводить тщательный технический и экологический контроль продукции, а также её переработки.

Гербициды, которые попадают прямо в водоёмы, представляют большую угрозу для организмов, обитающих в водной среде. Их попадание на прибрежные зоны может навредить флоре и фауне. Некоторые виды пестицидов могут оказывать негативный эффект лишь со временем, после разложения, например те, что используются для орошения полей борьбы с эрозией. Очень большое количество пестицидов и гербицидов выбрасывается в атмосферу после опыления полей с самолетов, в водоёмы с талыми водами, а также со сточными выбросами химических предприятий. Опасны и промежуточные продукты синтеза пестицидов, которые могут наносить непоправимый вред живым организмам.

Сотрудники управления Роспотребнадзора периодически проверяют службы, занимающиеся обработкой лесов, сельскохозяйственных угодий, водных и прибрежных химическими веществами. Они заранее оповещают руководителей хозяйств, ветеринаров о времени, месте, характере предстоящих обработок и составе используемых пестицидов или удобрений, чтобы не нанести вреда окружающей среде.

Для каждого обрабатываемого участка нужно подбирать определённый состав пестицидов, чтобы оказывать не только эффективное воздействие, но и наиболее безопасное.

Пестициды замедляют работу процессов каталитических реакций ферментов. Под их воздействием некоторые биологические реакции начинают замедляться, это позволяет вовремя проанализировать заболевания,

увеличить срок хранения, избавиться от насекомых и сорняков. (ФЗ №109 «О безопасном обращении с пестицидами» от 19.06.1997) [7].

Чаще всего под пестицидами, с научной точки зрения, понимают действующие вещества, составляющие основу препарата. Обычно природа данных веществ синтетическая, хотя встречаются и природные агенты. Их, как правило, использует не в чистом виде, а разводят в различных растворителях, будь то вода или органические соединения. Они могут так же использоваться как добавки для растений, например, антидоты или синергисты, которые увеличивают продуктивность действия пестицидов [19].

Классифицируют пестициды на основе различных характеристик:

По химическому составу выделяют:

- Соединения неорганической природы;
- Препараты биологической природы;
- Органические соединения – наиболее обширная группа, к ней относятся пестициды высокой физиологической активности.

В зависимости от цели и области применения производственные пестициды делят на следующие группы:

Инсектициды (от *insectum* – насекомое) препараты для борьбы с вредными насекомыми. Дополнительно в зависимости от действия на отдельные фазы развития насекомых или на отдельные группы вредителей выделяют: ларвициды, овициды, акарициды» [18].

Помимо препаратов против членистоногих используются средства против других вредителей животного происхождения моллюскоциды, нематоциды, родентициды. Для борьбы с возбудителями болезней растений применяют – фунгициды, фунгистатики, бактерициды, вирусциды, антисептики. Для борьбы с сорной и нежелательной кустарниково–древесной растительностью используются гербициды, арборициды, альгициды.

Среди пестицидов, используемых в защите растений, выделяют соединения, обладающие специфическим действием на растения: дефолианты, десиканты, и регуляторы роста.

Данная производственная классификация в известной степени условна, так как многие пестициды обладают универсальным действием: многие фосфорорганические инсектициды обладают и акарицидным действием (инсектоакарициды), препараты неорганической серы – акарицидным и фунгицидным действиями (акарофунгициды) и прочее. Многие гербициды при повышенной норме расхода уничтожают древесно–кустарниковую растительность, то есть выступают как арборициды.

Классификация пестицидов по способности проникать в организм вредителя, характеру и механизму действия следующая: контактные, кишечные; системные; фумиганты. Фунгициды по характеру действия на возбудителей болезней и способам проникновения в растения подразделяют на два типа: защитные и лечащие или терапевтические, искореняющие, истребительные [26].

Характер воздействия гербицидов на растительные организмы существует следующий: избирательное, действующие на конкретный вид или группу растений, а также сплошного действия, уничтожающие всю растительность. При этом деление условно, так как избирательные пестициды, при завышении концентрации, проявляют свойства пестицидов сплошного действия.

Таким образом, пестициды оказывают как положительное действие, уничтожая вредоносные организмы и сорняки тем самым очищая окружающую среду и давая культурным растениям нормально размножаться, так и отрицательное, нанося непоправимый вред территории, на которой они применяются, тем самым, не давая долгое время использовать такие земли для сельского хозяйства.

Любой пестицид оценивается по степени влияния, оказываемой на покровные ткани организма. Следует помнить, что все группы веществ, входящие в состав пестицидных препаратов, имеют свойство высокой летучести и раздражительности слизистых оболочек при контакте с ними.

В соответствии с принятой у нас в стране классификацией, пестициды по степени воздействия на организм теплокровных животных и человека при введении в желудок подразделяют на четыре группы токсичности:

- 1) сильнодействующие ядовитые вещества (ЛД₅₀ до 50 мг/кг);
- 2) высокотоксичные (ЛД₅₀ 51–200 мг/кг);
- 3) среднетоксичные (ЛД₅₀ 201–1000 мг/кг);
- 4) малотоксичные (ЛД₅₀ более 1000 мг/кг).

Кожно-резорбтивную токсичность пестицидов (при поступлении через кожные покровы) подразделяют на:

- 1) резко выраженную (ЛД₅₀ меньше 100 мг/кг);
- 2) выраженную (ЛД₅₀ 101–500 мг/кг);
- 3) средне выраженную (ЛД₅₀ 501–2500 мг/кг);
- 4) слабо выраженную (ЛД₅₀ более 2500 мг/кг).

По степени летучести пестициды подразделяют на:

- очень опасные, когда концентрация в воздухе больше или равна токсической;
- опасные, когда концентрация выше пороговой, но меньше токсической;
- мало опасные, когда концентрация меньше пороговой токсичности.

По устойчивости в почве пестициды делят на:

- очень стойкие (время разложения свыше 1 года);
- стойкие (время разложения 2 месяца);
- умеренно стойкие (время разложения от 1 до 6 месяцев);
- малостойкие (время разложения менее 1 месяц).

Кумуляция – способность пестицидов к накоплению в живых организмах. Причиной кумуляции является неполная детоксикация и вывод из организма.

Выделяют несколько групп ядохимикатов по способности к кумуляции:

Гальперин М. В. (2007г.) даёт классификацию пестицидов по показателю коэффициента кумуляции. Коэффициент кумуляции ($K_{\text{кум}}$) равен отношению средней летальной дозы пестицида при многократном введении к средней летальной дозе разового применения – сверх кумуляция ($K_{\text{кум}} < 1$)

- 1) 1 -й класс опасности – выраженная кумуляция ($K_{\text{кум}} = 1-3$);
- 2) 2 -й класс опасности – умеренная кумуляция ($K_{\text{кум}} = 3,1-5$);
- 3) 3-й класс опасности – средняя кумуляция ($K_{\text{кум}} > 4$)
- 4) 4-й класс опасности – слабо выраженная кумуляция ($K_{\text{кум}} > 5$)

Так можно понять перерасчёт на препараты увеличивает количество используемых ядохимикатов в десятки и сотни раз. На сегодняшний день только в России зарегистрировано порядка 800 различных препаративных форм пестицидов. (Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации, 2013г.).

Применение пестицидов остаётся одним из самых серьёзных токсических ударов человека по биосфере, а значит, и по самому человеку. Существует несколько видов транспорта пестицидов в окружающей среде.

– Адсорбция – связывание пестицидов с почвенными коллоидами. Объём поглощённых пестицидов зависит от различных факторов, таких как тип пестицида и почвы, влажности, кислотности, строения почвенного профиля. Чем выше содержания органического вещества в почве, тем выше вероятность адсорбции ядохимиката.

– Испарение – процесс перехода твёрдых или жидких фаз в газообразную форму, которая может мигрировать с зоны первичного применения. Этот транспорт называется газовым переносом. С его помощью некоторые гербициды могут повреждать соседние поля, необработанные ядохимикатами.

– Дисперсионный перенос – воздушный перенос рассеянных капель пестицида с зоны применения при опрыскивании. Он зависит от нескольких

факторов: размер капель при орошении, скорость ветра, расстояние между форсункой опрыскивателя и растениями.

– Сток – транспорт пестицидов, под действием поверхностных вод и осадков. Пестициды при смыве могут, как растворяться в воде, так и переноситься вместе с частицами эродированной почвы. Сток происходит, когда количество попавшей на поле воды превышает влагоёмкость почвы.

Объём стока зависит от: рельефа, почвенного профиля, влагоёмкости почвы, количества и периодичности осадков, степени орошения, типа используемого пестицида.

– Выщелачивание – транспорт, при котором пестициды вместе с водой мигрируют в почвенном профиле. Выделяют: нисходящее, восходящее и профильное (горизонтальное) выщелачивание.

Факторами, влияющими на выщелачивание, являются: характеристики почвы и пестицида, их взаимодействие с осадками или ирригацией. Данные факторы легко суммируются и усиливают друг друга. Выщелачивание усиливается за счёт: использования эмульсий препарата, высокого содержания песчаных фракций в почве, осадков после обработки, слабой абсорбции пестицида почвой.

Пестициды в окружающей среде обладают рядом особенностей, несущих резко отрицательный характер:

- токсическое воздействие на любые виды живой материи;
- деструктивный характер действия на живые организмы;
- поражение нецелевых видов;
- влияние на популяции организмов, а не на отдельные особи;
- высокие дозы препарата;
- низкие показатели целевого применения пестицидов;
- короткие сроки «целевого» действия – 1-2% общего времени нахождения препарата в окружающей среде;
- высокие показатели аккумуляции остаточных количеств в живых организмах и трофических цепях;

- большой вынос остаточных количеств с обрабатываемых территорий в окружающую среду;
- высокие темпы появления устойчивых вредных организмов;
- гибель полезных организмов и разрушение экосистем;
- увеличение вероятности появления разнообразных негативных эффектов у биоты;
- нарушение метаболизма многих организмов.

