

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Получение долговременных форм пестицидов в виде гранул и
таблетированных форм на основе поли-3-гидроксibuтирата

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Фундаментальная и прикладная биология

Научный
руководитель

подпись

к.б.н., доцент

должность, учёная степень

А.А. Шумилова.

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись

Е.А. Лавицкая

инициалы, фамилия

Рецензент

подпись

зав. НИЛСиЭБ, к.б.н.

должность, учёная степень

С.В. Овсянкина

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Получение долговременных форм пестицидов в виде гранул и таблетированных форм на основе поли-3-гидроксibuтирата» содержит 51 страницу текстового документа, 14 иллюстраций, 2 таблицы, 54 использованных источников.

ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТ (ПЗГБ), СМЕСИ, ГРАНУЛЫ, 3D ФОРМЫ, МЕТРИБУЗИН, ЭПОКСИКОНАЗОЛ, ДОЛГОВРЕМЕННЫЙ ВЫХОД, ГЕРБИЦИДНАЯ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ

Цель диссертационной работы: получить и исследовать эффективность действия пролонгированных препаратов гербицидного и фунгицидного действия на основе П(ЗГБ) и природных материалов.

Задачи исследования:

1. Получить долговременные формы пестицидов в виде 3D форм и гранул на основе П(ЗГБ) и природных наполнителей с метрибузином и эпоксиконазолом;
2. Исследовать физико-химические характеристики и свойства поверхности 3D форм и гранул на основе П(ЗГБ) и природных наполнителей с метрибузином и эпоксиконазолом;
3. Исследовать выход метрибузина и эпоксиконазола из полученных форм (таблеток и гранул) *in vitro*, в том числе с использованием дренажной системы;
4. Оценить фунгицидную активность 3D форм и гранул с различными наполнителями и эпоксиконазолом в отношении патогенного гриба *Fusarium verticillioides*;
5. Исследовать гербицидный и фунгицидный эффект гранул с метрибузином и эпоксиконазолом в посевах пшеницы, зараженной возбудителями корневой гнили и сорными растениями.

Актуальность диссертационной работы заключается в создании биоразрушаемых долговременных форм гербицидного и фунгицидного действия, эффективных в отношении сорных растений и патогенных микроорганизмов.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Влияние пестицидов на окружающую среду, проблемы их использования.....	7
1.2. Формы применения пестицидов	9
1.3. Материалы используемые в качестве основы для депонирования пестицидов.....	11
1.3.1. Синтетические полимеры.....	11
1.3.3. Природные полимеры.....	12
1.3.4. Полигидроксиалканоаты (ПГА): характеристика, синтез, классификация	13
1.3.5 Применение ПГА в сельском хозяйстве.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
2.1. Материалы исследования	17
2.2. Методы исследования.....	18
2.2.1. Получение смесей: полимера, наполнителя и пестицида.....	18
2.2.2. Получение таблетированных форм и гранул.....	18
2.2.3. Исследование свойств полученных 3D форм и гранул.....	19
2.2.4. Исследование выхода гербицидного и фунгицидного препаратов из полученных форм in vitro.....	20
2.2.5. Исследование фунгицидной активности полученных форм in vitro	21
2.2.6. Исследование фунгицидной активности в посевах пшеницы зараженных корневой гнилью.....	21

2.2.7. Исследование гербицидной активности полученных гранул с опилками и метрибузином в лабораторных экосистемах с высшими растениями	23
2.3. Статистический анализ данных	24
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА 3D ФОРМ И ГРАНУЛ ГЕРБИЦИДНОГО И ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ	25
3.1. Свойства поверхности и физико-химические характеристики полученных форм	25
3.2. Выход метрибузина и эпоксиконазола из полученных форм <i>in vitro</i> ..	29
3.3. Исследование фунгицидной активности 3D форм и гранул <i>in vitro</i> ...	33
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕРБИЦИДНОГО И ФУНГИЦИДНОГО ЭФФЕКТА ПОЛУЧЕННЫХ ФОРМ В ЛАБОРАТОРНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ С ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ.....	35
4.1. Исследование фунгицидного действия полученных форм в посевах пшеницы, зараженных возбудителями корневой гнили	35
4.2. Исследование гербицидного действия полученных форм в посевах пшеницы с сорными растениями.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	45

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивные технологии ведения сельского хозяйства требуют применения огромного количества разнообразных химических веществ для борьбы с вредителями, сорняками и возбудителями болезней культивируемых видов. Актуальным направлением исследований является разработка и применение в сельском хозяйстве препаратов нового поколения с контролируемым выходом активного начала за счет использования для их депонирования биоразрушаемых материалов, в том числе полимеров. Микробные полигидроксиалканоаты – полиэфиры гидроксикарбоновых кислот с задаваемым сроком биodeградации являются перспективной основой для создания систем доставки пестицидов и не смотря на высокую стоимость в композиции с доступными природными материалами (торф, опилки и глина) могут стать прорывным направлением в области создания сельскохозяйственных препаратов.

В работе получены долговременные формы пестицидов (метрибузина и эпоксиконазола) на основе поли-3-гидроксибутирата в виде 3D форм и гранул с различными природными наполнителями (торф, опилки и глина). С помощью современных методов исследования (ДТА, СЭМ, ИК) доказано влияние наполнителей на характеристики самого полимера.

Исследованы выходы выбранных препаратов (метрибузина и эпоксиконазола) в воду в зависимости от формы и наполнителей. В лабораторных экспериментах доказан фунгицидный эффект разработанных форм против патогенного гриба *Fusarium verticillioides* в том числе в посевах пшеницах, зараженных возбудителями корневой гнили. Гербицидная активность гранул с метрибузином на основе ПЗГБ и опилок, доказана в эксперименте с яровой пшеницей засоренной Горчицей полевой, результаты эффективности подтверждены значениями гибели сорняков и показателями сухой биомассы растения (пшеница Новосибирская 15).

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Влияние пестицидов на окружающую среду, проблемы их использования

Сельское хозяйство — одна из основных отраслей экономики, которая является важным источником обеспечения населения продовольствием, а перерабатывающей промышленности — сырьём, а также мощным фактором воздействия на окружающую среду. По уровню антропогенной нагрузки данная отрасль, по оценкам учёных, находится среди лидеров.

Развитие сельского хозяйства в настоящее время невозможно представить без использования пестицидов. Для получения высоких урожаев культурных растений применяются различные химикаты, которые позволяют защитить растения от вредителей (насекомых, сорных растений и фитопатогенных грибов), а также обеспечить необходимыми питательными веществами (азот, фосфор и др.). Но, применение пестицидов имеет и свои недостатки [17].

Пестициды влияют не только на окружающую среду и экосистемы, приводя к сокращению биоразнообразия, особенно вследствие уничтожения сорняков и насекомых, которые являются важными элементами пищевой цепи. Кроме того, пестициды оказывают отрицательное воздействие на здоровье человека, как в результате прямого действия, так и опосредованно вследствие накопления остаточных количеств в сельскохозяйственных продуктах и питьевой воде. Кроме целевого назначения, пестициды оказывают также негативное влияние на биосферу, масштаб которого сравнивают с глобальными экологическими факторами. На национальном и международном уровнях изучаются методы, которые позволяют сокращать потребность в пестицидах, например, органическое земледелие, биологические методы защиты растений. Применение пестицидов может привести к таким негативным последствиям как уменьшение биологической продуктивности, нарушение функционирования грунтовых

микробиоценозов, накопление остатков пестицидов и их производных в поверхностных водных источниках и грунтовых водах, препятствие восстановлению плодородия, уменьшение пищевой ценности сельскохозяйственной продукции и тому подобное. Пестициды оказывают значительное влияние на исчезновение видов, опыляющих растения, в том числе через механизм расстройств колонии пчёл: рабочие пчелы внезапно исчезают из улья. Применение пестицидов к культурам в период цветения может привести к гибели пчёл, опыляющих растения. Пестициды наносят вред многим видам животных, что приводит к тому, что всё больше стран начинают регулировать использование пестицидов посредством разработки и внедрения планов действий по биоразнообразию. Животные могут быть отравлены остатками пестицидов, которые остаются на пище.

В результате действия пестицидов некоторые основные источники пищи диких животных могут стать недоступными, в результате чего животные перемещаются, меняют свой рацион или голодают. Остатки пестицидов могут перемещаться по пищевой цепи; например, птицам может быть нанесен вред при поедании насекомых и червей, которые потребляют пестициды. Дождевые черви переваривают органическое вещество и увеличивают содержание питательных веществ в верхнем слое почвы. Они служат биоиндикаторами активности почвы. Пестициды оказывают вредное воздействие на рост и размножение дождевых червей. Некоторые пестициды могут биоаккумулироваться или накапливаться до токсических уровней в организме видов, которые потребляют их, с течением времени. От загрязнений воды пестицидами также страдают рыбы и другая водная биота. Поверхностный сток пестицидов в реках и ручьях может быть смертельно опасен для водной жизни, иногда приводя к гибели всех рыб в определенном потоке [17]. Применение гербицидов к водоемам может привести к гибели рыбы, когда мертвые растения распадаются и потребляют кислород из воды, в результате

чего рыбы задыхаются от его недостатка и погибают. Гербициды, такие как сульфит меди, токсичны для рыб и других водных животных в концентрациях, подобных тем, которые используются для уничтожения растений. Повторное воздействие сублетальных доз некоторых пестицидов может привести к физиологическим и поведенческим изменениям, которые уменьшают популяции рыб (например, отказ от гнезд и выводков, снижение иммунитета к заболеваниям, снижение способности уклоняться от хищников). Пестициды могут накапливаться в водоемах до уровней, которые уничтожают зоопланктон — основной источник пищи молодых рыб [16].

