

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
Т.Г. Волова  
подпись инициалы, фамилия  
« 19 » июня 2017 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Исследование эффективности применения депонированных форм фунгицида тебуконазола для борьбы с возбудителями корневых гнилей пшеницы.

Руководитель

С.В. Прудникова  
подпись, дата

д-р биол. наук  
должность, ученая степень

С.В. Прудникова  
инициалы, фамилия

Выпускник

Н.В. Стрельцова  
подпись, дата

Н. В. Стрельцова  
инициалы, фамилия

Красноярск 2017

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Исследование эффективности применения депонированных форм фунгицида тебуконазола для борьбы с возбудителями корневых гнилей пшеницы» содержит 39 страниц, 10 иллюстраций, 40 использованных источников.

ДЕПониРОВАННЫЕ ФУНГИЦИДОВ, ТЕБУКОНАЗОЛ, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ), ФУЗАРИОЗ, КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ ПШЕНИЦЫ.

Целью данной работы было проведение сравнительного анализа фунгицидной активности тебуконазола, депонированного в поли(3-гидроксибутират) в виде гранул, пленок и прессованных форм, и коммерческого препарата тебуконазола (Раксил Ультра) в отношении возбудителей корневых гнилей пшеницы.

Задачи работы: 1). Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на развитие грибов рода *Fusarium* в почвенных микросистемах. 2). Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на развитие сапротрофных и патогенных грибов в ризосфере пшеницы при естественном инфекционном фоне и дополнительной инфекционной нагрузке. 3). Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на степень заражения пшеницы корневыми гнилями.

Использование депонированных форм сельскохозяйственных препаратов позволяет снизить отрицательное воздействие на окружающую среду и повысить эффективность активного вещества за счет пролонгированного действия препарата. В качестве основы для депонирования в данном исследовании использовался биоразрушаемый полимер поли(3-гидроксибутират). Исследования показали, что все депонированные формы тебуконазола обеспечивают пролонгированное фунгицидное действие препарата в отношении грибов рода *Fusarium* и других возбудителей корневых гнилей (*Alternaria*, *Bipolaris*). Максимальную эффективность пленок и гранул наблюдали в условиях высокой численности фитопатогенов; в условиях естественного инфекционного фона эффективность депонированных форм сопоставима с коммерческим препаратом.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1 Влияние пестицидов на окружающую среду .....	6
1.2 Контролируемые системы доставки .....	7
1.3 Биоразрушаемые полимеры .....	9
1.4 Характеристика ПГА и их применение в сельском хозяйстве. ....	11
1.5 Корневые гнили.....	13
1.5.1 Фузариоз .....	13
1.5.2 Альтернариоз.....	14
1.5.3 Гельминтоспориоз .....	14
1.5 Тебуконазол.....	15
Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	17
2.1 Общий план эксперимента.....	17
2.2 Учет микромицетов в почве.....	19
2.3 Фитосанитарный анализ семян.....	20
2.4 Методы анализа зараженности пшеницы корневыми гнилями .....	22
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	26
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	28

## ВВЕДЕНИЕ

С увеличением численности населения нашей планеты увеличивается и потребность в пищевых ресурсах, поэтому крайне важно развитие сельского хозяйства. К тому же, сельскохозяйственная продукция используется не только в пищевой отрасли, но и в других областях, таких как медицина и текстильная промышленность, а для удовлетворения всех потребностей требуются большие объемы данной продукции.

Достигнуть высокой продуктивности растений сельскохозяйственных культур помогают различные удобрения и пестициды. Пестициды позволяют бороться с различными видами вредителей сельскохозяйственных культур, от насекомых и сорных растений до микроскопических грибов.

Но все же, применение различных химических веществ, для увеличения урожая имеет не только положительные результаты, но и ведет к различным негативным последствиям. Пестициды имеют свойство накапливаться в почве и в самих растениях, для защиты которых они используются. Это приводит к ухудшению состояния почвы и всей окружающей среды, так как вместе с проточными водами пестициды могут попадать в воду, и, в конечном счете, в организм человека и животных, что, несомненно, не приносит ему пользы [35]. Снижению концентрации используемых пестицидов, и, как следствие, снижению загрязнения окружающей среды может способствовать внедрение в сельскохозяйственную отрасль разработок биотехнологов.

В области биотехнологии ведутся активные работы по созданию эффективных систем доставки пестицидов непосредственно к месту назначения и контролируемого высвобождения небольшими дозами. Использование биоразрушаемых полимеров помогло бы не только предотвратить загрязнение окружающей среды, но и увеличить качество сельскохозяйственной продукции [26].

Представителями биоразрушаемых полимеров являются полигидроксиалканоаты. Эти полимеры могут разлагаться под действием

микроорганизмов, постепенно высвобождая депонированные в них вещества, также они легко способны менять свои свойства в зависимости от условий обработки. Эти их свойства отвечают вышеназванным целям применения данного полимера [17]. В данной работе будут рассмотрены новые формы фунгицида тебуконазола, депонированные в биополимер поли(3-гидроксибутират).

Целью данной работы было проведение сравнительного анализа фунгицидной активности тебуконазола, депонированного в ПГБ<sup>1</sup> в виде гранул, пленок и прессованных форм, и коммерческого препарата тебуконазола (Раксил Ультра) в отношении возбудителей корневых гнилей пшеницы. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на развитие грибов рода *Fusarium* в почвенных микросистемах;
2. Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на развитие сапротрофных и патогенных грибов в ризосфере пшеницы при естественном инфекционном фоне и дополнительной инфекционной нагрузке;
3. Оценить влияние различных способов доставки тебуконазола на степень заражения пшеницы корневыми гнилями.

---

<sup>1</sup> Поли(3-гидроксибутират)

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Влияние пестицидов на окружающую среду

Ни один пестицид не может воздействовать только на тот организм, для которого он предназначен. Пестициды также будут оказывать свое влияние на микрофлору почвы, что может, в конечном счете, отразиться на её плодородии. Нарушение баланса микроорганизмов в почве под действием пестицидов может привести к гибели тех микроорганизмов, которые определяли её основные свойства. Или же, наоборот, к развитию микроорганизмов способных изменить свойства почвы в сторону неподходящую для сегодняшнего её назначения [23]. Также пестициды способны накапливаться в почвах и в дальнейшем поглощаться растениями, в том числе и теми, для защиты которых они и используются, и другими организмами, для которых почва является средой обитания или употребляющих в пищу, выращенные с использованием пестицидов, растения. Как правило, данные соединения будут оказывать отрицательное воздействие на поглощающие их организмы [12].