При распылении пестицидов с самолётов препараты оседают в воздухе твёрдыми частицами, переносимыми воздушными потоками ветра.

Выяснено, что после опыления сельскохозяйственных угодий и лесопосадок на поверхностях обрабатываемых участков оседает 40% веществ, оставшийся процент остаётся в воздушной среде и оседает лишь со временем, притом его осадки разбросаны на значительное расстояние от точки исходного сброса. Если используются порошковые или гранулярные вещества, то площадь их распространения увеличивается вдвое. Опыление загрязняет окружающую среду больше, чем опрыскивание.

Пестициды могут попадать в воздушную среду несколькими способами:

- 1) Во время испарения с поверхностей растений или почвы;
- 2) При разрушении горных пород и почвенных слоев сильными ветрами;
- 3) После сбора урожая сельскохозяйственной техникой.

Процент загрязнения атмосферы пестицидами зависит от их химического состава и влияния внешних факторов, таких как: способ их применения, температуры воздуха, направления и скорости ветров, площади обрабатываемой территории. Исключение пестицидов из слоёв атмосферы происходит после выпадения осадков или же в результате их естественного химического разрушения.

Пестициды являются биологически активными веществами и поэтому оказывают огромное воздействие на территорию, в которую проникают. На

данный момент времени 50 процентов загрязнения окружающей среды является следствием их использования.

Изобретение пестицидов помогло людям получать обильные урожаи и продукты, не зараженные вредоносными микроорганизмами, что позволило победить опасные болезни. Но есть и минусы, например, у многих видов насекомых выработалась устойчивость к химическим веществам, они стали быстро размножаться и поедать сельскохозяйственные культуры.

Продукты распада пестицидов долгое время хранятся в земле и оказывают на неё токсичное воздействие. Они попадают даже в грунтовые воды, а оттуда в сточные трубы, уменьшая видовое разнообразие и нанося вред непосредственно человеку, вызывая даже сильнейшие аллергические реакции.

Каждый вид пестицидов имеет свой состав и степень опасности, поэтому использовать их можно только по назначению. Следует грамотно рассчитывать допустимые нормы. Для обеспечения ускоренного роста сельских культур нужно использовать препараты с правильно подобранным химическим составом или же поменять их на безопасные аналоги.

Современные технологии внедряют в производство продукты, выращенные с использованием препаратов для стимуляции роста, следовательно, поля, на которых они прорастают, полностью изолированы от вредителей. Достигнуть такого эффекта можно только при использовании огромных количеств гербицидов. Процентное содержание продуктов распада в такой продукции будет превышать все установленные нормативы.

Допустимая концентрация у разных групп пестицидов варьируется от 1 мкг до 1 кг на участок. Если начать использовать их неправильно это может нанести вред всей окружающей среде, могут исчезнуть виды растений и животных, занесенные в красную книгу, а территория, на которой они применяются, долгое время не будет пригодна для существования и использования.

Большое значение имеют химические превращения, при которых получаются менее вредные продукты распада, чем первоначальные пестициды.

К химическим реакциям разрушения пестицидов относят: их взаимодействие с водой, или окислительно-восстановительные реакции с участием кислорода; процесс разложения веществ протекает быстрее под влияние света.

В водную среду пестициды поступают несколькими способами:

- из сточных вод;
- после обработки полей и лесов;
- с талыми водами, после выпадения осадков;
- при очистке водных зон от водорослей или микроорганизмов.

Пестициды оказывают большое влияние на состояние экосистемы. Их неправильное применение может привести к ряду проблем, а именно:

- изменение химического состава воды;
- уменьшение процента кислорода в воде;
- гибель флоры и фауны водоёмов;
- ухудшение условий жизни обитателей водных экосистем;
- изменение ареала обитания особей и нарушение цикла в цепях питания.

Пестициды попадают в землю, непосредственно внедряясь в почву для уничтожения вредителей, микроорганизмов и сорняков, после обработки наземных частей растений в результате сноса ветром, смыва осадками, поступление пестицидов в почву в виде остатков, содержащихся в листьях, корнях и т.д.

Пестициды могут долгое время не разлагаться, оставаясь в почвенных слоях, и оказывать на неё токсичное воздействие. Их стойкость позволяет препятствовать действию физических, химических и биологических процессов (персистентность или резистивность). Персистентность зависит от физико-химических свойств пестицида, дозы и формы препарата, типа

почвы, её влажности, температуры и физических свойств, состава почвенной микрофлоры.

1.2.2 Влияние пестицидов на жизнеспособность *Azotobacter*

Пестициды и их метаболиты с легкостью транспортируются по слоям почв благодаря воде, диффузии, росту корней, глубиной обработке растений.

Пестициды видоизменяются или полностью разлагаются в почве в результате следующих процессов:

- физико-химические процессы, когда пестициды адсорбируются почвенными коллоидами. Степень адсорбции зависит от содержания гумуса в почве, влажности почвы, температуры почвы;
- микробиологическое разложение;
- поглощение растениями.

Поглощение пестицидов растениями зависит от особенностей конкретного вида. Пестициды вызывают серьёзные изменения экосистем. В местах, где проводили массированные обработки пестицидами, отмечали исчезновение нецелевых видов организмов. При этом кардинального решения проблемы «вредного организма» при помощи пестицидов не отмечается. Целевой организм быстро приобретает устойчивость к пестициду.

Помимо этого, удару подвергаются естественные враги вредителя, что способствует быстрому восстановлению его численности вредителя. Разрушение естественных сообществ паразитов и хищников ведёт занятию экологических ниш другими вредителями. Соответственно экономическая сторона использования пестицидов оказывается несостоятельной, требуются затраты на синтез новых препаратов и на устранение результатов их применения.

Роль микроорганизмов в процессах почвообразования достаточно большая. Они ускоряют процесс гниения остатков растений, формируют

химический состав почвенных слоев, учувствуют в реакциях образования минеральных веществ, а также гумусового слоя. Самая значимая роль, оказываемая бактериями, заключается в поставке азота, фосфора, органических веществ в биосферу.

Азотобактерии (*Azotobacter*) – крупные палочки с перитрихально типом расположения жгутиков.

Свободноживущие аэробные азотфиксаторы *A. chroococcum* – типичные обитатели почв pH больше 6. Образуют устойчивые к высушиванию цисты. Вид *Beijerinckia* слизистые бактерии, не образующие цист. Предпочитает кислую почву.

Биодеградация пестицидов – многоуровневый процесс, в котором биотрансформация органических компонентов происходит вследствие химической энергии самих пестицидов. Деградационные реакции включают окисление, восстановление, гидролиз и конъюгацию.

Разнообразие метаболизма зависит от химической природы токсиканта, особенностей организма, факторов среды, метаболических и физиологических факторов.

Окисление – это наиболее ожидаемая реакция в биотрансформации пестицидов и других органических ксенобиотиков. Реакций биологического окисления в основном управляют оксидоредуктазами, а именно цитохромы P-450, пероксидазы, полифенолоксидазы и т.д.

Наиболее изученными в данной группе являются ферменты группы цитохром P-450, одни из наиболее важных окислительных ферментов живых организмов. Именно он принимает непосредственное участие в Фазе I метаболизма пестицидов.

Во многих случаях, полимеризация продукта удаляет токсичность из субстрата, но существуют исключения. Полимеризация 3,4-дихлорфенила (метаболит пропанила) почвенными микроорганизмами приводит к образованию канцерогенного тетрахлороазобенена. Большинство продуктов полимеризации не поглощаются гуминовыми компонентами почвы.

В микроорганизмах в отличие от растений, ферменты имеют большое количество вариантов разрушения нитроароматических соединений.

1.2.3 Выводы

Таким образом, *Azotobacter* являются важными азотфиксирующими организмами, которые способны превращать свободный азот в форму, которая может использоваться растениями. Их свободно живущий образ жизни несколько необычен по сравнению с большинством других азотфиксирующих бактерий, поэтому они представляют особый интерес для ученых.

Виды *Azotobacter* имеют ряд весомых промышленных применений, поскольку их азотфиксирующие привычки используются при производстве коммерческих продуктов. Пестициды необходимы для борьбы с сорняками, вредителями и с болезнями растений, для обеспечения здоровой среды обитания. Увеличение концентрации в большой степени угнетает рост популяций и необходимых для регуляции почвы и роста растения бактерий.

Для правильного использования пестицидов следует тщательно подбирать концентрации и оценивать риски последствий после их применения. Перед применением необходимо проводить эксперименты, дабы исключать неблагоприятный исход.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одним из основных методов микробиологии является культивирование микроорганизмов. Очень важно правильно выбрать лабораторные условия для культивирования, так как это является залогом успешного проведения эксперимента и дальнейшего практического использования посевных культур. Первым делом нужно изучить особенности обмена веществ микроорганизмов и как они реагируют, физические и химические реакции окружающей среды, которые необходимы им для их роста и развития.

Для культивирования микроорганизмов необходимы особые субстраты – питательные среды. На культивируемых средах микроорганизмы проводят весь свой жизненный цикл, питаются, дышат, растут и размножаются. От правильного выбора питательной среды и её состава будет зависеть результат опыта. Поэтому субстраты, на которых выращиваются культуры, должны соответствовать всем условиям для нормальной жизнеспособности микроорганизмов.

Среды должны создавать оптимальные условия для жизнедеятельности микроорганизмов. Субстрат в биопроизводстве является одним из основных факторов, влияющих на быстрый рост микроорганизмов, а также накопления биомассы и максимальный синтез ими различных биологически активных веществ.

Целью исследования являлось совершенствование субстратов, используемых при биопроизводстве препаратов, содержащих *Azotobacter chroococcum*.