Для снижения темпов загрязнения окружающей среды пестицидами предлагается использовать препараты, позволяющие осуществлять их адресную доставку. Такие препараты обладают пролонгированным эффектом, что повышает их эффективность, а также позволяют снизить количество, используемых пестицидов [10].

1.2. Формы применения пестицидов

Успешное применение пестицидов для борьбы с различными вредными организмами в большой степени зависит от формы препарата и условий, при которых химическое соединение (действующее вещество) приводится в соприкосновение с вредителями и возбудителями заболеваний растений, а также с сорными и полезными растениями.

Большое значение форма препарата имеет и для его безопасного для объектов окружающей среды использования.

Различный характер химических соединений, используемых в качестве пестицидов, и многообразие объектов их применения вызывают необходимость создания большого числа форм применения. В зависимости от физико-химических свойств препарата, его назначения и способа использования выбирается наиболее

эффективная и экономичная в данных конкретных условиях форма его применения. На выбор формы применения большое влияние оказывает также токсичность препарата. Форма применения должна обеспечивать не только наиболее эффективное, но и наиболее безопасное использование препарата [10].

К настоящему времени практически используют следующие наиболее распространенные формы применения пестицидов: 1) порошки (дусты) — для опыливания или опудривания; 2) микрокапсулированные препараты — для внесения в почву или для обработки растений. В данных препаратах пестицид покрыт тонкой оболочкой какого-либо полимера, который, растворяясь в почвенном растворе, постепенно выделяет; 3) пестицидгранулированные препараты (г.) — для обработки растений и внесения в почву. В зависимости от назначения и способа применения размер гранул может колебаться от долей миллиметра до нескольких миллиметров; 4) смачивающиеся порошки, используемые в виде водной суспензии; 5) растворы в воде и в органических растворителях. Используются для опрыскивания растений и внесения в почву различными методами; 6) приманки с пищевыми наполнителями, чаще всего используемые для борьбы с грызунами; 7) аэрозоли и фумиганты; 8) пенообразующие препараты; 9) концентраты эмульсии, при разбавлении водой образующие эмульсии для опрыскивания; 10) мази и мастики для обмазки растений; 11) водорастворимые гранулы (в. р. г.) — растворимые в воде гранулированные пестициды, аналогично растворимым в воде кристаллическим продуктам; 12) вододиспергируемые гранулы (в. д. г.) — гранулированные пестициды, которые с водой образуют водную суспензию; 13) суспензионный концентрат (с. к.) — представляет собой концентрированную суспензию пестицида в воде или в органическом растворителе; 14) суспензия — текучая гетерогенная система, состоящая из твердых и жидких действующих веществ,

образующих с водой суспензию и эмульсию. Используется для приготовления смесевых препаратов (до 4-х д. в.).

Однако наиболее важной тенденцией последних лет является увеличение количества рецептур с контролируемым высвобождением действующего вещества. [2].

1.3. Материалы используемые в качестве основы для депонирования пестицидов

Среди биodeградируемых материалов в качестве матрицы (основы) для создания долговременных форм пестицидов используют различные материалы: синтетические полимеры, природные полимеры и микробные полигидроксиалканоаты

1.3.1. Синтетические полимеры

Синтетические полимеры разлагаются в окружающей среде за счет своей способности поглощать воду. Данные полимеры под действием воды разбухают и растворяются, за счет поглощения воды они увеличиваются в объеме, что приводит к образованию микротрещин. Через микротрещины вода поступает еще в больших объемах, что приводит к гидролизу полимера и к его деградации. Чем больше поглощающая способность полимера, тем выше скорость его деструкции. Примерами таких полимеров являются оксипроизводные монокарбоновых кислот, такие как полилактид, полигликолид и их комбинации. Данные полимеры хорошо подвергаются деструкции, сополимеры подвержены гидролизу, что увеличивает сроки их деструкции [4].

Еще одним примером синтетических биоразрушаемых полимеров являются полиуретаны. Полиуретаны – это большое семейство полимеров, имеющих различное строение и степень сложности, что также отражается на разнообразии их свойств и, как следствие на способности к биоразрушаемости. Примером

использования данной группы полимеров в качестве основы для депонирования является эксперимент по включению инсектицидного препарата в основу из полиуретана. В данном эксперименте была получена наноэмульсия, которая обеспечивала пролонгированный инсектицидный эффект и дольше сохранялась на листьях после обработки по сравнению с коммерческими препаратами [36].

1.3.3. Природные полимеры

Биоразлагаемые полимеры природного происхождения также широко используются для конструирования систем адресной доставки и контролируемого высвобождения пестицидов. Данные полимеры разлагаются в окружающей среде под воздействием ферментов микроорганизмов. Благодаря своему природному происхождению такие полимеры не загрязняют окружающую среду продуктами своего распада, они утилизируются почвенными микроорганизмами и разлагаются углекислого газа и воды благодаря включению в метаболические пути микроорганизмов.

Скорость высвобождения активного вещества возможно регулировать благодаря варибельности свойств полимеров, а также за счет применения различных техник изготовления, препаративных форм и комбинаций полимеров [35].

Для создания агропрепаратов наиболее широко используются такие биополимеры как хитозан, альгинат, лигнин и целлюлоза [31]. Но данные полимеры имеют и недостатки, одним из основных является стоимость производства данных полимеров, также стоит отметить, что довольно сложно варьировать скорость деградации данных полимеров.

Лигнин является одним из материалов, которые широко используются для создания препаратов с контролируемым выходом вещества. Лигнин часто

используется в комбинации с другими полимерами, что позволяет регулировать скорость деградации препаратов и выход активного вещества [43].

Еще один полимер, который может использоваться для создания агропрепаратов с контролируемым выходом – хитозан [44, 49].

Фунгицидный препарат (гексоконазол), полученный на основе хитозана и триполифосфата, обеспечивал замедленный выход активного вещества из полимерной основы. Данный препарат доказал свою эффективность в эксперименте *in vitro* в почве. Также была оценена его цитотоксичность, которая оказалась ниже, чем у препарата в свободной форме [48].

В качестве биополимерной основы для депонирования пестицидов может быть использована целлюлоза. Примером такого использования целлюлозы является исследование эффективности гербицида атразина депонированного в этилцеллюлозу. В ходе этого исследования было показано, что такие препараты оказывают пролонгированное действие в борьбе сорными растениями, что позволяет сократить использование пестицидов и тем самым снизить нагрузку на окружающую среду [41].

1.3.4. Полигидроксиалканоаты (ПГА): характеристика, синтез, классификация

В настоящее время перспективными разрушаемыми биопластиками являются полиэфиры алкановых кислот, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА) - термопластичные разрушаемые линейные полиэфиры микробиологического происхождения.

Преимущества ПГА:

- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO₂ и H₂, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные

отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;

- ПГА - это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной С-цепи от С4 до С12 и выше, от высококристаллических термопластов до резиноподобных эластомеров;

- ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальным путями; более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

- свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру.

Биотехнологический процесс получения полимеров этого класса заключается в культивировании штамма-продуцента в жидкой питательной среде при постоянной аэрации стерильным воздухом и перемешивании в специфическом режиме при избытке углеродного субстрата в среде и несбалансированном росте, когда процесс синтеза основных (азотсодержащих) клеточных макромолекул ограничен каким-либо компонентом субстрата.

В качестве продуцента используются штаммы бактерий различных таксономических групп, характеризующиеся способностью синтезировать полимеры различной химической структуры и позволяющие использовать разнообразные субстраты. Важным технологическим свойством данного продуцента является возможность замены ростового субстрата без существенной замены технологического процесса и оборудования [6].

В качестве ростового субстрата могут использоваться: органические кислоты, газовые смеси $H_2 + CO_2 + O_2$, кристаллические сахара, гидролизаты растительных биомасс (источником водорода может быть электролиз воды, при

этом одновременно процесс обеспечивается кислородом, а источником углерода служит экспанзерная углекислота биохимических производств [7].

Исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры, полигидроксиалканоаты подразделяют на три основные группы: 1) короткоцепочечные (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3 до 5 углеродных атомов; 2) среднецепочечные (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода; 3) длинноцепочечные (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C17 и C18.

1.3.5 Применение ПГА в сельском хозяйстве

Как уже говорилось выше 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 [37].

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 и структуры полимера.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В качестве материала исследования и основы для получения долговременных полимерных форм гербицидов и фунгицидов использован гомополимер гидроксимасляной кислоты — поли-3-гидроксibuтират П(ЗГБ). Полимер синтезирован штаммом-продуцентом *Cupriavidus eutrophus* B10646 в периодическом двухстадийном режиме при несбалансированном росте и предоставлен сотрудниками Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ. Молекулярная масса полимера П(ЗГБ) составила $M_w = 561$ kDa, полидисперсность $K_d = 2,40$.

Торф, древесные опилки и глину со следующими начальными характеристиками использовали в качестве наполнителей: торф верховой марки "Агробалт-Н", гос. рег. 0428-06-209-139-0-0-01 (ЗАО Росторфинвест. Произведено в России ООО «Академия цветоводства»); древесные опилки получены измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250-85 (компания «СтанкоПремьер», Россия); - глина, ппп - 6,92 %; SiO_2 - 60,1 %; Al_2O_3 - 19,17 %; Fe_2O_3 - 6,72 %; CaO - 2,02 %; MgO - 2,12 %; SO_3 - 0,65 %; Na_2O - 0,88 %; K_2O - 1,45 %. Модульные характеристики – п - 2,32; р - 2,85 (Красноярский край, г. Красноярск, Кузнецовское месторождение глины).