К тому же пестициды и продукты их разложения могут оказывать свое влияние на почву и просто своим присутствием ней. Эти химические соединения способны сдвигать химический баланс почвы в нехарактерную для неё сторону, что так же приведет к снижению урожая сельскохозяйственных культур [27].

Пестициды, вымываемые из почвы талыми и дождевыми водами, могут разноситься на большие расстояния, тем самым загрязняя и те почвы, которые не имеют непосредственного контакта с обрабатываемыми данными веществами площадями. Конечным пунктом путешествия пестицидов очень часто становятся водоемы, используемые в качестве источника питьевой воды для различных организмов, в том числе и человека. В конечном счете, различными путями пестициды возвращаются к человеку, но приносят с собой уже не пользу для сельского хозяйства, а вред для здоровья человека [32].

Внедрение новых биотехнологических разработок в области защиты растений может повысить эффективность сельскохозяйственных препаратов и, в тоже время, уменьшить отрицательное воздействие пестицидов на окружающую среду. Создание специфических систем доставки и контролируемого высвобождения пестицидов в окружающую среду помогло бы достигнуть желаемых целей [18].

## **1.2 Контролируемые системы доставки**

Контролируемые системы доставки представляют собой препаративную форму, которая содержит активное и инертное вещество. Данные системы позволяют повысить эффективность активного вещества и уменьшить его воздействие на окружающую среду. Такие системы могут использоваться для доставки питательных веществ и пестицидов [2].

На данный момент ведутся активные поиски материалов, пригодных для депонирования пестицидов и удобрений. В качестве таких материалов могут использоваться различные соединения, как природного происхождения, так и синтетические. Наиболее часто применяемые материалы природного происхождения - это полисахариды - целлюлозы, агарозы, альгинаты, каррагинаны, крахмал, декстран, хитозан; белки - желатин и альбумин. Из синтетических материалов используются полистирол, полиакриламид, полиамиды, полиэфиры, полиуретаны, amino-альдегидные смолы. Также могут быть использованы и неорганические материалы, такие как кремнезем, цеолиты, неорганические оксиды, бусы из стекла и керамики. Обеспечить варьирование скорости высвобождения активного вещества можно не только за счет разных свойств основы для депонирования, но и используя различные формы, размеры препарата [29, 35].

Наиболее распространенными формами препарата являются микрокапсулы, микрочастицы, микросферы. Данные препараты отличаются друг от друга в зависимости от техники производства и распределения

активного вещества в них. В микрокапсулах активное вещество располагается в центре в виде ядра и окружено полимером или другим материалом, в микросферах может быть множество ядер. Также различают нанокапсулы и наносферы – размер таких частиц менее 1 мкм [33, 34, 38].

В зависимости от свойств, используемых в качестве основы для депонирования материалов, различают следующие виды контролируемых систем доставки: системы химических соединений, системы физической комбинации. В химических системах «упаковка» необходимого вещества осуществляется за счет образования различных химических связей между целевым веществом и матрицей. При этом образуется новое соединение, которое имеют новые свойства, что требует дополнительного изучения данных продуктов. Также для образования химических связей необходимо наличие свободных функциональных групп, что может потребовать дополнительной обработки материала. Высвобождение целевого вещества происходит при разрушении химических связей под действием различных факторов.

В системах физической комбинации не происходит химического взаимодействия между активным веществом и основой для депонирования – не требуется наличие свободных функциональных групп, не происходит образование новых соединений, а значит, целевое вещество не изменяет своих свойств. В связи с этим, именно системы физической комбинации находят более широкое применение на практике [28].

Примерами использования контролируемых систем доставки могут быть препараты мочевины в комбинации с формальдегидом или серой. Капсулы мочевины покрываются данными веществами, также для достижения лучшего эффекта используются различные полимеры, как природные, так и синтетические. Постепенно разлагаясь и деформируясь, внешние оболочки обеспечивают высвобождение мочевины. Данные препараты мочевины используются уже довольно долго, и нашли применение при выращивании различных сельскохозяйственных продуктов (овощи, рис, цитрусовые и др.)



Страны в которых активно развивается данное направление – США, Япония, Израиль [22, 36, 39].

### **1.3 Биоразрушаемые полимеры**

Биоразрушаемые полимеры уже сейчас все чаще заменяют пластмассы, в том числе и в области сельского хозяйства. Одним из направлений в сельском хозяйстве, где могут применяться данные материалы, является создание депонированных форм сельскохозяйственных препаратов (пестицидов, удобрений) с контролируемым выходом. Включение пестицидов и других химических веществ, используемых в сельском хозяйстве, в биоразрушаемую полимерную основу, позволит снизить концентрации данных веществ в почве и продлить их эффективное действие. Биоразрушаемые полимеры имеют ряд преимуществ над синтетическими полимерами, которые плохо подвержены деструкции. Биоразрушаемые полимеры не требуют специальных мер по утилизации, они не накапливаются в окружающей среде, так как способны подвергаться деструкции при воздействии различных факторов окружающей среды. Биоразрушаемые полимеры могут иметь, как синтетическое происхождение, так и природное.

Деградация синтетических полимеров обеспечивается их способностью поглощать воду. Под действием воды данные полимеры разбухают или растворяются – происходит увеличение объёмов полимера, появляются микротрещины, вода поступает в больших объемах, полимер подвергается гидролизу и, в конечном счете, деградирует. Чем больше поглощающая способность полимера, тем активнее он подвергается деструкции. Представителями таких полимеров являются оксипроизводные монокарбоновых кислот – полилактид и полигликолид, а также их комбинации. Данные полимеры довольно быстро подвергаются деструкции, сополимеры в меньшей степени подвержены гидролизу, что увеличивает срок деградации полимера. Еще одним представителем биоразрушаемых синтетических

полимеров являются полиуретаны – большое семейство полимеров разной степени сложности, имеющих различные свойства. В зависимости от сложности и состава полимера имеют разную степень биоразрушаемости [4].

Также существует большое разнообразие биоразлагаемых полимеров природного происхождения. Данные полимеры способны подвергаться деградации под ферментативным действием микроорганизмов, в процессе своего разложения, постепенно высвобождают заключенные в них препараты. Скорость высвобождения, а, следовательно, и концентрации этих веществ можно регулировать с помощью изменения свойств биополимера [26].