Объектом исследования служили штаммы *Azotobacter chroococcum*, выделенные из различных типов почв Пензенской области.

Выделение штаммов рода *Azotobacter* проводилось методом почвенных комочков на плотной среде Эшби.

Идентификацию, выделенных культур проводили методом микроскопии на световом микроскопе по описанию морфологических факторов бактерий.

В качестве объекта использовали культуру *Azotobacter chroococcum*, выделенную из почвы пахотного слоя сельхозугодий Пензенской области.

Для достижения максимального выхода биомассы использовали питательные среды различного состава. Состав питательных сред разрабатывался с учётом физиолого-биохимических характеристик продуцента.

Ещё одним фактором служило наиболее перспективное использование природного сырья, которое должно быть дешёвым и доступным.

План работы

Посеять микрофлору почвы пахотного слоя сельхозугодий Пензенской области в различных вариантах опыта.

Используемые для эксперимента материалы и оборудование:

- стерильные чашки Петри;
- аналитические весы;
- плитка;
- дистиллированная вода;
- стеклянные палочки;
- сушильный шкаф;
- термостат;
- химический стакан;
- питательная среда Эшби (концентрированная) для

культивирования азотфиксирующих микроорганизмов, (г/л): KH_2PO_4 – 2, NaCl – 2, K_2SO_4 – 1, MgSO_4 – 2, CaCO_3 (мел) – 50, маннит – 200, pH – 7,2.

В соответствии с ГОСТ воспроизведены этапы приготовления питательной среды, а именно:

1. Взвешивание: отбираются навески компонентов питательной среды на аналитических весах;

2. Растворение: компоненты питательной среды растворяют в предварительно нагретой до 70°C дистиллированной воде. Растворы макро и микросолей готовят отдельно. Растворы фосфатов, входящих в состав макросолей, также готовят отдельно, так как в процессе стерилизации в автоклаве они выпадают в осадок и в дальнейшем вновь требуют растворения.

3. Кипячение: растворы питательных сред кипятят на водяной бане в течение 2 минут.

4. Фильтрация жидких и расплавленных плотных сред производят через влажный бумажный или матерчатый фильтры. Фильтрация агаровых сред затруднена – они быстро застывают. Обычно их фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

5. Розлив сред: питательные среды разливают не более чем на 3/4 ёмкости, так как при стерилизации могут намокнуть пробки и среды утратят стерильность.

6. В ходе исследований получена плотная питательная среда для поверхностного периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* [24].

2.1 Описание эксперимента

Для определения устойчивости к пестицидам применяли фунгицид тетраметилтиурамлисульфид (ТМТД), относящийся непосредственно к дитикарбаматам, в концентрациях 1мг/мл, 0,5мг/мл, 0,1мг/мл и 0,05мг/мл, вносимых в плотную среду Эшби.

Отбор проб.

Пробы почв были взяты с трёх участков пензенской области:

1. Посёлок городского типа Золотарёва;
2. Село Мастиновка Бессоновского района;
3. Посёлок Шемышейка.

Было проведено пробное культивирование для выяснения наиболее удачного образца, в котором число колоний *Azotobacter* наибольшее.

В ходе эксперимента был выбран 2 образец, на котором проводились дальнейшие опыты. Остальные отсеялись, так как число выросших колоний на них было значительно меньше.

Приготовление питательной среды.

В стеклянный термоустойчивый стакан наливаем 600 мл дистиллированной воды, ставим его на электрическую плитку, доводим воду до кипения. Затем всыпаем в неё 2 столовые ложки пищевого агар-агара, тщательно перемешиваем. Далее высыпая в стакан заранее приготовленную смесь среды Эшби, при этом постоянно помешивая её. Ждем полного растворения веществ и снимаем стакан с плиты. Даём жидкости немного остыть, но не затвердеть. Когда смесь остыла, аккуратно заливаем её в чашку Петри, так чтобы она равномерно разлилась по ней ровным слоем. После накрываем крышкой и оставляем агар-агар затвердеть.

Внесение образцов на питательную среду.

Стеклянную палочку макаем в разведённую суспензию с почвенными образцами. Свисающую каплю на кончике палочки вносим на питательную среду. И так повторяем несколько раз в соответствии с заданным рисунком.

После культивирования в течение 2-х суток подсчитывали число колоний (КОЕ), соответствующих числу жизнеспособных клеток в опытных вариантах.

Интенсивность азотфиксации регистрировали по числу колоний азотобактера (таблица 2).

Таблица 2- Размеры колоний *Azotobacter*, культивируемых при 25-30°C (мм)

1-Золотарёвка	2- Мастиновка	3- Шемышейка
8	10	7,5
8	11	8
7	12	7
7	10	7
6,5	8	9
7	9,5	8,5
6	11	7
8	11	8
8,5	13	8
8,7	11	7,6
7	10,7	8,5
8	10	9

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью дисперсионного анализа.

Таблица– 3 Показатели среднего значения дисперсионного анализа

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия
Размер колоний, мм				
1-Золотарёвка	12	89,7	7,475	0,698409
2- Мастиновка	12	127,2	10,6	1,583636
3- Шемышейка	12	95,1	7,925	0,531136

Источник вариации	SS	df	MS	F	P- Значение	F критичес- кое
Между группами	68,495	3	22,83167	23,61006	3,00379E- 08	2,90112
Внутри групп	30,945	32	0,967031			
Итого	99,44	35				

Дисперсионный анализ показывает, что критерий Фишера значим и влияние фактора имеет высокий уровень достоверности.

Бактериальную суспензию подвергали воздействию ТМТД в концентрациях 1 мг/мл, 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл в течение 1, 2 и 3 часов.

Среду Эшби готовили из расчёта на 100 мл дистиллированной воды:

- K_2HPO_4 – 0,02 г;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,02 г;
- $NaCl$ – 0,02 г;
- K_2SO_4 – 0,01 г;
- $CaCO_3$ – 0,5 г;
- Агар-агар – 30 г.

2.1 Экспериментальная часть

Был проведён анализ полученных штаммов на отличие их по морфологическим признакам. После третьих суток культивирования на среде Эшби, 12 штаммов образовали большие по площади колонии, светлого цвета, окруженные слизистой оболочкой, диаметром от 6 до 13 мм.

Чашки Петри, с посеянными на них культурами, ставили в термостат и культивировали пять суток. После 48 и 52 часов культуры вынимали для подсчета числа выросших колоний. На вторые сутки самые высокие показатели были у образцов под номером 2, 6 и 11. Характерной чертой

образовавшихся колоний была выделенная слизь белого цвета, охватывающая весь периметр почвенного комочка. В последний день выращивания наблюдался процесс старения клеток и их колонии приобретали коричневый цвет.

На пятые сутки культивирования наблюдалось образование пигмента коричневого цвета практически у всех. У штамма № 6 и 9 сформировались колонии самого маленького размера, круглой формы, с незначительным слизистым выделением, не растекающиеся. На 5-е сутки культивирования клетки культуры образовывали светло-коричневый пигмент.

Культура штамма № 10 образовывала плоские, достаточно крупные колонии неправильной округлой формы. Клетки выделяли очень мало слизи. Уже на 5-й сутки культивирования наблюдалось образование коричневого пигмента.

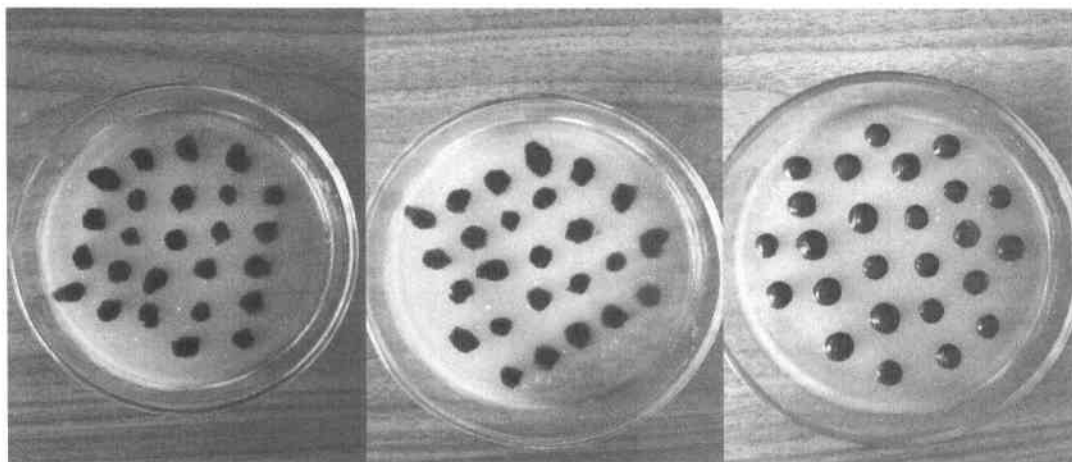


Рисунок 1. Образцы культур Azotobacter на первые сутки

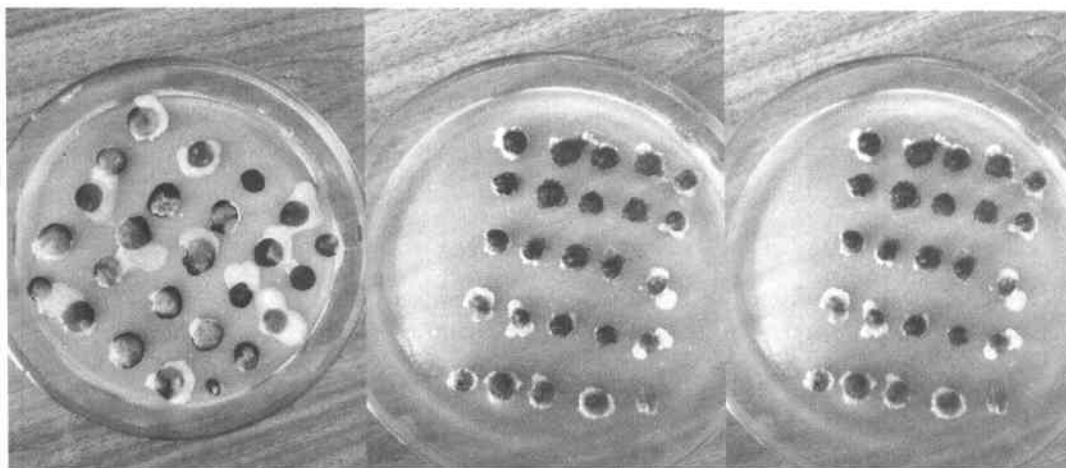


Рисунок 2. Образцы культур Azotobacter на третьи сутки

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ *AZOTOBACTER*

Из почв Пензенской области было выделено 20 штаммов бактерий, растущих на безазотной среде Эшби. В 16-ти образцах почвы, взятых с огородных участков, регистрировалось наличие значительного числа клеток азотобактера. Из 17 образцов неокультуренных почв удалось выделить только четыре штамма. Последние образцы присутствовали в почвах следующих типов: чернозём оподзоленный, чернозём, тёмно-серая лесная и серая лесная.