В качестве модельных препаратов выбраны гербицид-метрибузин и фунгицид-эпоксиконазол фирмы Xi'an TaiCheng Chem Co., Ltd. Китай. Метрибузин или [4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазин-5(4H)-он] применяется для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками в посадках томатов, картофеля, розы эфиромасличной, люцерны 2-го года вегетации.

Молекулярная масса 214,3 и температура плавления 125-126°C. Основным ингибирующим действием является торможение процессов фотосинтеза.

Эпоксиконазол [(2RS,3SR)-1-[3-(2-хлорфенил)-2,3-эпокси-2-(4-фторфенил)пропил]-1H-1,2,4-триазол] фунгицид широкого спектра действия. Высоко эффективен против возбудителей мучнистой росы, ржавчины, пятнистостей колоса и листьев зерновых культур. Молекулярная масса 329,8 и температура плавления 136,2 °C. Ингибирует синтез белков клеточной стенки патогенных грибов.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Получение смесей: полимера, наполнителя и пестицида

Гомополимер и наполнители измельчали ударно-сдвиговым воздействием на ультразвуцентрической мельнице ZM 200 («Retsch», Германия). Размол проводили при использовании сита с диаметром отверстий 2 мм и скорости вращения ротора 18000 об/мин. Затем для гомогенизации порошков определяли фракционный состав полимера и наполнителей с помощью аналитической просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия), время фракционирования составило 10 мин, амплитуда 1,5 мм, навеска 100 г. К выбранной фракции полимера размером 200 мкм добавляли навески различных наполнителей (торф, опилки, глина) аналогичного размера и выбранного пестицида. Смешивание порошков проводили в настольном планетарном миксере SpeedMixer DAC 250 SP (Hauschild Eng., Германия), время смешения 1 мин, скорость 1000 об/мин.

2.2.2. Получение таблетированных форм и гранул

Таблетированные формы получали методом холодного прямого прессования из ПЗГБ и его смесей с наполнителями в соотношении полимер:наполнитель:пестицид 25:15:10 мг на лабораторном полуавтоматизированном прессе MiniPress (Минск) при давлении 36 Бар. Гранулы

получали из гомогенизированных порошков на пеллетайзере Pharma Test. Полученные гранулы сушили на подносе при 25 ± 3 °C около суток.

2.2.3. Исследование свойств полученных 3D форм и гранул

Микроструктуру поверхности полимерных долговременных форм на примере 3D форм исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (микроскоп HITACHI™-3000 с системой микроанализа BRUKERXFlash 430 H, Япония и рентгеноспектрального анализа (программа QUANTAX 70). Все исходные материалы и смеси были проанализированы с помощью ИК-спектроскопии. ИК-спектры снимали в диапазоне 400–4000 см⁻¹ с использованием FT-IR-спектрометра NICOLET 6700 (Thermo Scientific, США) и аксессуара Smart Orbit методом аттенюированного полного отражения (ATR).

Термический анализ исходных материалов и смесей проводили с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC-1 (METTLER TOLEDO, Швейцария). Порошкообразные образцы ($4,0 \pm 0,2$ мг каждый) помещали в алюминиевый тигель и сжимали перед измерением. Каждый образец измеряли не менее 3 раз. Образцы нагревали со скоростью от 5 °C / мин до 200 °C, затем охлаждали до -20 °C, выдерживали в течение 20 минут и повторно нагревали до 320 °C. Температуру плавления (T_{melt}) и температуру термического разложения (T_{degr}) определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE». Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker» (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке).

2.2.4. Исследование выхода гербицидного и фунгицидного препаратов из полученных форм *in vitro*

Выход метрибузина и эпоксиконазола из полученных 3D форм и гранул исследовали в лабораторных условиях в два этапа. Для этого 3D формы и гранулы (весом 50 мг) с различными наполнителями (торф, опилки, глина) в трех повторностях стерилизовали под ультрафиолетовой лампой в течение 15 мин и помещали в заранее проавтоклавированные с дистиллированной водой конические колбы со 100-мл воды для метрибузина (его растворимость 1200 мг/л) и 1,7 л воды для эпоксиконазола (его растворимость 6,6 мг/л). Колбы инкубировали при 22-25 ° С в термостате-инкубаторе Innova 44 New Brunswick 150 об / мин. Пробы (10 мл) отбирали в стерильные центрифужные пробирки в течение 30 суток, первые 3,6 часов и через 1,3,7 сутки и т.д. Стерильные центрифужные пробирки центрифугировали при 8000 об / мин в течение 7 минут, супернатант отбирали в асептических условиях. Свежую стерильную среду (10 мл) добавляли в конические колбы и снова помещали на шейкер

На втором этапе исследовали выход только метрибузина из полученных 3D форм и гранул в эксперименте с дренажной системой - имитацией грунтовых вод. Для этого в пластиковые контейнеры с заранее перфорированным дном помещали мелкий щебень и засыпали навеску земли 100 г. Затем в середине контейнера размещали полученные формы в мешочках из органзы и засыпали оставшейся землей. Контейнеры помещали в термостабильный шкаф, при температуре 25 С и влажности 50%. Полив и сбор грунтовых вод осуществляли каждые три дня. Эксперимент проводили в течение 30 суток.

Концентрацию вышедшего из форм метрибузина и эпоксиконазола определяли согласно МУК 4.1.1960,4.1.1961,4.1.1963—4.1.1980—05 и МУК 4.1.3187-14, соответственно. Для экстрагирования метрибузина и эпоксиконазола 10 мл предварительно отфильтрованной воды помещали в делительную воронку

емкостью 50 мл. Добавляли 3 мл дихлорметана и встряхивали в течение 1 мин. Нижний органический слой отделяли, собирая в коническую колбу емкостью 100 мл. Водный слой экстрагировали дихлорметаном еще дважды порциями по 3 мл. Объединенную органическую фазу пропускали через слой безводного сульфата натрия и упаривали на роторном вакуумном испарителе (Büchi, Switzerland) досуха при температуре 30 °С. Остаток растворяли в 1 мл ацетона и анализировали на содержание метрибузина и эпоксиконазола на газожидкостном анализаторе 7890/5975C (“Agilent Technology”, USA).

2.2.5. Исследование фунгицидной активности полученных форм in vitro

Для оценки фунгицидной активности полученных форм с эпоксиконазолом против гриба *Fusarium verticillioides*, культивируемого на солодовом агаре, предварительно были подготовлены чашки Петри, содержащие стерильный МПА по 20 мл. На одной стороне чашек помещали мицелий *Fusarium verticillioides* диаметром 5 мм на противоположной стороне размещали формы с фунгицидом. Чашки инкубировали в термостатированном шкафу при 25 °С в течение 7 дней. Затем анализировали рост колоний гриба с помощью измерения радиуса грибкового мицелия и определение степени подавления роста гриба относительно отрицательного контроля (свободный препарат). Как негатив-контрольную, мы измерили радиус грибкового мицелия, выращенного под теми же условиями в чашках Петри без фунгицида. Все процедуры были выполнены в трех экземплярах

2.2.6. Исследование фунгицидной активности в посевах пшеницы зараженных корневой гнилью

Сконструированные формы разработанных препаратов в виде гранул (масса $6 \pm 0,7$ мг) на основе ПЗГБ и филлера (опилки – 15% от массы гранулы) с 10%-ной нагрузкой фунгицидом (от массы гранулы) помещали в пластиковые

контейнеры объемом 500 см², заполненные почвой (масса почвы в контейнере составляла 400 г/контейнер). Гранулы с ЭПОК, упакованные в чехлы из мелкоячеистой сетки (по 2 образца в каждом контейнере) вносили в почву одновременно с семенами высших растений на глубину 1,5-2 см из расчета 150 г семян на 1 м², затем засыпали землей и поливали 60 мл воды для достижения влажности почвы 60%. В положительном контроле почву обрабатывали чистыми препаратом эпоксиконазола согласно рекомендованным нормам внесения Минсельхоз России (2018 г.). Количество внесенного препарата составило: для эпоксиконазола 8,75 мг на м². В отрицательном контроле фунгицид в почву не вносили. Растения – пшеница Новосибирская 15 выращивали в климатической камере (Фитотрон) ЛиА-2 (Россия), поддерживая суточный цикл по температуре, освещенности и влажности в шестиступенчатом режиме «ночь – раннее утро – позднее утро – день – ранний вечер – поздний вечер». Температура изменялась в пределах от 10°C ночью до 18°C днем в первые семь недель эксперимента и от 14°C до 22°C – в последующие пять недель. Освещенность изменялась от 0 до 300 мкмоль/м²/с с шагом 100 мкмоль/м²/с. Минимальную влажность почвы поддерживали на уровне 50 % . В динамике длительного эксперимента (58 суток) регистрировали состояния и рост растений с еженедельным фотодокументированием, показателями роста и продуктивности служили измеряемые величины плотности растений и вес воздушно-сухой биомассы.

Подсчет фитопатогенных грибов *Fusarium* и общих микроскопических грибов в образцах почвы проводили путем посева суспензии почвы на чашки Петри с агаром с экстрактом солода, с хлорамфениколом (100 мкг/л среды) для подавления роста клеток. Все посева выполняли в трех экземплярах из взвеси почвы в разведении 10⁵. Чашки инкубировали в термостате при температуре 25 °С в течение 7–10 дней. Микроскопический анализ колоний проводили с использованием микроскопа AxioStar (Carl Zeiss). Микроскопические почвенные

грибы были идентифицированы по их культурным и макроморфологическим свойствам (структура и цвет колоний, структура мицелия и споровых органов), которые являются объективными параметрами для идентификации этих микроорганизмов (Sutton et al., 2001; Watanabe, 2002).