Примером таких полимеров являются хитозан, альгинат, коллаген. За счет своего природного происхождения эти биополимеры могут гарантировать безопасность их использования – они не токсичны для человека и других организмов, в процессе деструкции не образуются токсичных веществ. Но основным недостатком данных полимеров является высокая стоимость их производства, и сложность варьирования скорости деградации.

И те, и другие типы полимеров применяются в медицине для изготовления различных изделий. Также на данный момент разрабатываются препараты с контролируемым выходом веществ, для продления срока действия активного вещества – препараты, депонированные в биоразрушаемые полимеры. В сельском хозяйстве также ведутся работы в этом направлении – увеличение эффективности препаратов, за счет пролонгированного периода действия [4].

Перспективным материалом для создания таких систем является лигнин. Это полимер природного происхождения, который подвергается биодеградации, как под действием ферментов микроорганизмов, так и под влиянием других факторов – химический гидролиз, фотодеградация. Лигнин может использоваться в комбинации с другими полимерами, а также подвергаться различным химическим модификациям для изменения его свойств и скорости деградации [25]. На данный момент существует большое количество исследований посвященных данной теме. К примеру, в одном из исследований

имидоклоприд – системный инсектицид, был помещен в лигнин-полиэтиленгликолевую матрицу, покрытую этилцеллюлозой. В ходе проведения эксперимента было подтверждено, что данные препараты эффективны и обеспечивают пролонгированное действие препарата. Также было установлено, что за счет изменения толщины пленки, можно варьировать время высвобождения активного вещества в широких пределах [31].

В другом исследовании имидоклоприд, циромазин и изопротурон были помещены в полимерную основу из лигнина или альгината, также были использованы сорбенты – бентонит и активированный уголь. Было отмечено, что выход активного вещества снижался при использовании препаратов с контролируемым выходом, что снизило риск попадания данных веществ в подземные воды при вымывании пестицидов из почвы [30].

Еще одним природным материалом, который может быть использован в качестве биополимерной основы, является целлюлоза. В качестве примера использования данного материала можно привести исследование эффективности атразина депонированного в этилцеллюлозу. В ходе исследования было показано, что данные препараты действительно способны обеспечивать пролонгированное действие атразина, что увеличивает его эффективность и снижает отрицательное воздействие на окружающую среду [24].

В данной работе в качестве полимерной основы для депонирования фунгицида использовался такой класс биополимеров, как полигидроксиалканоаты. К этому классу веществ относятся полимеры, получаемые из биологического материала микроорганизмов и подвергающиеся деградации под действием микрофлоры почвы, что делает их применение безопасным для окружающей среды [37].

#### **1.4 Характеристика ПГА и их применение в сельском хозяйстве.**

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это линейные полиэфиры, синтезируемые прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста.

Полигидроксиалканоаты являются резервными макромолекулами клетки, которые синтезируются при недостатке каких-либо биогенных веществ (азот, фосфор). На данный момент известно большое количество микроорганизмов способных синтезировать ПГА. ПГА накапливаются в клетке в виде гранул, число которых сильно колеблется в зависимости от условий роста микроорганизмов. Число таких гранул может составлять от 2 до 12.

Состав и свойства ПГА могут значительно варьировать в зависимости от видовой принадлежности микроорганизмов, условий роста и дальнейшей обработки, что позволяет использовать ПГА в различных областях, в том числе и в сельском хозяйстве [17].

Также ПГА способны деградировать под действием различных микроорганизмов – как бактерий, так и грибов. На данный момент известно более 600 представителей биодеструкторов ПГА, которые встречаются во всех типах экосистем – от наземных до водных. ПГА довольно быстро подвергаются разложению под действием микроорганизмов. Данная особенность, также очень важна для их применения в сельском хозяйстве. Быстрая и безопасная утилизация сельскохозяйственных отходов (тара, пленки для теплиц) поможет сократить отрицательное воздействие человека на окружающую среду [3].

Еще одна очень важная область применения ПГА в сельском хозяйстве – это создание полимерных матриц для адресной доставки и контролируемого высвобождения питательных веществ и пестицидов, необходимых для нормального роста растений [21].

Включение данных веществ в полимерную матрицу позволит снизить их расход и, в тоже время, увеличить их эффективность за счет направленного действия. За счет контролирования скорости высвобождения данных веществ можно в течение долгого времени поддерживать их необходимую для

оптимального действия концентрацию. Также это позволит снизить отрицательное действие на среду.

Контролировать скорость деградации данного полимера и, соответственно, выход из него необходимых веществ возможно с помощью варьирования его свойств, которые, как уже говорилось выше, зависят от условий синтеза, структуры полимера, комбинировании его с другими полимерами.

В данной работе были проведены исследования по эффективности фунгицида (тебуконазола), применяемого для борьбы с фузариозной болезнью (корневыми гнилями) при внесении его в различные формы из ПГА (пленки, гранулы, 3D-формы).

## **1.5 Корневые гнили**

### **1.5.1 Фузариоз**

Фузариоз зерна – заболевание, вызываемое грибами рода *Fusarium*, поражающее генеративные органы растения. К данному роду относится большое количество грибов, различающихся по биологическим признакам, но оказывающих отрицательное действие на растение.

Симптомами данного заболевания являются бурые удлиненные пятна, расплывчато переходящие в здоровую ткань. Сначала пятна появляются на листовом влагалище, у основания побегов, а затем переходят и на стебель. Пятна могут разрастаться и окольцовывать стебель, что приводит к загниванию корней. На пораженных стеблях образуется колос со щуплым зерном или без зерна. Симптомы могут отличаться в зависимости от вида гриба, вызвавшего заболевания [5].

Грибы рода *Fusarium* способны долгое время сохранять жизнеспособность и заражать большое количество семян благодаря образованию большого количества спор. Фузариевые грибы проникают в ткани

зерновки и могут локализоваться как в оболочке, так и в эндосперме. Зараженное зерно характеризуется низкой всхожестью.

Также многие виды грибов рода *Fusarium* способны продуцировать митотоксины – токсичные метаболиты, относящиеся к различным видам химических соединений. Токсины грибов данного рода довольно стойкие соединения, способные долгое время сохраняться в продуктах питания. Постоянное потребление их в пищу приводит к ухудшению здоровья, особенно у детей [14].

### **1.5.2 Альтернариоз**

Альтернариозы – заболевания растений, вызываемые фитопатогенными грибами рода *Alternaria* [7].