На плотной среде Эшби 18 штаммов образовывали крупные (до 7 мм в диаметре), слизистые, бесцветные колонии на вторые сутки культивирования. Образование пигмента происходило на 5-е сутки культивирования.

Таким образом, у штамма № 6 колонии формировались значительно меньшего размера 12 мм в диаметре, правильной округлой формы, мало слизистые, не растекающиеся, клетки образовывали светло-коричневый пигмент на 5-е сутки культивирования.

Культура штамма № 10 образовывала плоские, достаточно крупные (5-7 мм) колонии неправильной округлой формы. Клетки выделяли очень мало слизи.

Образование коричневого пигмента наблюдалось уже на 3-е сутки культивирования.

3.1 Действие пестицида ТМТД на жизнеспособность клеток различных штаммов *Azotobacter chroococcum*

Изучено отношение культуры азотобактера к присутствию в среде пестицидов.

Выявлена неравномерная реакция *Azotobacter chroococcum* на пестицид тетраметилтиурамдисульфид (рис 6). У штаммов 3, 5 9 11 12 при концентрации пестицида 0,05 наблюдалась полная жизнеспособность и самое большое число колоний. У оставшихся образцов число колоний уменьшилось вдвое и составило 40-50 %. При самой высокой дозе ТМТД 1 мг/мл процент

жизнеспособных клеток составил всего 10%, а увеличение числа колоний вовсе не наблюдалось.

Для сравнительного анализа на активность роста разных штаммов были выбраны образцы № 5, 9, 11, полученные с разных участков почв.

Таблица 4– Воздействие разных доз пестицидов на культуры *Azotobacter*

Доза пестицида, (мг/г)	Число колонии <i>Azotobacter</i>	
	3 сутки	5 сутки
1	50	80
0,5	65	90
0,05	90	95
контроль	65	70

Наибольшей активностью роста отличался штамм № 11. Остальные образцы отличались весьма малым объемом набранной биомассы, самые высокие показатели обнаруживались у штамма номер 5, и составили 70 процентов, по сравнению с остальными, значения которых после 48 часов составило 30 процентов. У штамма № 10 фиксировался ускоренный рост колоний, на первые сутки выращивания, однако уже после 3 суток масса уменьшалась. После окончания 5 суток она переходила в стадию покоя, и изменение количества колоний не наблюдалось. Штаммам № 2, 3, 7, 12 был присущ рост в логарифмической прогрессии.

Статистика по образцу № 1, самого стабильного, характеризовалась стандартным не изменяемым количеством колоний, по сравнению со всеми остальными культурами, даже после того, как в среду добавили пестицид.

Отличия в скорости роста и количестве колоний у разных штаммов, поясняются тем, что проба бралась с разных участков почв. Образцы взятые, там,

где больше растительности и ближе корневая система показали высокие результаты, а те, что набраны с сухой местности и ближе к поверхности, наоборот, низкие. Так же фактором влияния оказалась доступность клеток азотобактера к питательному субстрату.

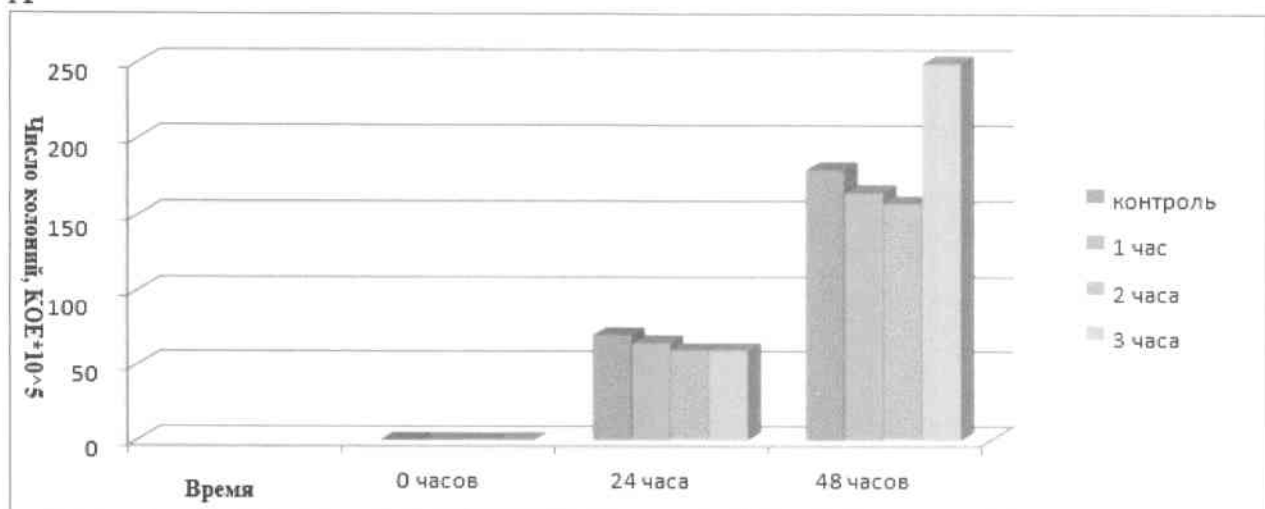
Согласно литературным данным, клетки *Azotobacter* активно фиксируют азот и могут производить физиологически активные вещества, например, ИУК, которая играет роль важного гормона у растений. Многими авторами показатели выделяемой ИУК клетками бактерий были зафиксированы, и соотнесены в процентном соотношении к скорости роста и числу колоний *Azotobacter*. Выяснено, что рост колоний имеет чёткую обратную корреляцию с содержанием ИУК.

В нашем эксперименте, самое большое количество продуктов ИУК выделено штаммами под номером 2 и 9, так как скорость роста их колоний была низкой. Расчёт показывает, что эти штаммы накапливали приблизительно 30-40 мкг на мл ИУК.

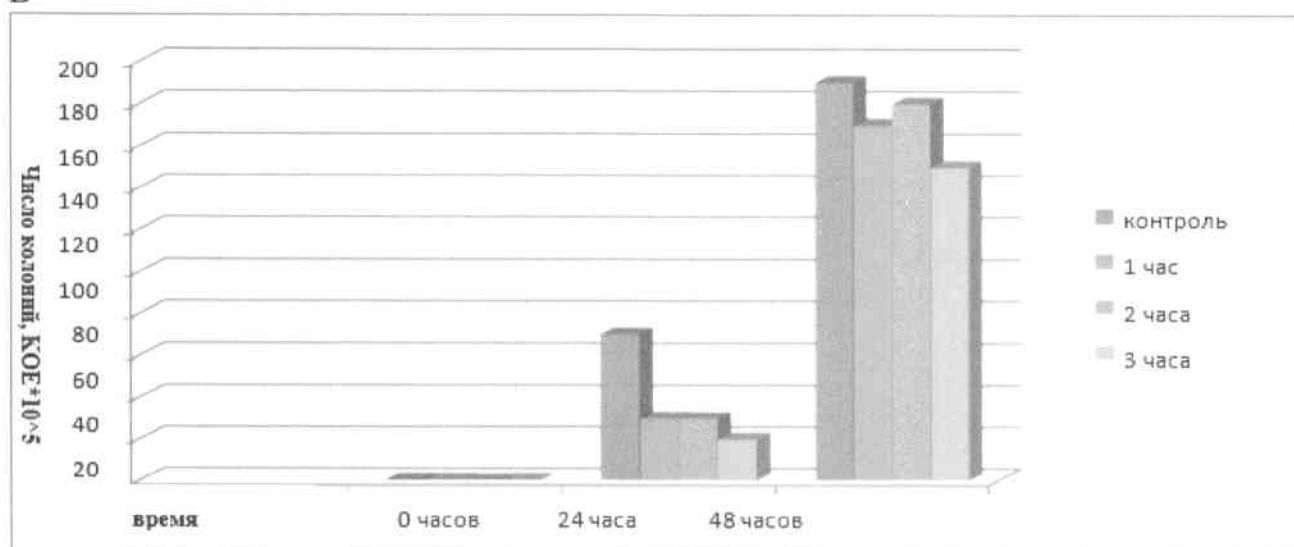
Штаммы роста колоний, которых был самый высокий, показали весьма низкую активность ИУК.

Если число колоний увеличивается, то продуктивность ИУК падает, из-за того, что энергия затрачивается на процессы азотфиксации и развитие клеток. Процент выработки может возрастать при благоприятных условиях и достаточном количестве питательных веществ на среде культивирования.