2.2.7. Исследование гербицидной активности полученных гранул с опилками и метрибузином в лабораторных экосистемах с высшими растениями

Гербицидную активность гранул на основе ПЗГБ с опилками, загруженных 10% метрибузина изучали в лабораторных экосистемах с высшими растениями. Пластиковые контейнеры объемом 500см² были заполнены полевой почвой (400мг). С семенами на глубине 2-2,5 см горшка, помещали семена пшеницы Новосибирская 15 и полученные гранулы, по одной грануле на горшок. Затем засыпали слоем почвы и сеяли сорное растение Горчица полевая *Sinapis arvensis*. в климатической камере (Фитотрон) ЛиА-2 (Россия), поддерживая суточный цикл по температуре, освещенности и влажности в шестиступенчатом режиме «ночь – раннее утро – позднее утро – день – ранний вечер – поздний вечер». Температура изменялась в пределах от 10°С ночью до 18°С днем в первые семь недель эксперимента и от 14°С до 22°С – в последующие пять недель. В качестве контроля использовали две группы: в положительном контроле вносили чистый препарат метрибузин в концентрации (49 мг/м²) рекомендованной нормами внесения Минсельхоз России; в отрицательном контроле гербицид не добавляли. Оценивали рост и продуктивность растений, путем измерения наземной воздушно-сухой биомассы. Плотность сорняков была рассчитана на основе количества растений в контейнере 54 см², в пересчете на м².

2.3. Статистический анализ данных

Статистическая обработка результатов была проведена общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартными отклонениями. Статистическую значимость результатов определяли по критерию Стьюдента (уровень значимости $p = 0,05$).

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА 3D ФОРМ И ГРАНУЛ ГЕРБИЦИДНОГО И ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ

3.1. Свойства поверхности и физико-химические характеристики полученных форм

Получена серия долговременных форм гербицидного и фунгицидного действия в виде 3D форм (диаметром 6 мм и высотой 3 мм) и гранул (диаметром 2 мм, длиной от 2 - 4 мм) на основе поли-3-гидроксибутирата с различными наполнителями: торфом, опилками и глиной. Макрофото полученных форм представлено на рисунке 1.

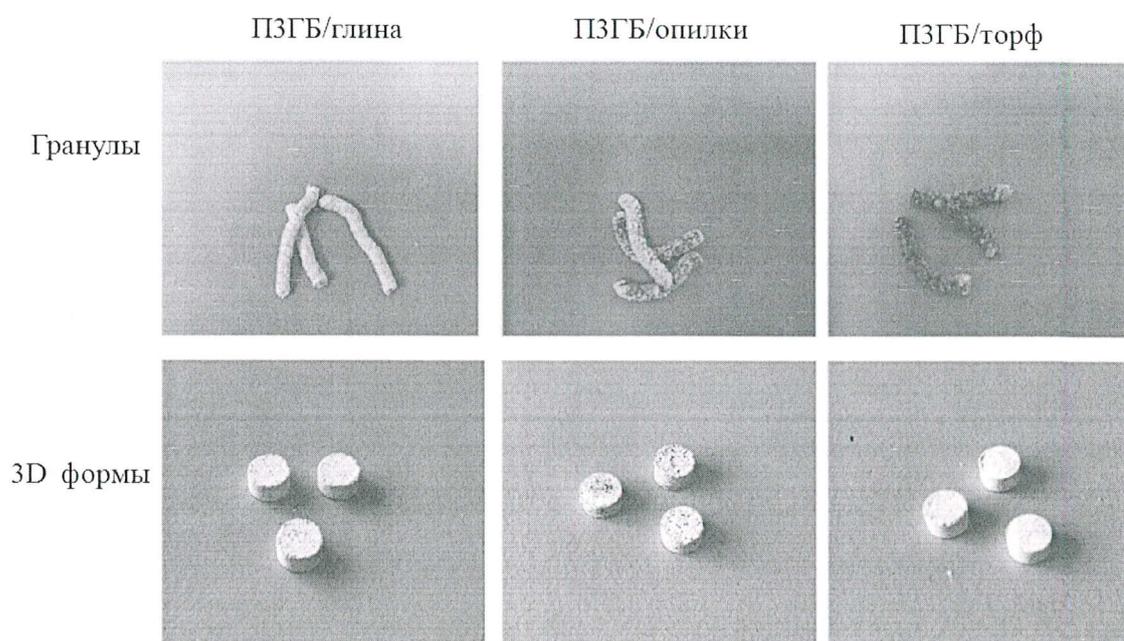


Рисунок 1 – Фотографии полученных форм гранул и 3D форм (эпоксиконазол), полученные на основе ПЗГБ с природными наполнителями.

Для исследования микроструктуры поверхности с помощью сканирующей электронной микроскопии были выбраны 3D формы (Рисунок 2). СЭМ-

изображения показали различия 3D форм связанные в основном с наполнителем. Образцы ПЗГБ/глина и ПЗГБ/торф имели рыхлую поверхность с многочисленными дефектами, порами и пустотами (показаны стрелками), в отличие от образцов ПЗГБ/опилки. Поверхность образцов ПЗГБ/опилки была более твердой, с несколькими трещинами, прямоугольные частицы опилок были встроены в поверхностный слой полимера.

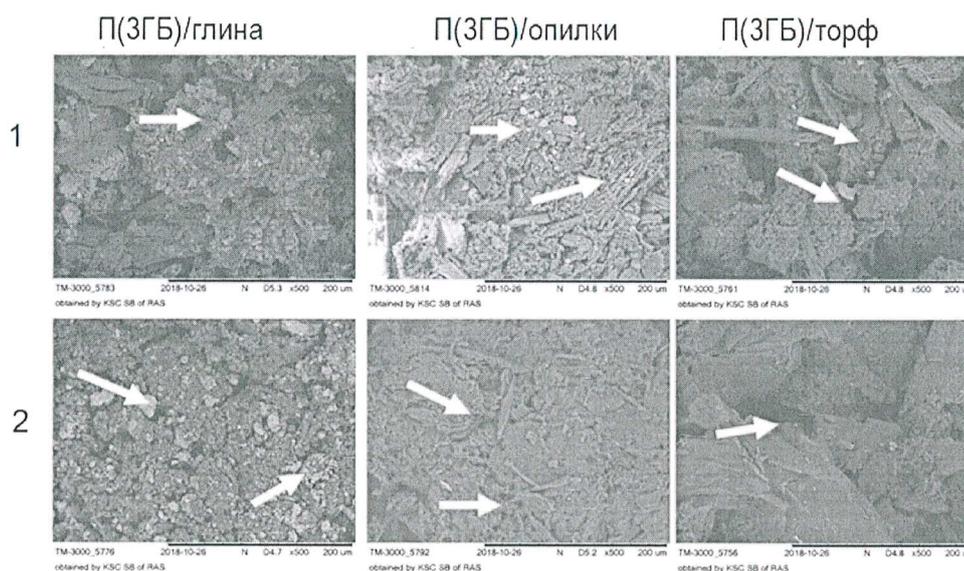


Рисунок 2 – РЭМ изображения 3D форм на основе П(ЗГБ) с разными наполнителями, нагруженные: 1 - метрибузином, 2 - эпоксиконазолом. Стрелками указан наполнитель.

Физико-химические характеристики смесей на основе полимера, наполнителей и выбранных препаратов исследованы на примере их смесей и представлены в таблице 1.

Таблицы 1 – Физико-химические свойства исходных гербицидных и фунгицидных смесей

Наименование	Молекулярная масса, М, кДа	Степень кристалличности, С _х , %	T _{пл}
--------------	----------------------------	---	-----------------

П(ЗГБ)	585,1	75	176
Исходные препараты			
Метрибузин	214,3	95	126,9
Эпоксиконазол	329,8	88	136,2
Долговременные формы гербицидов и фунгицидов			
Наименование	$C_x, \%$	$T_{пл.} \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{дегр.} \text{ } ^\circ\text{C}$ (начала деструкции и образца)
П(ЗГБ)/опилки/метрибузин	65	127,9; 162,8	261,4
П(ЗГБ)/торф/метрибузин	61	126,7; 164,9	271,5
П(ЗГБ)/глина/метрибузин	79	127,2; 161,6	262,7
П(ЗГБ)/опилки/эпоксиконазол	60	135,84 165,1	250,9
П(ЗГБ)/глина/эпоксиконазол	70	136,0; 167,5	263,4
П(ЗГБ)/торф/эпоксиконазол	65	135,7; 165,1	272,9

Исследованные метрибузин и эпоксиконазол различались между собой значениями молекулярной массы и термической дегградации (M_v и $T_{дегр.}$), а также имели более высокую степень кристалличности по сравнению с П(ЗГБ). У полученных трехкомпонентных форм (полимер/наполнитель-гербицид) в целом упорядоченная фаза доминировала над аморфной (таблица 1) степень кристалличности за исключением образца П(ЗГБ)/глина/метрибузин (79%) была

на уровне 61-65%. В случае с фунгицидом кристалличность снижалась до 60% в образцах П(ЗГБ)/опилки/эпоксиконазол. В зависимости от типа использованных препаратов сконструированные формы отличались температурными характеристиками. На всех термограммах зафиксировано наличие двух пиков, которые соответствуют плавлению пестицида и полимера. Что говорит о разделении системы и подтверждает отсутствие химической связи между формой и препаратом. Однако следует отметить снижение температуры плавления для П(ЗГБ) в смеси по сравнению с чистым полимером. Наиболее сильное снижение температуры плавления отмечается для форм с метрибузином до 161 – 162 °С. Для форм с депонированным эпоксиконазолом температура плавления понизилась до 165 °С.