Грибы рода *Alternaria* (преимущественно сапрофиты или факультативные паразиты) широко распространены в природе. Альтернариозы поражают многие сельскохозяйственные культуры и проявляются в виде пятнистостей, гнилей, налетов и т. д. На злаках они вызывают черный зародыш зерна. Заболевание практически повсеместно распространено в районах с теплым и засушливым климатом. Вредоносность данного заболевания обусловлена снижением фотосинтетической поверхности листьев, плесневением плодов и семян, уменьшением урожая и загрязнением сельскохозяйственной продукции микотоксинами и аллергенами [1, 15].

### **1.5.3 Гельминтоспориоз**

Возбудителем гельминтоспориозной корневой гнили являются грибы рода *Bipolaris*. Болезнь встречается на пшенице и других злаковых культурах. Возбудители сохраняются в почве на инфицированных растительных остатках, на поверхности и внутри семян. В течение вегетационного сезона инфекция распространяется при помощи конидий воздушно-капельным путем.

Симптомами гельминтоспориоза является побурение coleoptilya на проростках и всходах, пожелтение и деформация листьев, общим угнетением растений; у взрослых растений – загнивание, побурение и почернение корней, узла кущения и приземной части стебля. На листьях образуются светло-бурые пятна, вытянутые вдоль пластинки. Растения отстают в росте, наблюдается гибель продуктивных стеблей, иногда зерна в колосе буреют, сморщиваются [9].

Все вышеперечисленные заболевания зерновых культур наносят серьезный вред сельскому хозяйству и здоровью человека. Для борьбы с этими заболеваниями используются различные фунгициды. Для борьбы с гельминтоспориозными гнилями применяются препараты, содержащие дифеноконазол (дивиденд, дивиденд стар). Фунгициды суми-8 на основе диниконазола-М и винцит (флутриафол + тиабендазол) примерно в равной степени воздействуют на фузариоз и гельминтоспориоз. Для борьбы с фузариозными гнилями применяются препараты на основе тебуконазола – раксил, бункер, тебу 60 или вещества из группы бензимидазолов (тиабендазол, беномил, карбендазим) [20].

В данной работе для борьбы с корневыми гнилями использовался препарат тебуконазол.

### **1.5 Тебуконазол**

Тебуконазол относится к группе триазолов – системных фунгицидов, ингибиторов синтеза стерина. Отличается специфичным эффектом против всех видов ржавчины зерновых культур. При опрыскивании растений защищает их от болезней в течение 3 недель. Последняя обработка разрешена за 30 дней до уборки урожая. Данный фунгицид может оказывать регуляторное действие на рост растений [13]. При обработке семян он эффективно подавляет головневые грибы, а также возбудителей корневых гнилей и плесневения

семян. Относится к третьему классу опасности для человека по ингаляционной токсичности [16].

В данном исследовании использовался препарат «Раксил Ультра» - концентрированный системный фунгицид, активное вещество – тебуконазол. Этот препарат эффективен против таких заболеваний зерновых культур, как пыльная и твердая головня, корневые и прикорневые гнили, фузариозная снежная плесень, плесневение семян и др. «Раксил Ультра» подавляет рост грибов посредством ингибирования превращения ланостерина в эргостерин. Эргостерин – это специфический стерин, который входит в состав клеточных мембран грибов. Вследствие нарушения синтеза данного вещества клетка не может поддерживать нормальную структуру мембран и организм погибает [6].

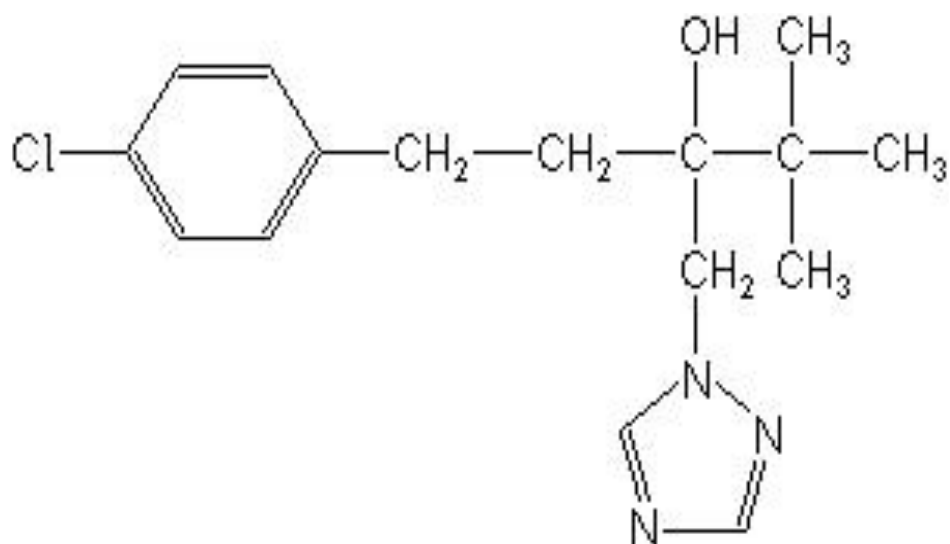


Рисунок 1 – Структурная формула тебуконазола, Мельников, 1987



## Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Общий план эксперимента

В данном исследовании изучали эффективность различных препаративных форм тебуконазола против фузариозной инфекции растений пшеницы. Эксперимент проводился в лабораторных условиях с использованием депонированного в поли(3-гидроксibuтират) [П(ЗГБ)] фунгицида – тебуконазола (ПЗГБ/ТЕБ).

Были исследованы три формы препарата: пленки, гранулы и прессованные таблетированные 3D формы. Концентрация фунгицида в препарате составляла 10, 25 или 50% от препаративной массы.

Эксперимент включал в себя 3 этапа.

**На первом этапе** была исследована эффективность депонированных форм тебуконазола в лабораторных условиях в почве, дополнительно зараженной грибами рода *Fusarium*. Для этого были сформированы почвенные микрэкосистемы – пластиковые контейнеры объемом 250 см<sup>3</sup> с полевой почвой массой 200 г (агрогеннопреобразованная полевая почва, поселок Минино, Красноярский край). Затем почва была дополнительно инфицирована суспензией спор гриба *F. moniliforme*. Для получения данной суспензии грибы выращивали в пробирках на мальт-экстракт агаре в течение 14 суток. Затем делали суспензию спор гриба в стерильной водопроводной воде, с титром  $2 \cdot 10^7$  в 1 мл. Количество спор подсчитывали в камере Горяева. В контейнеры с почвой, в которых размещали образцы инкапсулированного тебуконазола (пленки, гранулы и 3D формы), а также коммерческий препарат тебуконазола «Раксил Ультра», вносили по 10 мл суспензии спор *F. moniliforme*. Таким образом, исходная численность гриба составила  $1 \cdot 10^5$  спор в 1 г почвы.