А



В



С

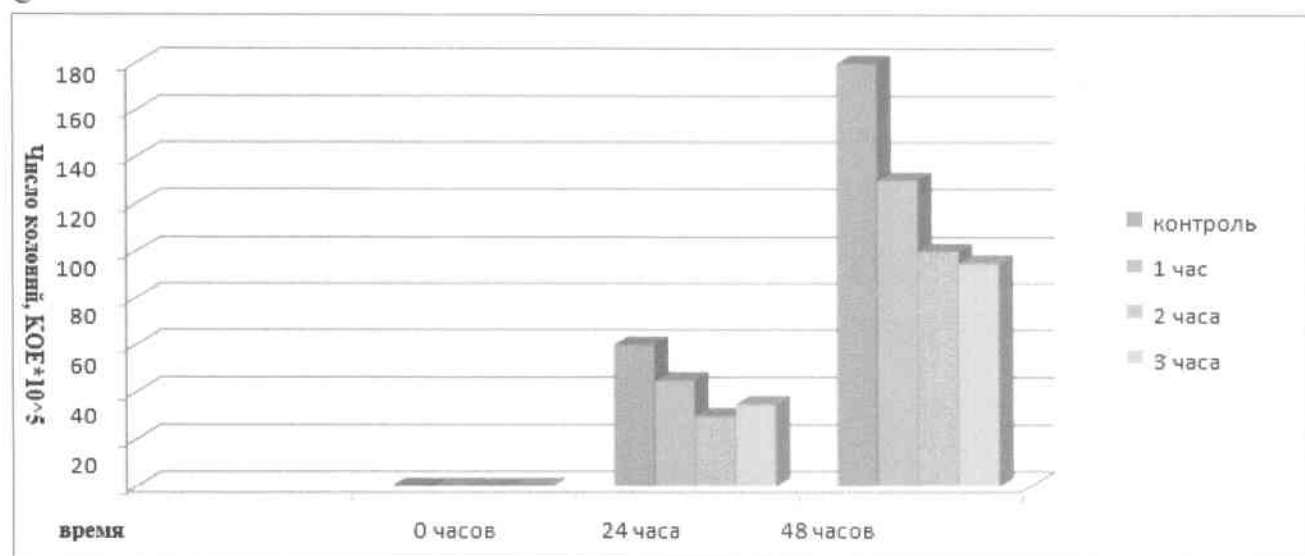


Рисунок 4. Активность роста *A. chroococcum* после контакта с ТМТД: А– в концентрации 0,05мг/ мл; В–в концентрации 0,5мг/ мл; С–в концентрации 1мг/мл.

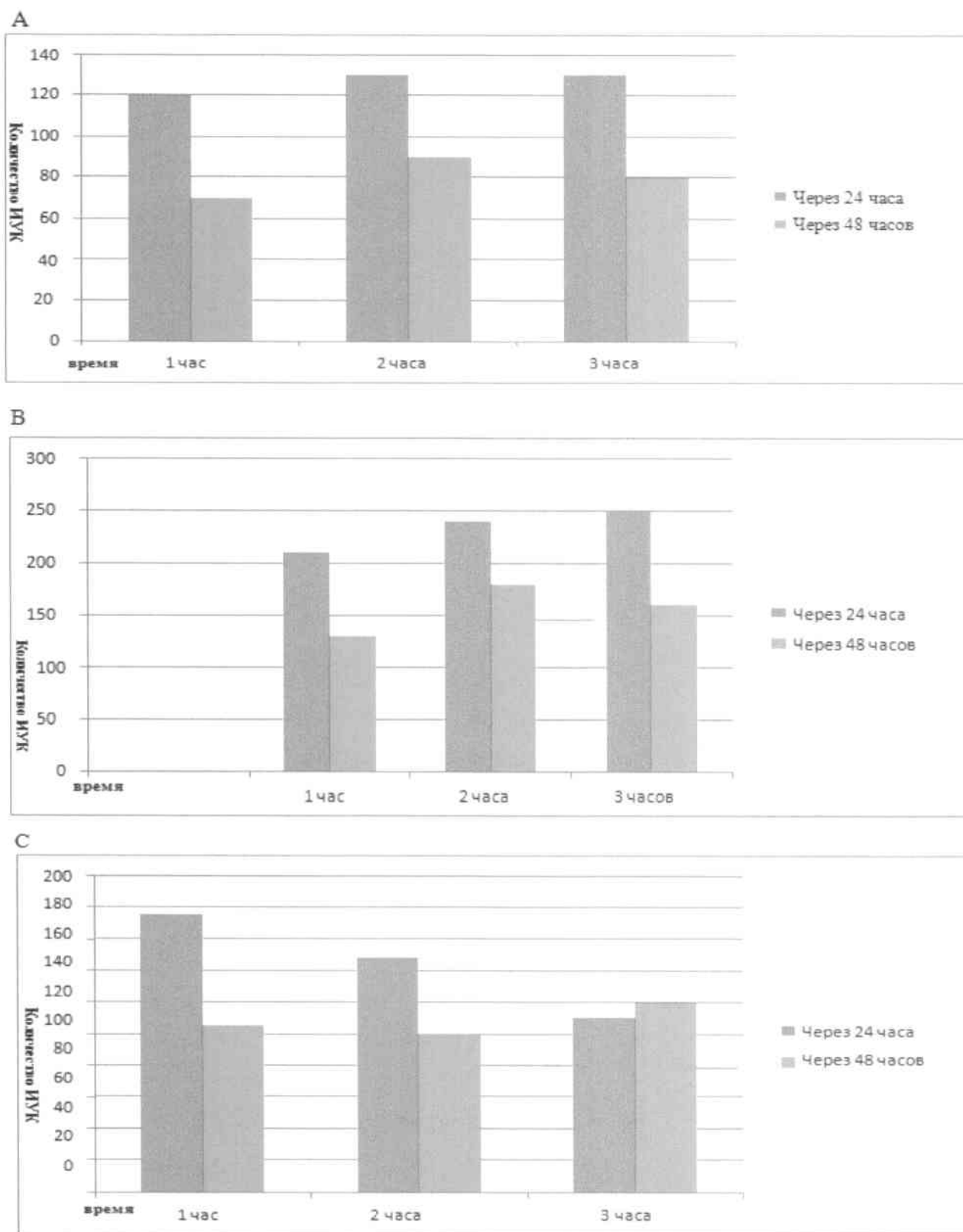


Рисунок 5. Количество ИУК продуцируемой клетками *A. chroococcum*
 А – штамм №9; В– штамм №6; С– штамм № 11

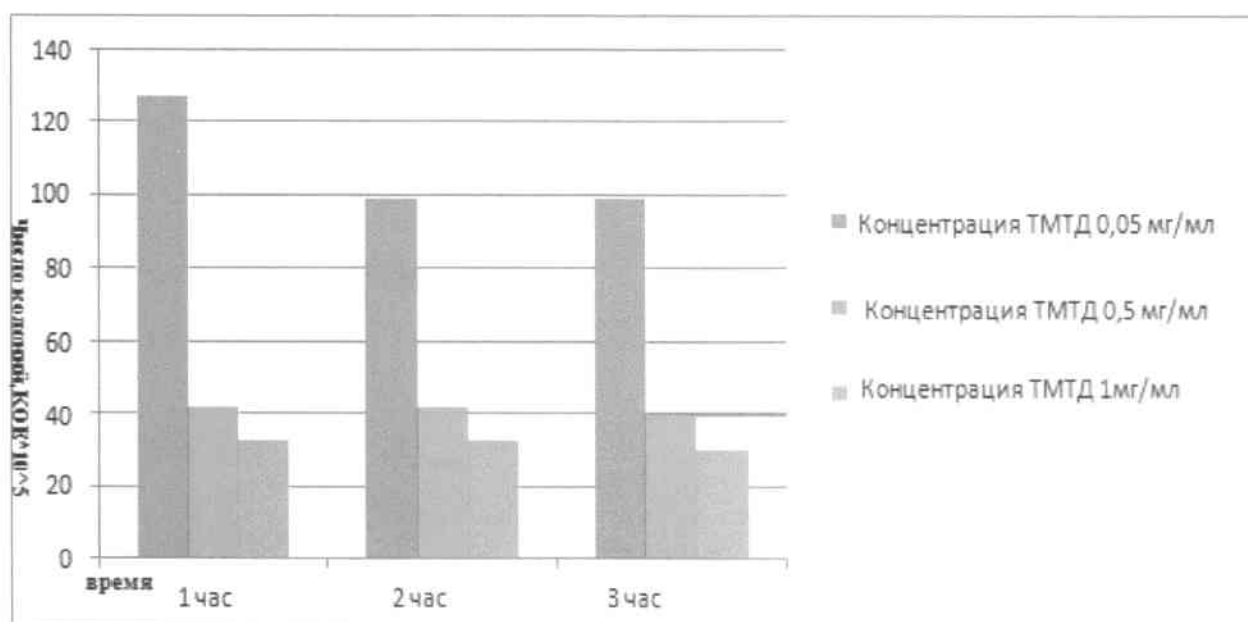


Рисунок 6. Изменение количества жизнеспособных клеток *A. chroococcum* после контакта с ТМТД

Таким образом, выявлена зависимость уровня накопления ИУК от физиологических особенностей каждого штамма микроорганизмов.

К настоящему времени известно, что процесс азотфиксации у штаммов, число колоний которых увеличивалось, протекал гораздо медленнее, чем у тех, которые росли на среде с меньшим содержанием азотных веществ и продуцировали больше ИУК.

Согласно этой корреляционной зависимости в нашем эксперименте штамм № 9 обладал самым быстрым уровнем образования азота. На вторые сутки культивирования расчётное количество азота на культивируемой среде составило 5,8 мкг/мл, что в 6 раз выше показателей азотфиксации, остальных штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о прямом влиянии внешних факторов на процесс синтеза индолил-3-уксусной кислоты и на зависимость уровня ее выделения с активностью роста культуры микроорганизма с интенсивностью азотфиксации.