Для определения характера взаимодействия смесовой полимерной основы и депонированных в нее гербицида и фунгицида привлечена ИК-спектроскопия (Рисунок 3). На примере смесей с эпоксиконазолом анализ снятых ИК-спектров показал отсутствие образования химических связей между гербицидом и основой, что позволяет говорить о физическом характере взаимодействия компонентов в сконструированных формах.

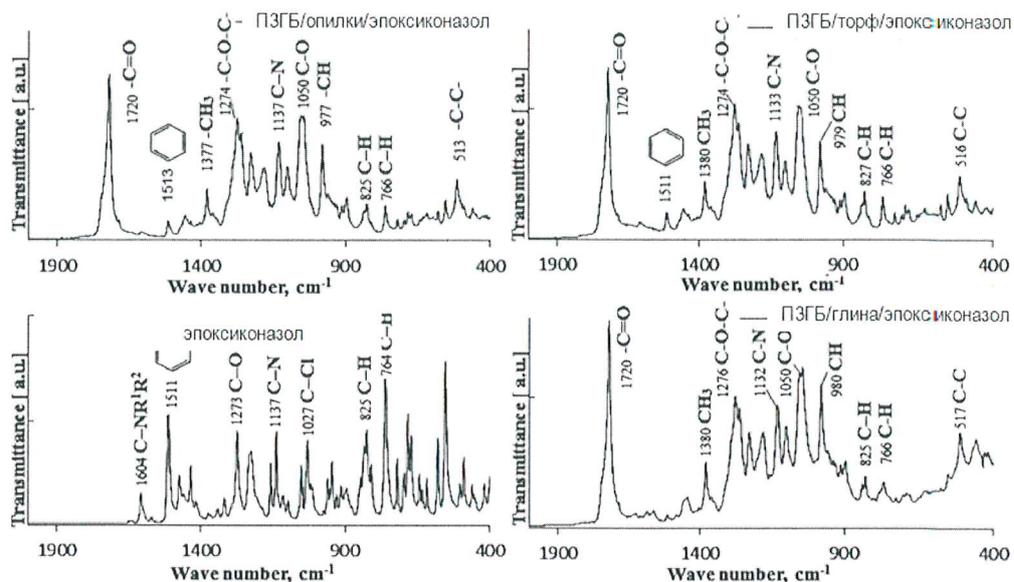


Рисунок 3 – ИК-спектры полученных форм эпоксиконазола депонированного в разрушаемую смесь основу из П(ЗГБ) и природных наполнителей

ИК-спектры содержат набор полос поглощения, характерных для фунгицида и материалов основы. Отчётливо видны характеристические валентные колебания карбонильных групп $C=O$ полимера ($1700-1760\text{ см}^{-1}$) и наложение колебаний групп $C=O$ эпоксиконазола, а так же асимметричные валентные колебания CH_3 - и CH_2 - групп ($2994, 2974, 2936\text{ см}^{-1}$). Для опилок и торфа валентные и скелетные колебания бензольного кольца ($1422\text{ см}^{-1}, 1504\text{ см}^{-1}, 1593\text{ см}^{-1}$), в этой области происходит наложение колебаний бензольных колец эпоксиконазола. Наличие характерной полосы группы $-NH-NH_2$ ($\nu 1581\text{ см}^{-1}$) для эпоксиконазола указывает на отсутствие окисления в процессе смешения и депонирования фунгицида.

3.2. Выход метрибузина и эпоксиконазола из полученных форм *in vitro*

Согласно литературным данным, кинетика выхода гербицидных и фунгицидных препаратов из носителей в водной среде происходит в несколько

этапов: (1) растворения не инкапсулированного пестицида с поверхности матрицы; (2) проникновение растворителя в матрицу; (3) растворение пестицида в самой матрице и (4) высвобождение гербицида в водную среду за счет диффузии [24]. В соответствии с теорией растворимости химические потенциалы растворителя и растворенного вещества постепенно изменяются во время растворения. Растворение прекращается при той концентрации, когда химический потенциал растворенного вещества в растворе равен химическому потенциалу растворенного вещества в его чистой фазе.

Исследование выхода метрибузина и эпоксиконазола в воду из полученных форм в шейкере инкубаторе показало, что на выход гербицида влияет форма, наполнитель и растворимость самих пестицидов (Рисунок 4,5).

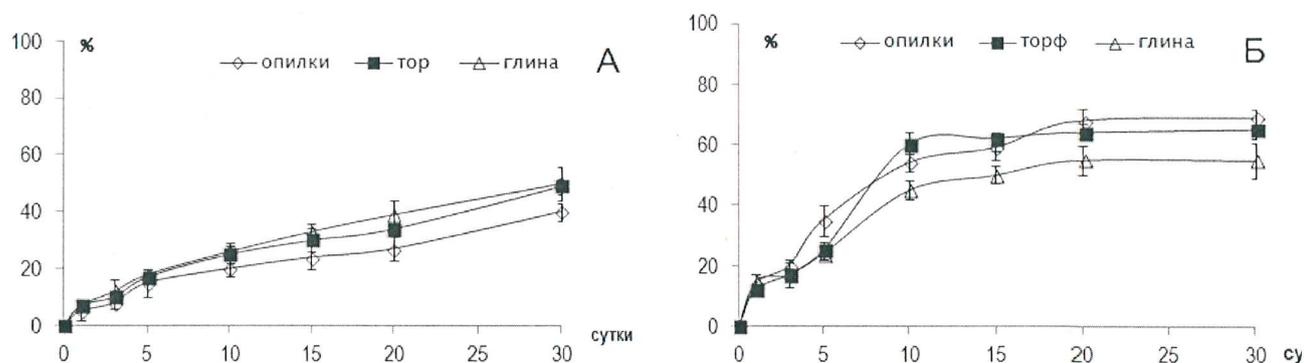
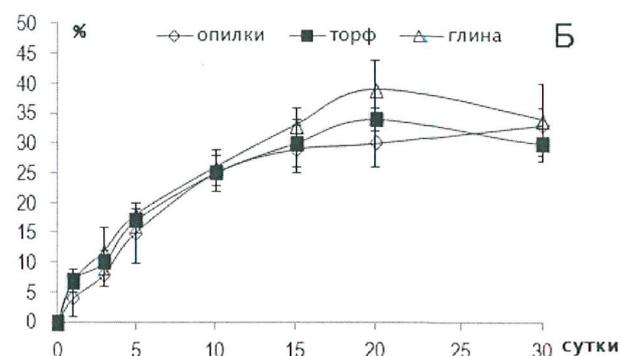
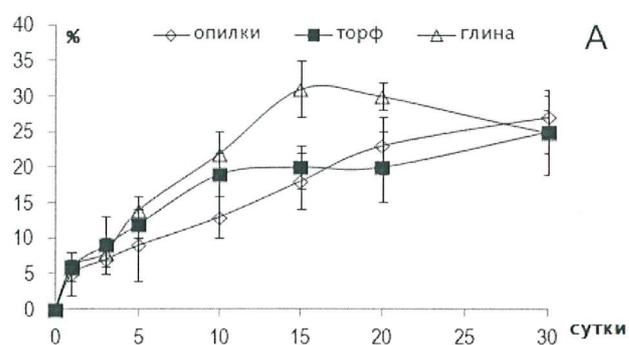


Рисунок 4 – Выход метрибузина в воду из 3D форм (А) и гранул (Б) с различными наполнителями в течение 30 суток.

Количество вышедшего метрибузина из гранул на 20% превышало данные показатель из таблеток и к 20 суткам достигало плато. При этом выход метрибузина из форм содержащих глину и торф был значительно быстрее и достигал плато на 10 сутки для гранул в отличие от гранул с опилками.



Выход эпоксиконазола был существенно ниже, что связано с его меньшей растворимостью в воде (от 0.05 до 2.04 mg/L в зависимости от pH-это не говорить) в отличие от метрибузина. Максимальное количество вышедшего эпоксиконазола составило 34% и 28%, для гранул и 3D форм, соответственно (Рисунок 5). Однако стоит отметить падение концентрации эпоксиконазола на 23 сутки, что связано с природой самого препарата и его разложением в воде. Рисунок 5 – Выход эпоксиконазола в воду из 3D форм (А) и гранул (Б) с различными наполнителями в течение 30 суток

На втором этапе при исследовании выхода пестицидов с использованием дренажной системы были выбраны формы с метрибузином в связи с высокими выходами данного гербицида и возможностью его детекции даже в небольших концентрациях (Рисунок 6).

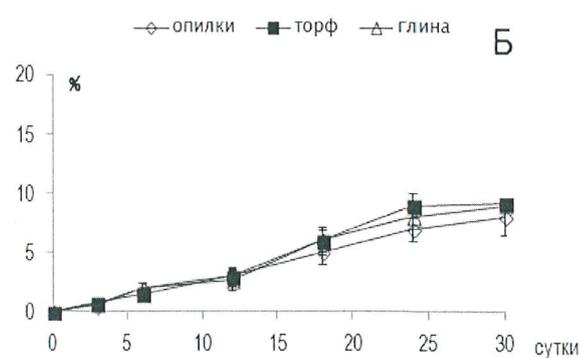
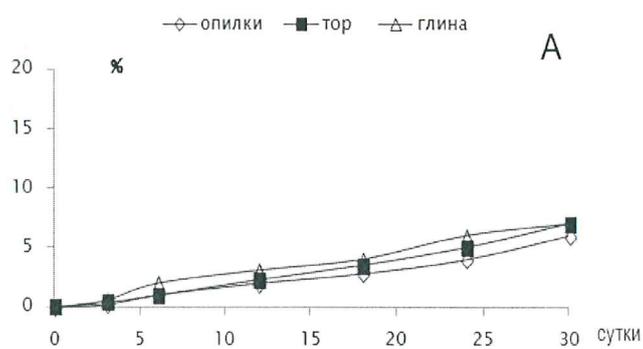


Рисунок 6 – Выход метрибузина в дренажной системе из 3D форм (А) и гранул (Б) с различными наполнителями в течение 30 суток в эксперименте с дренажной системой.