Концентрация препарата в депонированных формах составляла 10 и 50%, в контрольной группе концентрация препарата соответствовала таковой в экспериментальных формах.

Контейнеры инкубировали при комнатной температуре (20 - 25 °С) и влажности почвы 50%.

Таким образом, эксперимент включал в себя следующие группы: в первой группе препарат ТЭБ в почву не вносили (отрицательный контроль); во второй, третьей и четвертой группах в почву вносили разработанные формы П(ЗГБ)/ТЕБ в виде пленок (вторая группа), прессованных таблетированных 3D-форм (третья группа) и гранул (четвертая группа). В пятой группе (положительный контроль) почва была обработана коммерческим препаратом «Раксил Ультра» в концентрации, сопоставимой с экспериментальными группами.

**На втором этапе** оценивалась эффективность разработанных форм ПЗГБ/ТЕБ (плёнки, гранулы) для снижения численности фитопатогенных грибов, в том числе и грибов *F. moniliforme* в ризосферной почве растений пшеницы.

**На третьем этапе** была исследована эффективность разработанных форм ПЗГБ/ТЕБ (плёнки, гранулы) против корневых гнилей пшеницы, в том числе грибов рода *Fusarium*.

Для этого, аналогично первому эксперименту, были сформированы микроэкосистемы в лабораторных условиях. В пластиковые контейнеры объемом 500 см<sup>3</sup> (площадью поверхности 54 см<sup>2</sup>) вносили полевую почву массой 500г.

Растения выращивали при комнатной температуре и естественном освещении в течение 30 суток. Пшеницу засевали из расчета 100,45 г семян на 1 м<sup>2</sup>. Концентрация препарата в экспериментальных формах составляла 25%.

Эксперименты проводились в двух вариантах: в первом была исследована эффективность данных препаратов в условиях естественного инфекционного фона почвы, во втором варианте условия эксперимента были

ужесточены – в почву были дополнительно внесены споры гриба *F. moniliforme*. (Методика подготовки суспензии спор для последующего инфицирования почвы приведена выше).

В первом варианте были исследованы следующие группы: в первой группе почву засеивали необработанной пшеницей; препарат ТЭБ не вносили; во второй группе предварительно проведено протравливание семян выдерживанием в течение 10 мин в растворе препарата Раксил Ультра; дополнительно препарат ТЭБ в почву не вносили. Две группы – экспериментальные, которые были засеяны необработанной пшеницей, в почву вносили разработанные формы П(ЗГБ)/ТЕБ в виде пленок (третья группа) и гранул (четвертая группа). В пятой группе (контрольная) одновременно с посевом почва была обработана коммерческим препаратом «Раксил Ультра» в концентрации, сопоставимой с экспериментальными группами из расчета 3 мкг ТЭБ /г почвы (или 2,78 мг/1 г семян пшеницы).

Второй вариант включал четыре группы: в первой группе почву засеивали необработанной пшеницей; препарат ТЭБ не вносили; во второй и третьей группах почва была засеяна необработанной пшеницей, и в почву вносили разработанные формы П(ЗГБ)/ТЕБ в виде пленок (вторая группа) и гранулы (третья группа). В четвертой группе (контрольная) одновременно с посевом почва была обработана коммерческим препаратом «Раксил Ультра» в концентрации, сопоставимой с экспериментальными группами из расчета 3 мкг ТЭБ/г почвы (или 2,78 мг/1 г семян пшеницы).

## **2.2 Учет микромицетов в почве**

Для анализа почвенной микрофлоры на наличие микромицетов были использованы общепринятые методы почвенной микробиологии (Нетрусов и др, 2005). Общую численность микромицетов и численность грибов рода *Fusarium* определяли на агаре Сабуро, мальт-экстракт агаре, микологическом агаре с бенгальским розовым с добавлением хлорамфеникола (100 мкг/1 л

среды) для подавления роста бактерий. Посев производили из почвенной суспензии в трёх повторностях, используя разведения  $10^2$  -  $10^4$ . Чашки инкубировали в термостате при температуре 25 °С, учет колоний производили на 7 – 10 сутки.

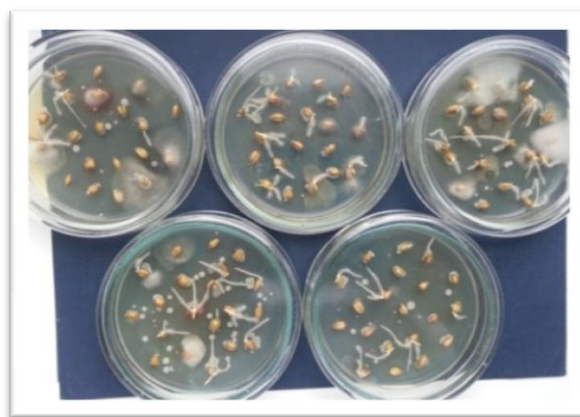
Идентификацию микромицетов осуществляли на основе культурально-морфологических признаков [19], [40]. Для микроскопического анализа был использован микроскоп AxioStar (CarlZeiss).

Определение численности грибов *F. moniliforme* в почве (первый этап эксперимента) проводили в динамике через 3, 7, 14, 28, 42 и 56 суток, высевая почвенную суспензию в чашки Петри на мальт-экстракт агар и микологический агар с бенгальским розовым и хлорамфениколом для подавления роста бактерий.

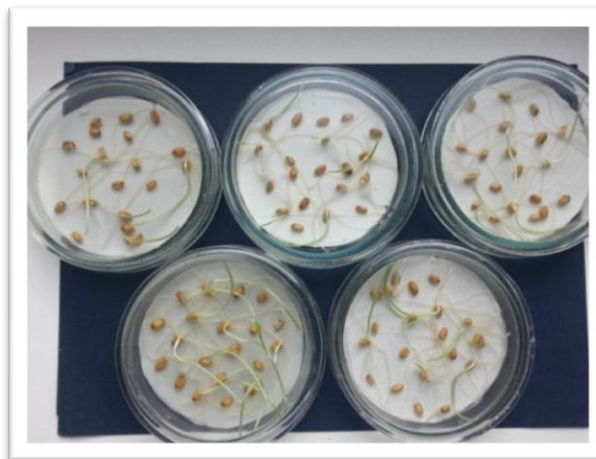
Для учета общей численности микромицетов в ризосферной почве растений пшеницы, а также для учета фитопатогенных представителей, в том числе и гриба *F. moniliforme* (второй этап эксперимента) использовался агар Сабуро.