Действие повышенных температур на активность роста и уровень продукции ИУК клетками *Azotobacter* представлено в таблице 5.

Эксперименты с использованием температуры в качестве стрессового воздействия нами проводились на штамме № 6.

Когда температуру повысили, рост колоний штамма номер 9 начал повышаться и увеличился на 5 % в отличие от контрольного образца. А вот штамм под номером 3 не показал изменений. Когда показатели повысили до 40 градусов, динамика роста стала заметно уменьшаться. Чем клетки дольше держали в такой температурной линии, тем активность роста снижалась. Из-за того, что среда стала неблагоприятной, развитие так же было замедлено, это стало заметно уже после получаса культивирования при высокой температуре.

Таблица 5 – Зависимость числа колоний азотобактера от температурных условий.

Номер штамма	Общее число колоний, КОЕ*10 ⁵	Температура культивирования клеток, °С
1	34	50
2	60	25
3	50	25
4	62	30
5	40	50
6	90	35
7	42	25
8	52	25
9	78	35
10	64	30
11	75	35
12	29	50
контроль	70	30

Когда показатель температуры вырос до критичных пределов (50°), стал фиксироваться резкий спад числа колоний и отмирание клеток, так как они вошли в шоковое состояние.

Полученные данные, собранные после того, как культуры подверглись экстремальному повышению температуры $45-50^{\circ}\text{C}$, свидетельствуют о том, что все образцы показали замедленный рост колоний уже после 12 часов культивирования. Если сравнивать с исходным контрольным образцом, который подвергался изменениям температурного режима и весь цикл развивался при температуре 30°C . В процентном соотношении коэффициент падения составил 60 процентов.

Статистика по числу колоний ввремя разных температурных условий показала, что клетки *Azotobacter chroococcum* после создания неблагоприятных условий, по показателям температурного режима, впадают сначала в стадию стресса и сокращают число колоний, а затем у них наступает постшоковая стадия и численность колоний начинает возрастать на 50 процентов. Ведь для таких условий характерен эффект заторможенности, чтобы не дать клеткам погибнуть. Но как только они выходят из стадии стресса им снова нужно наращивать темпы развития, и они начинают активно размножаться.

Расчет ИУК, выделяемой клетками *Azotobacter* при разных температурах, показал, что ее секреция увеличивается при высоких температурах. Наибольший выброс наблюдался при температуре 45°C .

3.2 Влияние ТМТД на активность роста и продукцию ИУК клетками *A. chroococcum*

При внесении в среду ТМТД в концентрации 0,05 мг/мл изменения числа жизнеспособных клеток не наблюдали. В концентрации 0,5 мг/мл и 1 мг/мл на первые сутки выращивания устанавливали уменьшение числа колоний клеток до 48,22% и 50%.

На 2 и 3 сутки количество колоний увеличилось в геометрической прогрессии.

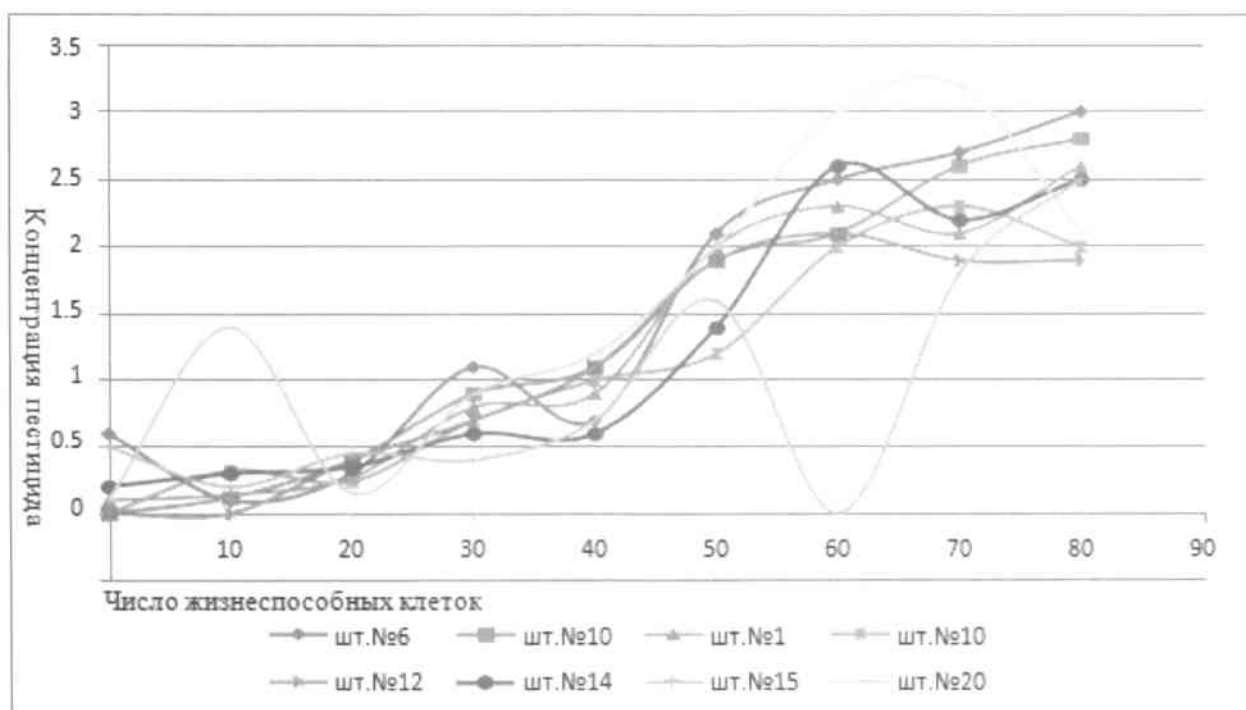


Рисунок 7. Изменение количества жизнеспособных клеток
A. chroococcum после контакта с ТМТД.

Воздействие пестицида в концентрации 0,05 мг/мл не приводило к изменению динамики роста культуры по сравнению с контролем (рис. 4, А).

Когда культуры клеток контактировали с пестицидом, концентрация которого составляла 0,5 мг/мл, относительная скорость роста колоний увеличивалась на 25 % по сравнению с контрольным образцом. Замедление, происходившее у нескольких штаммов, объясняется затратой времени на регенерацию клеток. Образцы, подвергшиеся воздействию пестицида в концентрации 1 мг/мл, не давали размножаться клеткам, тем самым показывали низкую динамику роста или вовсе отмирание клеток.

Удельная скорость роста не отличалась от контрольного варианта, и разница в количестве клеток сохранялась постоянной до конца эксперимента и была равна 40% (рис. 4, С).

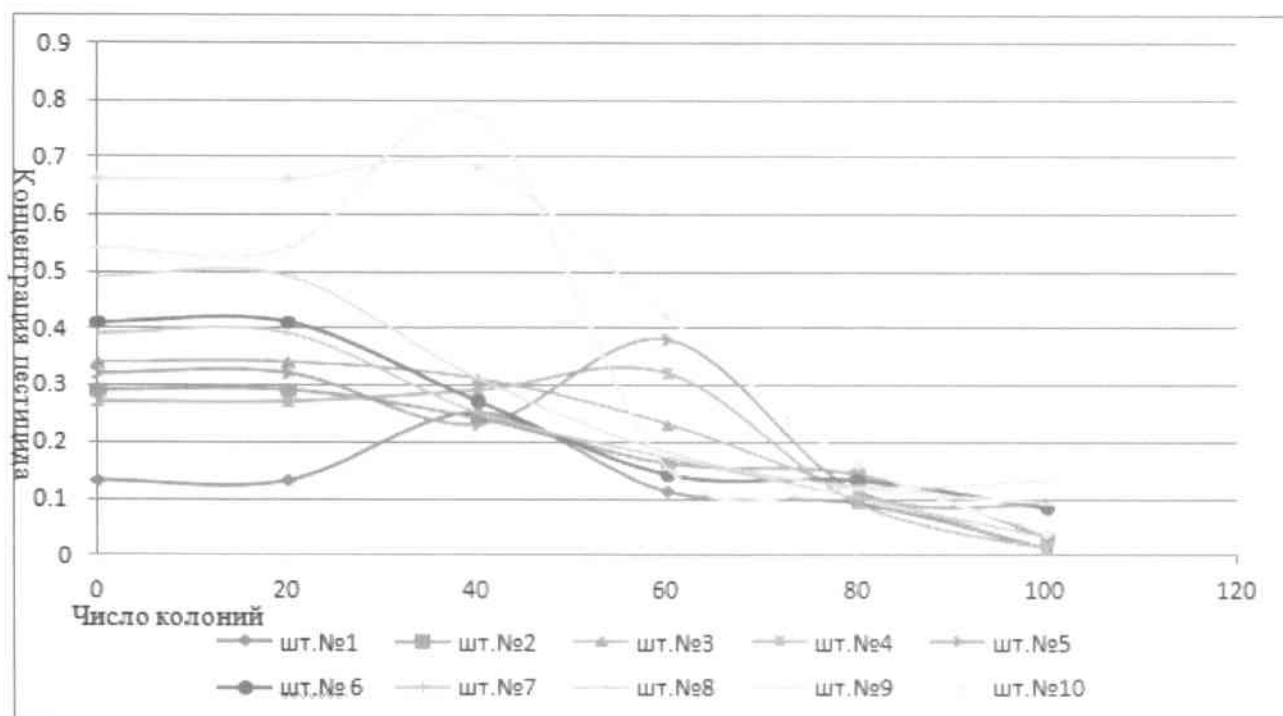


Рисунок 8. Активность роста колоний клеток *A. chroococcum* после контакта с ТМТД.

По-видимому, при данной (1 мг/мл) концентрации ТМТД происходило необратимое нарушение в развитии адаптационных процессов в клетке.