После 35 суток эксперимента, установлено, что количество метрибузина в дренажных водах составляло от 7 до 10% для 3D форм и гранул, соответственно. При этом влияние наполнителя на выход гербицида не зарегистрировано. Однако исследование остаточного содержания метрибузина в формах после экспозиции в почве показало явные отличия (Рисунок 7).

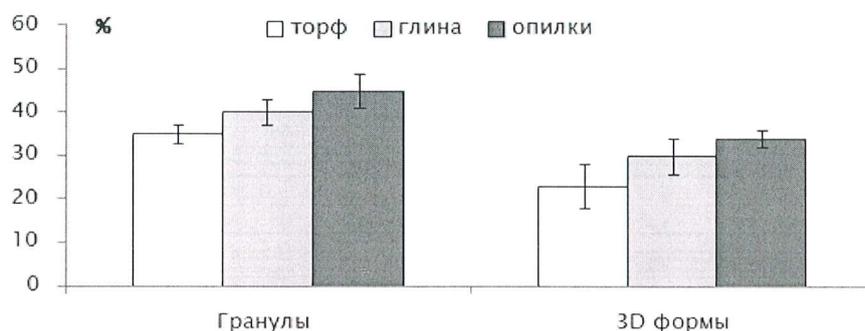


Рисунок 7 – Остаточное содержание метрибузина в полученных формах после 30 дней экспозиции в почве.

Максимальное количество метрибузина зарегистрировано в таблетках и составило 35, 40 и 45% для наполнителей торф, глина и опилки. В гранулах метрибузина по окончании эксперимента было 23, 30 и 34% для тех же наполнителей. Таким образом, для дальнейших экспериментов были отобраны гранулированные формы с опилками, отличающиеся долговременным выходом препарата.

3.3. Исследование фунгицидной активности 3D форм и гранул *in vitro*

Исследование *in vitro* противогрибковой активности полученных форм и свободного фунгицида показали, что все формы обладают значительным ингибирующим эффектом на патогенный гриб *F. verticillioides*; размер грибковых колоний в присутствии фунгицида значительно меньше, чем в контрольной группе (Рисунок 8). Средний радиус грибковых колоний в чашках Петри с гранулами и 3D формами с эпоксиконазолом был сопоставим с радиусом колоний в чашках с чистым фунгицидом (положительный контроль) (1,3-1,7 см). Грибковые колонии в группе без фунгицида (отрицательный контроль) были намного больше (3,5-3,8 см).

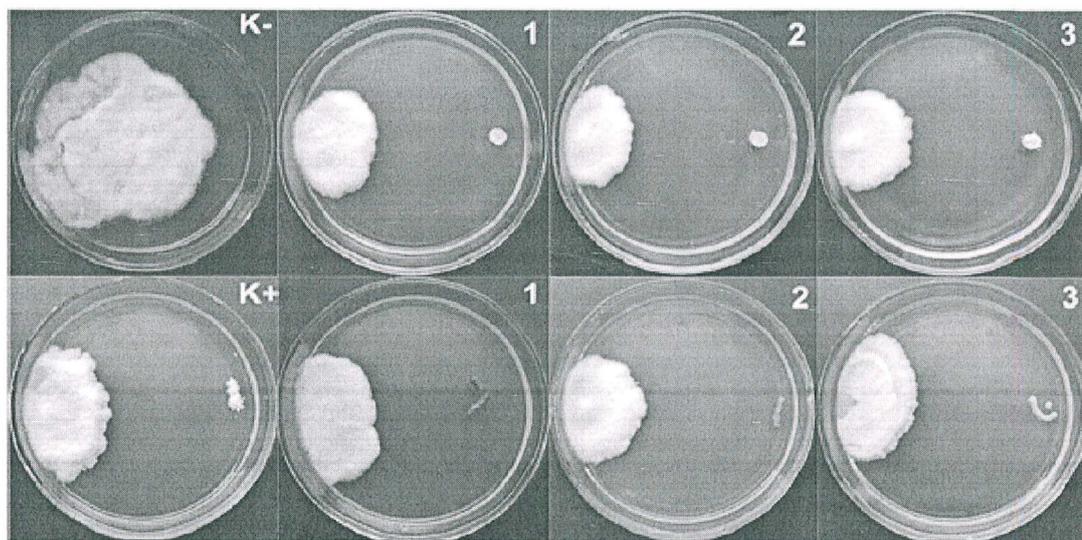


Рисунок 8 – Чувствительность *F. verticillioides* к фунгицидам в разных формах: K-, отрицательный контроль (без фунгицида); K +, положительный контроль (эпоксиконазол); 1, 3D формы и гранулы ПЗГБ/торф/эпоксиконазол; 2, 3D формы и гранулы ПЗГБ/глина/ эпоксиконазол; и 3, 3D формы и и гранулы ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол

Таким образом, полученные формы столь же эффективны, как и свободные фунгициды. Нет значительных различий в ингибировании роста *F. verticillioides* между 3D формами и гранулами, а также наполнителем.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕРБИЦИДНОГО И ФУНГИЦИДНОГО ЭФФЕКТА ПОЛУЧЕННЫХ ФОРМ В ЛАБОРАТОРНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ С ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ

4.1. Исследование фунгицидного действия полученных форм в посевах пшеницы, зараженных возбудителями корневой гнили

Эффективность действия разработанных форм в виде гранул на основе поли-3-гидроксibuтирата в композиции с природным наполнителем (опилками) и активным веществом (эпоксиконазолом), исследована в лабораторных почвенных экосистемах, включающих высшие растения–яровая пшеница Новосибирская 15, зараженная возбудителями корневой гнили (фитопатоген *Fusarium moniliforme* на 20 %).

В начале эксперимента (7-14 суток) внесение фунгицидов способствовало несколько замедленному (меньше на 8,4 %), чем в контроле развитию листьев пшеницы (24,1 см), что связано с положительным подавлением гнили и частичным ингибированием самого культурного растения в силу системного действия препарата (Рисунок 9).

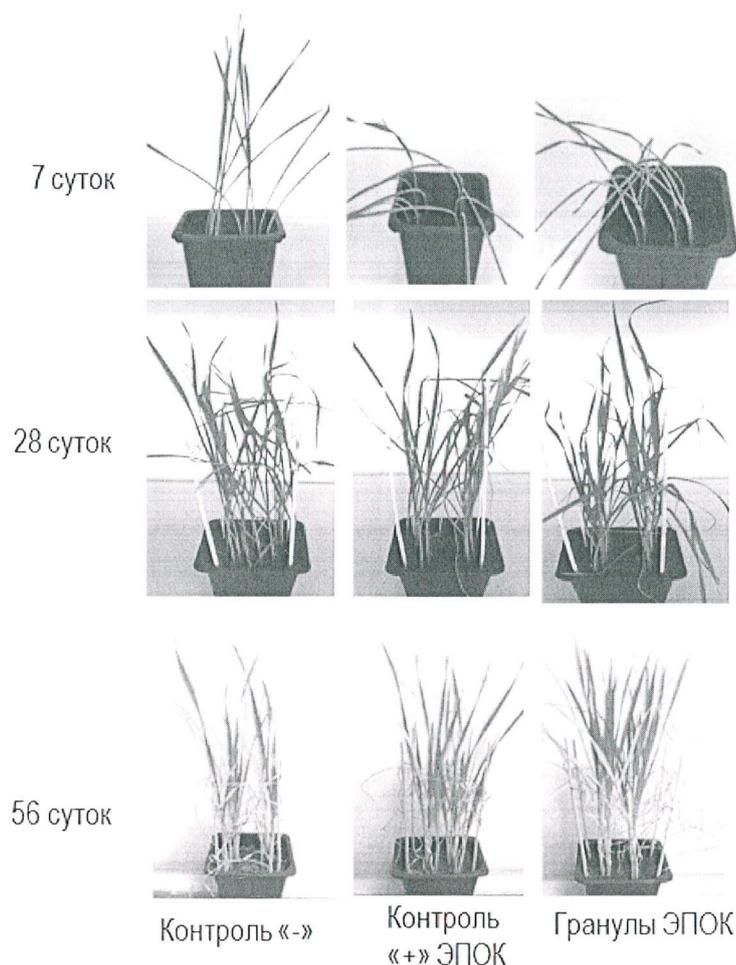


Рисунок 9 – Макрофото растения (пшеница Новосибирская 15), зараженного возбудителями корневой гнили после внесения гранул ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол в течение всего эксперимента.

Несмотря на различные значения длины флагманского листа в отрицательном и положительном контроле, и экспериментальной группе, биомасса растений на 7 сутки ($17,6 \pm 1,4$ и $18,6 \pm 1,8$ г/м²) достоверно не отличалась и была сопоставима для всех вариантов в первой фазе развития растения (Таблица 2). На 28 сутки эксперимента высота растений пшеницы в варианте с полученными гранулами ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол превышала отрицательный контроль и была сопоставима с положительным контролем. Биомасса растений увеличивалась относительно положительного контроля на 8,3 %.