### **2.3 Фитосанитарный анализ семян**

Перед началом эксперимента по определению эффективности П(ЗГБ)/ТЕБ форм в борьбе против фузариоза был произведен анализ семян пшеницы на их зараженность корневыми гнилями, в том числе и фузариозом. Для этого был использован биологический метод выявления внешней и внутренней зараженности семян болезнями, а именно анализ семян на питательной среде. Также была определена их энергия прорастания и всхожесть (Рисунок 2), [8].



А



Б

Рисунок 2 - Фитосанитарный анализ семян: А – определение зараженности семян корневыми гнилями, Б – определение всхожести семян

Количество грибов определяли на питательной среде Сабуро-агар. Из пробы семян отбирали по пять рабочих проб по 20 семян в каждой, и помещали их в стерильную посуду с питательной средой. Предварительно семена промывали струей воды под водопроводным краном и дезинфицировали 96%-ным спиртом в течение 1-2 мин. Затем семена промывали в стерильной воде и просушивали между листами стерильной фильтровальной бумаги. Семена помещали в чашки Петри по 10-25 шт., в зависимости от их размеров, и ставили их для проращивания в термостат при температуре 22-25°C. Учет результатов производили на 7-е сутки.

Энергию прорастания и всхожесть определяли с помощью анализа семян во влажной камере (Рисунок 2). Из пробы семян отбирали 5 проб по 20 семян в каждой.

Для проращивания семян во влажной камере применяли стерильные сухие чашки Петри. На дно чашек помещали фильтровальную бумагу в два слоя.

Фильтровальную бумагу в чашках Петри увлажняли. Увлажнение считается нормальным, если при наклоне чашки с фильтровальной бумаги стекает несколько капель воды.

Семена раскладывали на ложе с помощью пинцета на расстоянии 1-2 см друг от друга в зависимости от их крупности.

Закрытые чашки Петри с заложенными в них семенами культивировали при комнатной температуре. Учет результатов проводился на 3-и сутки – энергия прорастания, и на 7-е – всхожесть семян.

#### **2.4 Методы анализа зараженности пшеницы корневыми гнилями**

Анализ корней производили с периодичностью раз в 10 суток после закладки эксперимента.

Для количественного определения зараженности корней пшеницы также использовали культивирование во влажных камерах (Рисунок 3).



Рисунок 3 - Анализ корней пшеницы на зараженность корневыми гнилями

В стерильные чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу раскладывали корни пшеницы. На одну чашку по 2-3 корня. Предварительно корни промывали водопроводной водой, затем – стерильной. Закрытые чашки Петри помещали в термостат (температура 22-25 °С). Учет результатов производили на 3-10-е сутки. Зараженность корней грибами *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris* анализировали, микроскопируя проросший мицелий и спороношение грибов (Рисунок 4).

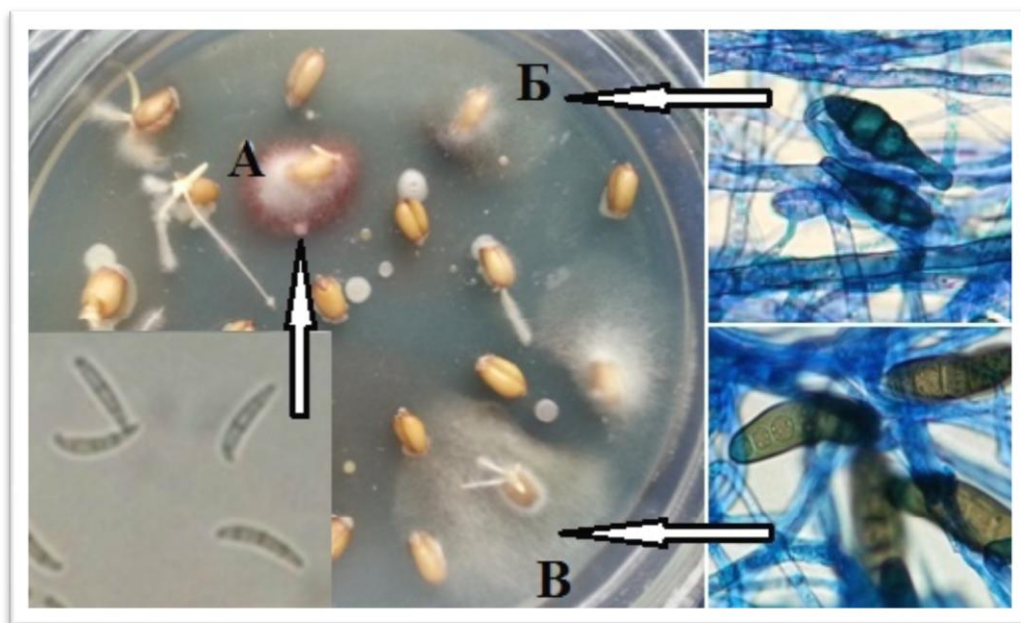


Рисунок 4 - Фитосанитарный анализ семян. Внешний вид колоний и вид под микроскопом: А – *Fusarium*, Б – *Alternaria*, В – *Bipolaris*

Идентификацию почвенных микромицетов проводили по микро- и макроморфологическим признакам (структуре и цвету колоний, строению мицелия и органов спороношения) которые являются объективными показателями, позволяющими определить систематическую принадлежность этих микроорганизмов [19], [40].

### Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе эксперимента по определению эффективности П(ЗГБ)/ТЕБ форм против грибов *F. moniliforme* в почве были получены следующие результаты.

[изъята 1 страница]

На протяжении всего эксперимента численность *F. moniliforme* постепенно снижалась при использовании всех экспериментальных форм. К концу эксперимента эффективность депонированных форм препарата (плёнки и гранулы) сравнивалась с эффективностью препарата в свободной форме – численность грибов составила 2 – 5 тыс. КОЕ/г почвы. Эффективность 3D-форм была ниже – численность грибов была в районе 7 тыс. КОЕ/г почвы.

Низкая эффективность 3D-форм связана с более плотной структурой изделия, что отражается на скорости деградации П(ЗГБ), из-за чего скорость выхода ТЕБ из препарата также снижается. Это отразилось и на разности в эффективности препаратов с разным содержанием ТЕБ – препарат с более низкой концентрацией на начальном этапе эксперимента действовал менее эффективно, тогда как при использовании других форм препарата ТЕБ заметных отличий между образцами с разной концентрацией выявлено не было.