Однако при переносе культуры в благоприятные условия наблюдалось повышение ростовой активности, свидетельствующие о выходе культуры из стрессового состояния.

Данные представлены на рисунке под номером 6 в процентах относительно контроля, принимаемого за 100%.

Выявлен дифференцированный эффект действия пестицида на уровень продукции ИУК азотобактером ТМТД в концентрации 0,05 мг/мл не оказывал эффекта на продукцию ИУК во всех вариантах эксперимента (рис. 5, А).

Концентрация пестицида, равная 0,5 мг/мл, вызывала увеличение синтеза ИУК клетками бактерий (рис. 5, В), о чём свидетельствовал анализ её содержания через 24 часа культивирования.

Действие пестицида в концентрации 1мг/мл после одночасовой экспозиции также приводило к статистически достоверному увеличению

продукции фитогормона клетками азотобактера через 24 часа культивирования на 83,4, 112,7%.

Таким образом, сопоставляя, полученные результаты в экспериментах с действием пестицида и теплового шока на продукт ИУК клетками Азотобактера, мы наблюдаем сходную картину.

Таким образом, воздействие температуры (40⁰С в течение 5 и 15 минут) и ТМТД в концентрации 0,05 мг/мл, не оказывающее влияния на жизнеспособность клеток культуры азотобактера, также не сказывалось на уровне продукции индолил-3-уксусной кислоты.

При увеличении дозы воздействия (температура 45⁰С, экспозиция 15 мин и 50⁰С, экспозиция 5 мин., концентрация ТМТД 0,5 мг/мл), приводящей культуру к состоянию стресса, наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток и временная приостановка роста.

Однако после прекращения действия стрессора культура азотобактера характеризовалась ускоренным темпом роста и увеличением уровня продукции ИУК. Более значительные дозы неблагоприятного воздействия (50⁰С, экспозиция 15 мин, и концентрация ТМТД 1 мг/мл) вызывали снижение количества жизнеспособных клеток в культуре, не сопровождавшееся ускорением роста культуры после стресса и увеличением секреции ИУК.

Таким образом, обнаружена взаимосвязь температура и концентрация пестицида на культуру азотобактера и уровнем продукции ИУК.

Производили посев взвеси *Azotobacter chroococcum* (3x10² КОЕ) из расчёта 1 мл на чашку. Выращивание культур осуществлялось при 25⁰С. По истечении вторых суток рост не зафиксирован ни на одной из питательных сред. Скорость роста оценивали на 3- и 4-е сутки.

Через 72 часа рост зафиксирован на всех средах, колонии круглые выпуклые блестящие непрозрачные слизистой консистенции размером 2-3 мм (рисунок 5). По истечении 5 суток самый обильный рост зафиксирован в

среде № 4. Существенного отличия морфологических и культуральных характеристик не наблюдалось.

Подбор питательной среды при промышленном производстве биопрепаратов является решающим фактором успешного наращивания биомассы.

Выявлена обратная зависимость продукции индолил-3-уксусной кислоты от активности роста и уровня азотфиксации штаммов *Azotobacter chroococcum*, что свидетельствует об адаптационном значении секреции ИУК в жизнедеятельности азотобактера.

Доказано, что при правильно подобранной концентрации применяемого пестицида культуры клеток *Azotobacter chroococcum*, можно сохранить их тенденцию к увеличению числа колоний. Так как при концентрации пестицида, равной 0,05 мг/мл, почти у всех штаммов сохранялась жизнеспособность несмотря на то, что ТМТД оказывает угнетающее воздействие на микроорганизмы.

Однако полное подавление жизнеспособности клеток всех штаммов наблюдалось в присутствии пестицида в концентрации 1 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сельском хозяйстве Пензенской области применяется небольшое количество пестицидов. Их использование за последние десятилетия значительно снизилось приблизительно в полтора раза.

Пестициды, применяемые для опыления полей и лесов области, влекут за собой изменения почвенной среды, уменьшается количество почвенных бактерий, что приводит к ухудшению состояния почв. Но по проблеме влияния пестицидов на микрофлору почвы и гумуса, а так, жена изменение состава органического азота проводится мало исследований. Хотя экологический мониторинг сельхозугодий и лесополос Пензенской области оценивает их состояние как неблагоприятное. Поэтому требуется проведение мероприятий по обсуждению данной проблемы, дабы повысить уровень плодородности земель.

В настоящее время в приоритете внедрения находится особые современные способы земледелия, с наименьшим использованием химических веществ. Они обеспечат более экологически чистые продукты, соответствующие всем требованиям СанПиН.

Для решения данной проблемы внедряются способы естественного и безопасного поддержания нормального роста и развития сельскохозяйственных культур, а именно при опылении используются только разлагаемые химические вещества, применяются органические отходы и перегной.

К естественным и безопасным отраслям можно отнести биологическое земледелие, в котором используют способы внесения в почву препаратов, содержащих живые бактерии рода *Azotobacter*. Бактерии азотфиксаторы играют одну из основных ролей в круговороте азота в природе, они способны переводить молекулярный азот, содержащийся в атмосфере, в растворимую, доступную для растений форму. Также данный вид бактерий практически не

проявляет антагонистические свойства по отношению к другим почвенным микроорганизмам и фиксирует азот в количестве, не приводящем к его избыточному накоплению в почве. Высокая продуктивность выращивания сельскохозяйственных культур на таких почвах повышается на 15-20%, что подтверждает необходимость использования препаратов азотобактера в сельхозпроизводстве на современном этапе развития.

В связи с этим совершенствование технологии производства биопрепаратов, содержащих в своём составе бактерии *Azotobacter chroococcum*, весьма актуально.

Неотъемлемой частью технологического процесса по производству биопрепаратов, содержащих в своём составе живые микроорганизмы, является использование питательных субстратов.

Субстрат в биотехнологическом производстве является одним из основных факторов, влияющих на интенсивность роста производственных культур, накопления биомассы и продуктов биосинтеза.

Целью работы явилось совершенствование субстратов, используемых при биопроизводстве препаратов, содержащие *Azotobacter chroococcum*.

Использование пестицидов востребовано коммерческим интересом промышленного сельскохозяйственного производства, которое ориентировано на такие простые показатели, как стойкость и величина урожая, его сохранность и устойчивость к перевозке. Но не учитывается существенное снижение таких качеств получаемой продукции, как микроэлементный состав, полезность и безопасность для здоровья потребителей. Глобальной проблемой стало и разрушение биоценозов в районах применения пестицидов.

Пестициды губительно действуют на многих плотоядных, особенно птиц. Птицы особенно чувствительны к ДДТ и другим хлорорганическим пестицидам, поскольку те влияют на метаболизм кальция и вызывают истончение скорлупы откладываемых яиц. Это приводит к снижению

устойчивости яиц к механическим воздействиям и как следствие — к снижению успешности размножения [13].

Многие пестициды очень устойчивы и распространяются далеко от мест применения. Пестициды (в том числе и консерванты) часто вызывают аллергию, диатез и некоторые другие заболевания. Особенно опасны системные пестициды, проникающие во все ткани животных и растений. Обычно пестициды также повышают продуктивность на нижних трофических уровнях и понижают на верхних.

Азотобактер является родом бактерий, живущих в почве и способных в результате процесса азотфиксации переводить газообразный азот в растворимую форму, доступную для усвоения растениями.

Бактерии, относящиеся к роду *Azotobacter*, обладают значительным средообразующим потенциалом, который в первую очередь определяет продукция широкого спектра физиологически активных веществ. Многочисленные публикации отмечают стимулирующий эффект действия азотфиксирующих микроорганизмов на рост и развитие растений. Кроме того, инокуляция семян активными рост микроорганизмами, в частности азотобактером, способствует повышению резистентности к фитопатогенам, а также снижению накопления в растениях ионов тяжелых металлов и радионуклидов.

В почвах, загрязненных нефтепродуктами, штаммы азотобактера способствуют формированию специфической микрофлоры, осуществляющей процесс активного разложения углеводов нефти.

В связи с выше сказанным на современном этапе развития сельского хозяйства важно собирать информацию о степени присутствия и частоте встречаемости бактерий рода *Azotobacter* в разных типа черноземных почв, а также о биохимической и физиологической активности различных штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы азотобактера, выделенные из разных типов почв Пензенской области, различаются по количественному содержанию в них бактерий рода *Azotobacter*. Установлена зависимость частоты выделения азотобактера от типа почвы - наибольшая высеваемость обнаружена на окультуренных, черноземных почвах (эффективность роста азотобактерий 84%).
2. Построенная по литературным данным калибровочная кривая концентраций ИУК указывает, что в наших образцах содержание этого фитогормона может достигать в максимуме 250 мкг/мл, у штаммов, выделенных из почв села Мастиновка Бессоновского района. И минимальное содержание у штаммов из почв поселка городского типа Золотарёвка, что, очевидно, связано как с условиями произрастания, так и типом почв.
3. Активность азотфиксации, оцененная по активности роста колоний, видимо, связана с обратной зависимостью от продукции индолил-3-уксусной кислоты. Наиболее активными азотофиксаторами в наших экспериментах оказались штаммы № 6, 11 и 12.
4. На основе данных, полученных в ходе проведённого эксперимента, выявлено 12 штаммов *Azotobacter*, обладающих устойчивостью к пестицидам. Наиболее устойчивыми оказались штаммы № 3, 9, и 11, выделенные из почв в районе села Мастиновка.
5. Установлена допустимая норма концентрации пестицида тетраметилтиурамдисульфида для использования в агротехнике без вреда для *Azotobacter chroococcum*, она равна 0,05 мг/мл раствора на 1 квадратный метр почвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арипов Т. Ф. Ташпулатов Ж. Ж. Микроорганизмы зон пестицидного загрязнения // Биотехнология состояние и перспективы развития: тез. докл. VIII Московского международного конгресса. - М. - Россия. - 2015. - часть 2. - 394-395 с.
2. Алексеева. А.Е. Роль индолил-3-уксусной кислоты в жизнедеятельности *Azotobacter chroococcum* // Тез. докл. XI Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины). Нижний Новгород, 2014. 198 – 199 с.
3. Алексеева, А.Е. Влияние некоторых современных пестицидов на жизнеспособность азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter chroococcum* // Тез доклад VIII международной Пущинской школы конференции молодых ученых. Пущино. 2014. 75-76 с.
4. Алексеева. А. Е. Физиологическая активность бактерий *Azotobacter chroococcum* под действием некоторых пестицидов/А.Е. Алексеева // Тездокл. X Нижегородской сессии молодых ученых (естественнонаучные дисциплины). Нижний Новгород. С. 250 – 251.
5. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. New York: Springer-Verlag, 2012.
6. Бояндин А.Н., Прудникова С.В., Филипенко М.Л., Храпов Е.А., Васильев А.Д., Волова Т.Г. Биodeградация полигидроксиалканоатов почвенными микробоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов деструкторов // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. №1. С. 35-44.
7. Волков О. Г. Правда и вымысел о пестицидах // Охрана дикой природы. - 2015. - №6. - С. 16-19.
8. Воронин Л.В., Колесникова И.Я. Инициированные комплексы почвенных грибов в агроценозах // Ярославский педагогический вестник. 2013. №1 (том 3). С. 90-93.