Таблица 2 – Показатели высоты растения и воздушно сухой биомассы надземной части

Варианты	Высота флагманского листа	Воздушно-сухая биомасса надземной части, г/м ²
	пшеница	пшеница
1 точка (7 суток)		
Контроль «-»	23,4±0,1	18,6±1,8
Контроль ЭПОК	19,25±1,7	17,6±1,4
Гранулы ЭПОК	19,7±0,8	18,6±2,2
2 точка (14 суток)		
Контроль «-»	27,7±0,7	40,1±4,3
Контроль ЭПОК	22,2±2,6	45,1±13,1
Гранулы ЭПОК	22,7±2,1	37,6±11,4
3 точка (28 суток)		
Контроль «-»	29,3±2,3	80,5±0,9
Контроль ЭПОК	32,8±0,7	97,7±6,0

Гранулы ЭПОК	31,2±0,9	103,7±11,4
4 точка (42 суток)		
Контроль «-»	31,2±1,6	119,5±1,7
Контроль ЭПОК	39,5±1,2	159,0±1,2
Гранулы ЭПОК	39,3±1,7	156,6±4,5
5 точка (56 суток)		
Контроль «-»	32,1±2,1	172,5±1,8
Контроль ЭПОК	40,6±0,7	270,9±1,2
Гранулы ЭПОК	43,5±2,1	276,8±1,8

К концу эксперимента биомасса растений в группе с гранулами ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол в 1,5 раза превышала значения биомассы в отрицательном контроле. Значения длины флагманского листа и воздушно-сухая биомасса в положительном контроле и в группе с гранулами были практически сопоставимы.

Для оценки степени действия полученных форм в отношении патогенных грибов были проведены исследования зараженности корней (Рисунок 10) и подсчет количества грибов (Рисунок 11) в каждой группе.

Зараженность корней в отрицательном контроле на протяжении всего эксперимента была значительно выше по сравнению с положительным контролем

и гранулами ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол. В положительном контроле в первые две недели степень зараженности корней была достоверно ниже, чем в группе с гранулами. В это же время в группе с полученными гранулами, процент зараженных корней постепенно уменьшался, несмотря на небольшой скачок в конце эксперимента, процент зараженности корней в 2,5 раза был ниже по сравнению с положительным контролем. Такую разницу можно объяснить пролонгированным выходом эпоксиконазола из гранул, что позволило поддерживать определенную концентрацию фунгицида и уменьшить рост патогенных грибов.

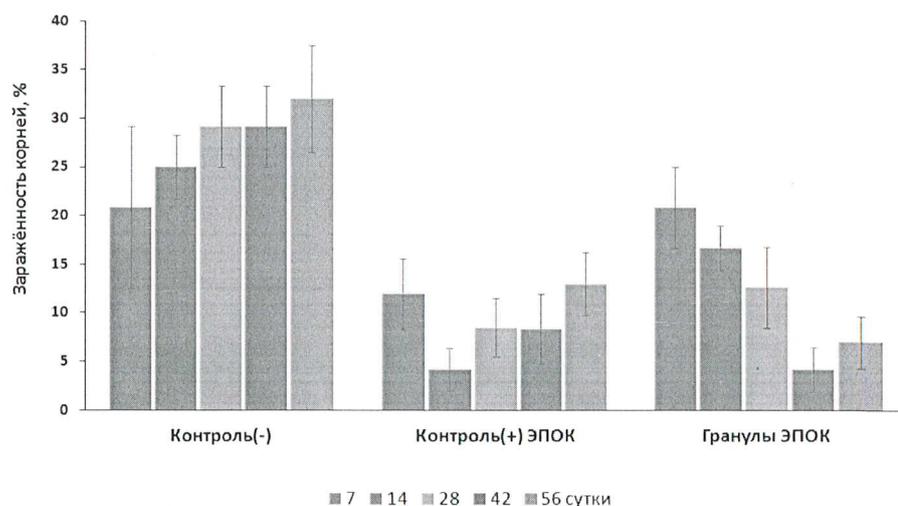


Рисунок 10 – Процент зараженности корней пшеницы Новосибирская 15 в зависимости от обработки в течение всего эксперимента.

Количество патогенных грибов в ризосферной почве пшеницы показано на рисунке 11. Внесение различных форм эпоксиконазола способствовало сокращению КОЕ грибов по сравнению с отрицательным контролем в 1,8- 2 раза.

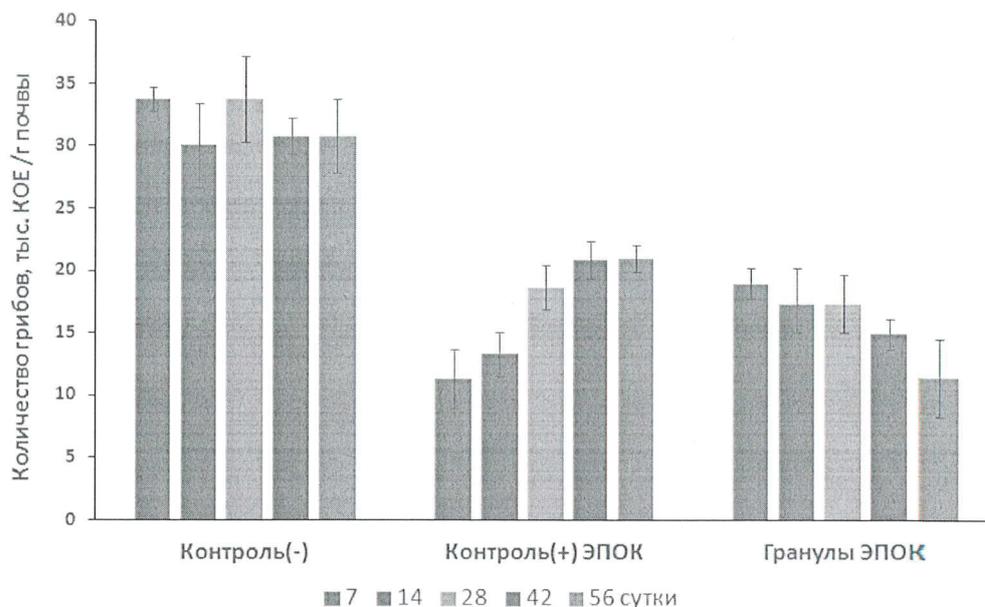


Рисунок 11 – Численность грибов в ризосферной почве пшеницы без обработки и после внесения различных форм эпоксиконазола.

Несмотря на снижение количества грибов в группе с эпоксиконазолом в первые две недели, их численность возростала к концу эксперимента. В отличие от положительного контроля в группе с гранулами количество грибов уменьшилось, что говорит о пролонгированном эффекте.

Таким образом, в лабораторном эксперименте с высшим растением доказано, что полученные формы гранул ПЗГБ/опилки/эпоксиконазол обладают долговременным фунгицидным эффектом, что способствует снижению процента зараженности корней и количества патогенов в ризосферной почве пшеницы.

4.2. Исследование гербицидного действия полученных форм в посевах пшеницы с сорными растениями

Гербицидную активность гранул на основе ПЗГБ с опилками, загруженных 10% метрибузина изучали в посевах пшеницы Новосибирская 15 с сорным растением горчица полевая *Sinapis arvensis*. В динамике экспериментов регистрировали состояния и рост культивируемых и сорных растений с

еженедельным фотодокументированием и фиксацией начала и массовости гибели сорняков, оцениваемой по плотности и весу их биомассы

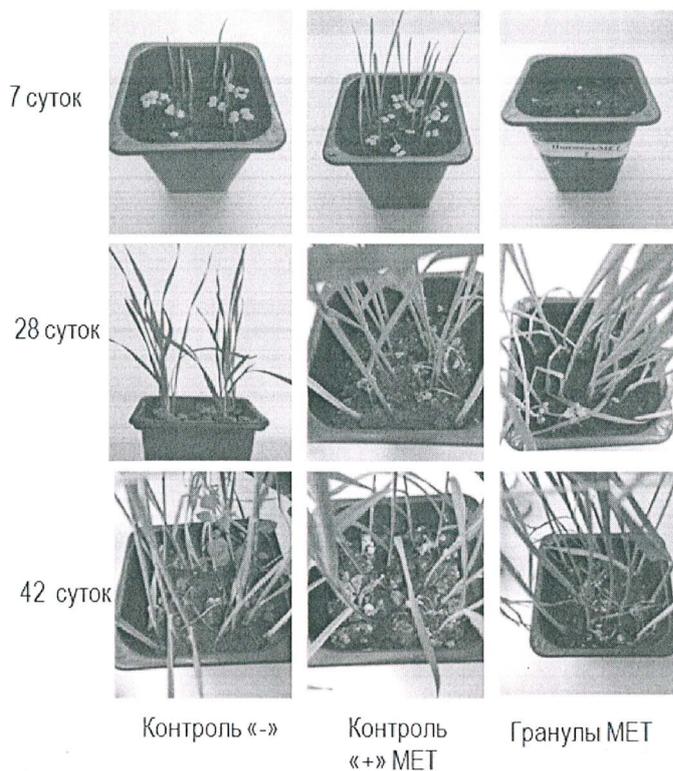


Рисунок 12 – Макрофото растения (пшеница Новосибирская 15) с сорным растением горчица полевая после внесения различных форм метрибузина.

Показатели роста и развития лабораторных посевов пшеницы представлены на рисунке 13. Смена фаз соответствовала обычно имеющим место для зерновых. При этом нельзя не отметить, что, несмотря на стабилизированный режим освещенности, температуры и влажности в камере, условия для развития пшеницы в лабораторных посевах нельзя считать оптимальными. Это связано с тем, что используемые почвенные микрэкосистемы были представлены небольшим объемом почвы (450–500 г), размещенной в пластиковых контейнерах объемом 500 см³, что недостаточно для данного растения, имеющего мощную корневую систему и требующего в связи с этим больших объемов почвы и большей глубины контейнеров.