На основе этих данных можно сделать вывод, что все П(ЗГБ)/ТЕБ формы обеспечивают пролонгированное действие фунгицида на патоген, но наиболее эффективной формой является гранулированный препарат.

В ходе фитосанитарного анализа семян были получены следующие результаты: всхожесть и энергия прорастания семян составили  $92 \pm 9$  % от общего количества семян. Полученные значения свидетельствуют о высокой всхожести посевного материала. Общая зараженность семян составила  $40 \pm 14$  % , а зараженность семян грибом *Fusarium* –  $11 \pm 3$  % (Рисунок 6). Другие представители патогенных грибов, обнаруженные в семенах пшеницы - грибы



рода *Alternaria* и *Bipolaris* – распространенные возбудители корневых гнилей пшеницы.

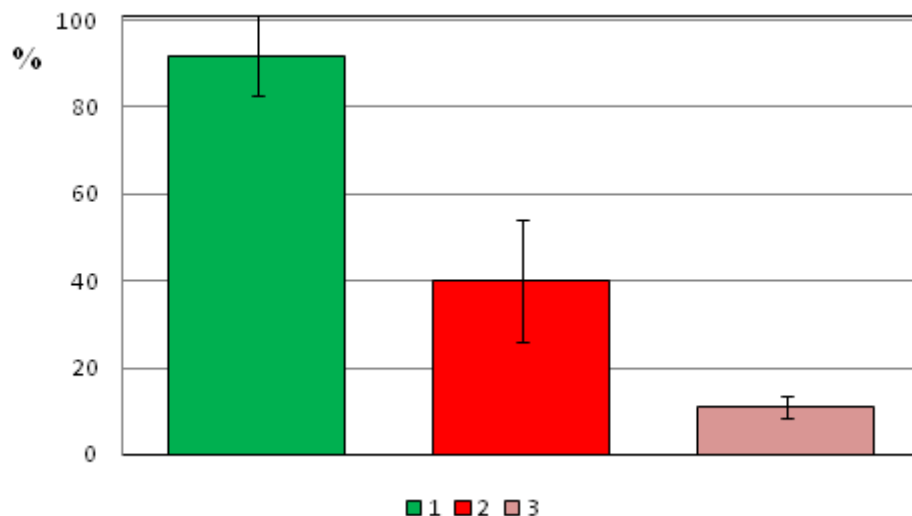


Рисунок 6 - Фитосанитарный анализ семян: 1- всхожесть семян; 2 – общая инфицированность корневыми гнилями; 3- инфицированность семян фузариозом

Полученные данные позволяют говорить о том, что высокая численность патогенных грибов не оказывает существенного влияния на всхожесть семян пшеницы в данном опыте. Также можно отметить малый вклад грибов рода *Fusarium* в общую зараженность корневыми гнилями семян пшеницы.

[изъята 1 страница]

В случае дополнительного инфицирования почвы фитопатогенами фунгицидное действие депонированных препаратов более выражено.

Общая инфицированность корневыми гнилями в образцах без добавления фунгицида была выше, чем в образцах, подвергавшихся обработке тебуконазолом, но зараженность грибом *Fusarium* не имела значимых различий с другими образцами в первые 10 суток эксперимента.

[изъято 5 страниц]

При сравнении результатов различных этапов эксперимента было замечено, что эффективность депонированных форм отличается: в эксперименте без растений эффективность данных форм не превышала значений препарата в свободной форме, тогда как при выращивании растений было видно, что депонированные формы препарата более эффективны. Это может быть связано с различиями в составе почвенной микрофлоры. Растения способны влиять на её состав. По-видимому, в ризосферной микрофлоре пшеницы находится большее количество микроорганизмов-деструкторов полимера, что обеспечивает более активный выход фунгицида.

Также было отмечено, что эффективность депонированных форм выше в условиях высокой численности патогенов – дополнительная инфицированность грибами *F. moniliforme*. Это можно объяснить конкуренцией грибов *F. moniliforme* с аборигенной микрофлорой почвы. Численность данных грибов сократилась под влиянием постоянных обитателей данного типа почвы. При этом, ни в отрицательном, ни в положительном контроле не происходило резкого снижения численности данных фитопатогенов. Это можно объяснить тем, что основа для депонирования из П(ЗГБ) может использоваться почвенной микрофлорой в качестве субстрата [11]. Как уже было сказано выше, при использовании данных форм препарата наблюдался рост численности сапротрофных грибов – представителей аборигенной микрофлоры почвы.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе данной работы было установлено:

1. Депонированные формы тебуконазола подавляли развитие гриба *Fusarium moniliforme* в почве, не уступая по эффективности коммерческому препарату Раксил Ультра; наиболее эффективными формами были гранулы и пленки.
2. Эффективность подавления фузариоза в ризосфере пшеницы препаратами тебуконазола, депонированного в ПГБ, лучше проявляется в

условиях высокой инфекционной нагрузки почвы фитопатогенами рода *Fusarium*, тогда как при низком инфекционном фоне действие тебуконазола в виде депонированных форм сопоставимо с действием коммерческого препарата Раксил Ультра. Численность сапротрофных грибов при использовании депонированных форм препарата увеличивается, что свидетельствует о положительном действии ПЗГБ и отсутствии токсического эффекта со стороны депонированного ТЕБ.

3. Депонированные формы тебуконазола обеспечивали долговременную защиту корневой системы пшеницы от заражения фитопатогенами на протяжении всего эксперимента. Инфицированность корневой системы пшеницы грибами рода *Fusarium* через 30 суток эксперимента была в 3,2 раза ниже, чем в контроле.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1 Аубакирова Д.С., Ремеле В.В. Фитотоксичность грибов рода *Alternaria* [Электронный ресурс]. // Сельское, лесное и водное хозяйство. 2013. № 12  
Режим доступа: <http://agro.snauka.ru/2013/12/1276> (дата обращения: 30.04.2017).

2 Березненко Н. М., Лепешкина М. И. Перспективы использования пестицидных формуляций с контролируемым высвобождением действующего вещества //SWorld: сб. науч. ст. – Иваново: Научный мир, 2015. - 2 (39). Том 18. – С. 56-69.

3 Волова Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2015. – 8 (2). – С. 131-151.

4 Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2014. – 7 (2). – С. 103-133 .

5 Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П. Фузариоз зерновых культур //Защита и карантин растений. – 2009. – №. 12. – С. 13-15.