9. Гальперин М. В. Общая экология / М.В. Гальперин // М.: Форум: ИНФРА-М, 2014. 336 с.
10. Ганиев М.М. Химические средства защиты растений. /М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков// М.: Колос С, 2015. 248 с
11. Гарбуз С. А., Корытова В. Е. Подбор оптимальной питательной среды для гомогенного, периодического культивирования *Azotobacter chroococcum* // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 12. – Ч. 1. – С. 12-14.
12. Государственный стандарт "Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа" от 19 декабря 1984 № 17.4.4.02 // Издательство стандартов № 1985. 1 января 1985 г.
13. Государственный стандарт "Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб" от 21 декабря 1983 № 17.4.3.01 // Издательство стандартов № 1984. 1 июля 1984 г.
14. Добровольский Г. В., Никитин Е.Д. Функции почв в биосфере и экосистеме. – М.: Наука, 2015. 261 с.
15. Доросинский Л. М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. – Л.: Колос, 2014. – 190 с.
16. Закон Российской Федерации "Федеральный закон N 109-ФЗ "О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами" (с изменениями и дополнениями)" от 19 июня 1997 г. Собрание законодательства Российской Федерации. 21 июля 1997 г. № 29. с изм. и допол. в ред. от 19 июля 2011 г.
17. Замотаева Н. А. Практикум по микробиологии для студентов специальности Агрономия. Саранск 2013. 234-238 с.
18. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии: учебное пособие для студентов. – М.: Мир, 2016. – 504 с.

19. Круглов Ю. В. Микробиологические аспекты применения гербицидов в сельском хозяйстве: Автореф. дис. доктора биол. наук. - Москва, 1984 – 46 с.
20. Калганова Т.Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы / Южно-Сахалинск: СахГУ, 2017. 56 с
21. Ладыгина Г.Н. Использование биопрепаратов для стимуляции роста и подкормки растений // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Эколого-экономические основы формирования агробиогеоцепозов». Н.Новгород, 2016, С. 79- 83.
22. Ладыгина. Г. Н. Экологический кризис и микробиологические последствия // Тез.докл. Саратов, 2009. 206-207 с.
23. Ладыгина, Г.Н. Актуальные проблемы микробиологии в условиях экологического кризиса // Материалы VIII Всероссийского популяционного семинара «Популяции в пространстве и времени». Нижний Новгород, 2015.С. 190 -193.
24. Микроорганизмы в почве // Agrocounsel.ru; сайт о вредителях и болезнях полевых культур URL:<http://www.agrocounsel.ru/mikroorganizmy-v-pochve>.
25. Минеев В. Г. Агрохимия: учебник. 3 изд. /В.Г. Минеев// М.: Наука, 2012. 720 с.
26. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. – М.: Наука, 2010. – 342 с.
27. Маккензи Р.А., УиддоусонЭ.М., Основные таблицы // Справочник Макканса и Уиддоусона. Химический состав и энергетическая ценность пищевых продуктов / под ред. А.К. Батурина. – 6-е изд. – СПб.: Профессия, 2016. – 416 с.
28. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы: учеб. пособие. – Санкт- Петербург: изд-во «ЭЛБИ-СПб», 2015. – 147 с.
29. Милехина, Н.В. Почвенная микробиология: учебно-метод. пособие для лабораторно-практических занятий: для студентов

- агроэкологического института обучающихся по направлению 110100–Агрохимия и агропочвоведение. Классификация (степень) выпускника–бакалавр / Н.В Милехина. – Брянск: Издательство Брянской ГСХА, 2014 – 56 с.
30. Орлов Д.С. Химия почв // М.: Московского университета, 2016. 376 с.
 31. Олюнина, Л.Н. О роли индолилуксусной кислоты в формировании знаний о «бактерии высшие растения / Л.Н. Олюнина, В. П. Шабаев, А.Е. Алексеева, Ю. А. Мацкова // Ярославль, 2016.С. 167.
 32. Олюнина, Л.Н. Развитие стресс реакции клеток *Azotobacter chroococcum* при ответе на тепловой шок / Л.Н. Олюнина, Т.А. Гончарова, Ю.Ю. Гущина, А.Е. Алексеева, Ю.А. Мацкова // Тез. докл. Съезда физиологов растений России.Пенза, 2015.С. 187.
 33. Прунова О. В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. /О.В. Прунова, О.Н. Сахно, М.А. Мазиров// Владимир: Издательство Владимирского ГУ, 2016.292 с.
 34. Павлович. С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. – Минск: Высшая школа, 2013.
 39. Baillie. A. Flagellation of *Azotobacter* spp. As Demonstrated by Electron Microscopy / A.Baillie, W.Hodgkiss, J.R.Norris // Journal of Applied Microbiology. — 1962. — Т.25. — № 1. — С. 116—119.
 40. Bellenger. J. P. Vanadium Requirements and Uptake Kinetics in the Dinitrogen - Fixing Bacterium *Azotobacter vinelandii* / J.P.Bellenger, T.Wichard, A.M.Kraepiel // Applied and Environmental Microbiology. — 2008. — Т. 74. — № 5. — С. 1478–1484.
 41. Bürgmann. H., mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of *nifH* Gene Expression by *Azotobacter vinelandii* in Soil / H.Bürgmann, F.Widmer,W.V Sigler, J.Zeyer// Applied and Environmental Microbiology. — 2003. — Т. 69. — № 4. — С. 1928—1935.

42. Chen. J. H. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. / J.H Chen., D.R.Czajka, L.W.Lion, M.L.Shuler, W.C.Ghiorse// Environmental Health Perspectives. — 1995. — T. 103. — № 1. — C. 53—58.
43. Curatti. L. Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*/ L.Curatti, C.S.Brown, P.W.Ludden, L.M. Rubio // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2005. — T. 102. — № 18. — C. 6291—6296.
44. Durrant. M. C. Evidence for a dynamic role for homocitrate during nitrogen fixation: the effect of substitution at the α -Lys426 position in MoFe-protein of *Azotobacter vinelandii* / M.C.Durrant, A.Francis, D. J. Lowe, W. E.Newton, K.Fisher // Biochemistry Journal. —2006. 261 c.
45. Maier. R.J. Role of the *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase-Protective Shethna Protein in Preventing Oxygen-Mediated Cell Death / R.J.Maier, F.Moshiri// Journal of Bacteriology. — 2000. — T. 182. — № 13. — C. 3854—3857.
46. Martinez. I. A crucial arginine residue is required for a conformational switch in NifL to regulate nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*/ I.Martinez-Argudo, R.Little, R.Dixon // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2004. — T. 101. — № 46. — C. 16316—16321.
47. Martyniuk. S. Occurrence of *Azotobacter* Spp. in Some Polish Soils /S.Martyniuk, M.Martyniuk// Polish Journal of Environmental Studies. — 2003. — T. 12. — № 3. — C. 371—374.
48. Mitra. R. Identification of a Positive Transcription Regulatory Element within the Coding Region of the *nifLA* Operon in *Azotobacter vinelandii* / R.Mitra, H.K. Das, A.Dixit // Applied and Environmental Microbiology. — 2005. — T. 71. — № 7. — C. 3716—3724.
49. Money. T. Protein-Protein Interactions in the Complex between the Enhancer Binding Protein NIFA and the Sensor NIFL from *Azotobacter vinelandii* / T.Money, J.Barrett, R.Dixon, S. Austin // Journal of Bacteriology. — 2001. — T. 183. — № 4. — C. 1359—1368.

50. Miller. R. W. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase / R.W.Miller,R.R.Eady// *Biochemistry Journal*. — 1988. — T. 256. — №2.—C.42.

51. Thomas J.C., Berger F., Jacquier M., Bernillon D., Baud-Grasset F., Truffault N., Normand P., Vogel P.M., Simonet P. Isolation and characterization of Novel γ -hexachlorocyclohexane-degradation bacterium // *J. of Bacteriology*. - 1996. - Vol. 178.-№20.-P. 6049-6055.

52. Wauchope R.D., Buttler T.M., Hornsby A.G., Augustijn-Beckers P.W.M., Burt J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decisionmaking Rev//*Environ. Contam. Toxicol.* - 1992. - Vol. 123. - P. 1-155.

53. Wyszowska J. Microbiological properties of soil contaminated with the herbicide Treflan 480 EC // *Polish J. Natur. Sci.* - 2002. - Vol. 10. - № 1. - S. 71 - 77.