6 Галлямова О. В. Действующие вещества фунгицидов. Тебуконазол [Электронный ресурс]: Пестициды.ру. Сельскохозяйственный он-лайн справочник [сайт] – Москва, 2014. – Режим доступа: <http://www.pesticidy.ru> (дата обращения: 23.05.2017).

7 Ганнибал Ф. Б., Орина А. С., Левитин М. М. Альтернариозы сельскохозяйственных культур на территории России //Защита и карантин растений. – 2010. – №. 5. – С. 31-32.

8 ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. Дата издания: 01.01.2004. Дата последнего изменения: 19.07.2010

9 Дорофеева Л. Л., Шкаликов В. А. Болезни зерновых культур //М.: Печатный город. – 2007 – 96 с.

10 Киселев Е. Г., Барановский С. В. Кинетика выхода препаратов фунгицидного и гербицидного действия из пролонгированных форм, полученных из разрушаемого поли-3-гидроксibuтирата // Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2016. – 9 (2). – С. 233-240.

11 Косогова А. А. Микрофлора почвы при использовании систем контролируемой доставки удобрений: дис. – Сибирский федеральный университет, 2016.

12 Круглов Ю. В. Микрофлора почвы и пестициды. – М.: Агропромиздат – 1991 - 28 с.

13 Мельников Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение //М.: Химия. – 1987. – 712 с.

14 Мехдиев И. Т. Фузариозная болезнь и способ ведения предупредительных мероприятий против неё //Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков. – 2013. – №. 4. – С.99-104.

15 Николаева С. И., Николаев А. Н., Шубина В. Е., Волощук Л. Ф. Влияние состава питательной среды на рост грибов рода *Alternaria* //В: Studia Universitatis. Seria Ştiinţe reale şi ale naturii. – 2011. – №. 1(41). – С.117-123.

16 Попов С. Я., Дорожкина Л. А., Калинин В. А. Основы химической защиты растений // Под ред. профессора С. Я. Попова - М.: Арт-Лион. – 2003. – 208 с.

17 Прудникова С. В., Волова Т. Г. Экологическая роль полигидроксиалканоатов–аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами //Красноярск: Красноярский писатель. – 2012 - 184 с.

18 Прудникова С. В., Цыремпилов В.Ц. Долговременные системы доставки удобрений на основе полигидроксиалканоатов. Журнал Сибирского федерального университета. Серия Биология. – 2012. – 5 (3). – С. 322-328

19 Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов //М.: Мир. – 2001 – 486 с.

20 Хадеев Т. Г., Говоров, Д. Н., Гинятуллин А. Г., Живых, А. В. Здоровые семена-основа высокого урожая //Защита и карантин растений. – 2010. – №. 3. – С. 22-24.

21 Цыремпилов В. Ц. Конструирование новых форм доставки удобрений //Молодёжь и наука: Сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, посвященной. – 2012.

22 Azeem, B., KuShaari, K., Man, Z. B., Basit, A., Thanh, T. H. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer //Journal of Controlled Release. – 2014. – Т. 181. – С. 11-21.

23 Bending G. D., Rodriguez-Cruz M. S., Lincoln S. D. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories //Chemosphere. – 2007. – Т. 69. – №. 1. – С. 82-88.

24 M. Cea, P. Cartes, G. Palma, M.L. Mora. Atrazine efficiency in an andisol as affected by clays and nanoclays in ethylcellulose controlled release formulations //Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal. – 2010. – Т. 10. – №. 1. – С. 62-77.

25 Chowdhury M. A. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin-based biopolymer matrices //International journal of biological macromolecules. – 2014. – Т. 65. – С. 136-147.

26 Francesco Puoci, Francesca Iemma, Umile Gianfranco Spizzirri, Giuseppe Cirillo, Manuela Curcio, NevioPicci. Polymer in agriculture: a review. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. - 2008. - Т. 3. - № 1. – С. 299-314.

27 Cycoń M., Piotrowska-Seget, Z., Kaczyńska, A., Kozdrój, J. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and  $\lambda$ -cyhalothrin under laboratory conditions //Ecotoxicology. – 2006. – Т. 15. – №. 8. – С. 639-646.

28 Dave A. M., Mehta, M. H., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Soppimath, K. S. A review on controlled release of nitrogen fertilizers through polymeric

membrane devices // Polymer-Plastics Technology and Engineering. – 1999. – T. 38. – №. 4. – C. 675-711.

29 Dubey S., Jhelum V., Patanjali P. K. Controlled release agrochemicals formulations: a review // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2011. – C.105-112.

30 Fernández-Pérez M., Garrido-Herrera F. J., González-Pradas E. Alginate and lignin-based formulations to control pesticides leaching in a calcareous soil //Journal of hazardous materials. – 2011. – T. 190. – №. 1. – C. 794-801.

31 Flores-Céspedes F., Figueredo-Flores, C. I., Daza-Fernández, I., Vidal-Peña, F., Villafranca-Sánchez, M., Fernández-Pérez, M. Preparation and characterization of imidacloprid lignin–polyethylene glycol matrices coated with ethylcellulose //Journal of agricultural and food chemistry. – 2012. – T. 60. – №. 4. – C. 1042-1051.

32 Komárek M., Čadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., Bollinger, J. C. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects //Environment international. – 2010. – T. 36. – №. 1. – C. 138-151.

33 Helal N. A. S. Nanotechnology in Agriculture: A Review //Poljoprivreda i Sumarstvo. – 2013. – T. 59. – №. 1. – C. 117-142.

34 Pérez-de-Luque A., Rubiales D. Nanotechnology for parasitic plant control //Pest management science. – 2009. – T. 65. – №. 5. – C. 540-545.

35 Roy A., Singh, S. K., Bajpai, J., & Bajpai, A. K. Controlled pesticide release from biodegradable polymers //Central European Journal of Chemistry. – 2014. – T. 12. – №. 4. – C. 453-469.

36 Shaviv A. Advances in controlled-release fertilizers //Advances in agronomy. – 2001. – T. 71. – C. 1-49.

37 Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biologicac polyesters//Progress in polymer science. – 2000. T.25. - .№10. – C. 1503-1555.

38 Sopeña F., Maqueda C., Morillo E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation //Ciencia e investigación agraria. – 2009. – T. 36. – №. 1. – C. 27-42.

39 Trenkel M. E. Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. – Paris : International fertilizer industry association, 1997. – T. 11.

40 Watanabe T. Pictorial atlas of soil fungi: morphologies of fungi and key species. – CRC Press, 2002. – 486 p.