В начальные сроки наблюдения (от всходов на начала фазы кущения) рост пшеницы и величина сформированной надземной биомассы были сопоставимыми для всех вариантов, независимо от наличия сорняков в посевах. Однако в более поздние сроки (выход в трубку) высота пшеницы и величина надземной биомассы были выше в обеих группах применения гербицида по сравнению с отрицательным контролем. Продукционные показатели посевов пшеницы, оцениваемые по величине надземной биомассы при использовании депонированной формы П(ЗГБ)/опилки/метрибузин составила соответственно, 175,0 г/м², а в положительном контроле – несколько ниже, – 160,4 г/м².

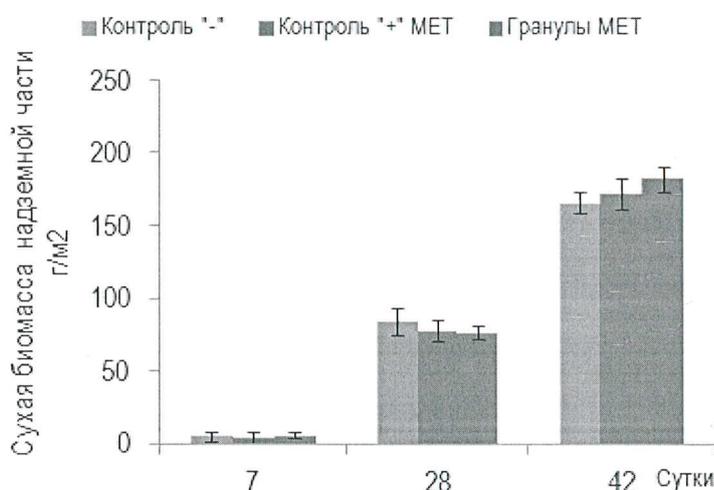


Рисунок 13 –Показатели надземной биомассы пшеницы в лабораторных посевах при различных способах доставки гербицида

На рисунке 14 показано, что к 28 суткам количество сорняков резко сократилось в положительном контроле по сравнению с началом эксперимента в 2 раза. В группе с гранулами П(ЗГБ)/опилки/метрибузин на срок 21 сутки под действием депонированной формы сорняков уже не осталось, массовая гибель сорняков приходилась на 14 сутки. Далее (42 сутки) в положительном контроле

отмечена полная гибель сорного растения; при использовании свободной формы метрибузина.

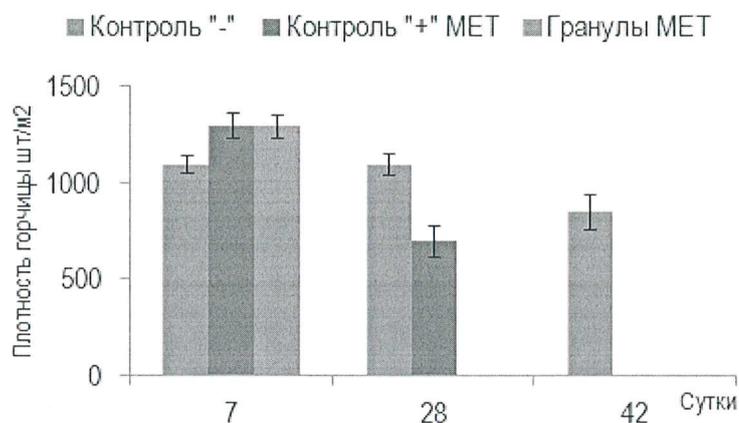


Рисунок 14 – Динамика гибели сорняка Горчица полевая в лабораторных посевах яровой пшеницы под действием свободной формы метрибузина (Контроль «+» MET) и экспериментальной формы (ПЗГБ/опилки/метрибузин).

Таким образом, полученные гранулы ПЗГБ/опилки/метрибузин обладают выраженным гербицидным эффектом, что подтверждено данными гибели сорных растений и показателями биомассы пшеницы, и могут быть использованы в качестве долговременной формы доставки метрибузина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены и исследованы долговременные формы пестицидов в виде таблетированных форм и гранул на основе П(ЗГБ) и природных наполнителей (торф, опилки, глина) с метрибузином и эпоксиконазолом.

2. Доказано, что введение наполнителей приводит к снижению степени кристалличности (от 75 до 54%) и температуры плавления самого полимера (от 175 до 165° С), а также изменению микроструктуры поверхности 3D форм.

3. Установлено, что на выход метрибузина и эпоксиконазола из полученных форм (таблеток и гранул) в воду влияют: форма носителя (3D форма или гранула), наполнитель и растворимость препаратов. В эксперименте с дренажной системой показано, что остаточное содержание метрибузина в гранулах в отличие от 3D форм на 10 -15% меньше.

4. Доказано, что 3D формы и гранулы с эпоксиконазолом проявляют фунгицидную активность против патогенного гриба *Fusarium verticillioides* независимо от наполнителя и могут быть использованы в посевах пшеницы зараженных корневой гнилью.

5. Долговременный гербицидный эффект полученных гранул с метрибузином и наполнителем-опилками, доказан в посевах яровой пшенице, зараженной сорным растением Горчица полевая. Применение полученных форм привело к гибели сорных растений через 28 суток и повышению биомассы растений по сравнению с отрицательным контролем в 1,2 раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюшин А. М., Державин Л. М. Краткий словарь по удобрениям – 2-е изд. – М., 1984г.
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. Браунс Ф.Э., Браунс Д.А., М. Химия лигнина. Лесная промышленность, 1964, с 190.
4. Войнова О. Н. Микробные полимеры в качестве разрушаемой основы для доставки пестицидов / О. Н. Войнова, Г. С. Калачева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – . 45, № 4. – . 427-431.
5. Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. – 2014.
6. Волова, Т. Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
7. Волова Т. Г. Биоразрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение : монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель, 2011. – 400 с.
8. Галлямова О. В. Действующие вещества фунгицидов. Эпоксиконазол [Электронный ресурс]: Пестициды.ру. Сельскохозяйственный он-лайн справочник [сайт] – Москва, 2014. – Режим доступа: <http://www.pesticide.ru> (дата обращения: 02.01.2020).
9. Галлямова О. В. Действующие вещества гербицидов. Метрибузин [Электронный ресурс]: Пестициды.ру. Сельскохозяйственный он-лайн справочник

[сайт] – Москва, 2014. – Режим доступа: <http://www.pesticide.ru> (дата обращения: 02.01.2020).

10. Глазунова Н.Н., Безгина Ю.А., Мазницына Л.В. Теоретические основы химической защиты растений. - Ставрополь, 2005. – с. 196

11. Гоготов И. Н. Биодegradация полиоксиалканоатов и их свойства //Пластические массы. – 2012. – №. 11. – с. 54-61.

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

13. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2013 год. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации (Минсельхоз России)

14. Ершова О. В., Чупрова Л. В., Муллина Э. Р., Мишурина О. В. Исследование зависимости свойств древесно-полимерных композитов от химического состава матрицы // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 2

15. Ефимов В. Н., Донских И. Н., Царенко В. П. Система удобрений/Под ред. В. Н. Ефимова – М.: КолосС, 2003-320с.

16. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. - М.: Колос, 2012. – с. 247

17. Колесников С.И. Оценка устойчивости почв юга России к химическому загрязнению // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. - 2013. - №91. - С.398-408

18. Куликова, Н. А. Гербициды и экологические аспекты их применения : учебное пособие. / Н. А. Куликова, Г. Ф. Лебедев. – Москва : Либриком, 2010. – 153 с.

19. Лившиц В. А., Бонарцев А. П., Иорданский А. Л. и др. Микросферы из поли-3-гидроксибутирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ // Высокомолекулярные соединения. Серия Б. — 2009. — Т. 51. — С. 1243–125.
20. Литвишко В.С., Литвишко О.В., Микрокапсулирование пестицидов на основе полиуретанов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. — 2016 — 50-53 с.
21. Мельников Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение //М.: Химия. — 1987. — 712 с.
22. МУК 4.1.1972-05 Определение остаточных свойств метрибузина в воде, почве, томатах и картофеле методом газожидкостной хроматографии.
23. МУК 4.1.1973-05 Определение остаточных количеств эпоксиконазола в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом газожидкостной хроматографии.
24. 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.
25. Павлюшин В. А. Фузариоз зерновых культур и опасность микотоксинов в России //АгроСнабФорум. — 2017. — №. 3. — С. 41-43.
26. 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
27. Сметник, А. А. Миграция пестицидов в почвах / А. А. Сметник, Ю. Я. Спиридонов, Е. В. Шеин. — Москва : РАСХН – ВНИИФ Москва, 2005. — 327 с.
28. Федоров, А. А. Пестициды – токсический удар по биосфере и человеку / А. А. Федоров, А. В. Яблоков. — Москва : Наука, 1999. — 285 с.
29. Шарков В. И., Куйбина Н. И., Химия гемицеллюлоз, М., 1972.

30. Шутко, А. П. Рынок средств защиты растений в мире и России: тенденции, динамика, прогнозы / А. П. Шутко, А. Г. Долгова // Международный студенческий научный вестник. – 2015. – № 2. – 14 с.
31. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards// *Interdisciplinary toxicology*. 2009. 2(1). 1-12.
32. Natalia Olegovna Zhila, Evgeniy Gennadievich Kiselev, Tatiana Grigorievna Volova. Constructing slow-release formulations of metribuzin based on degradable poly (3-hydroxybutyrate) // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2016. – Т. 64. – №. 28. – С. 5625-5632.
33. Baoxia Liu, Yan Wang, Fei Yang, Xing Wang, Hong Shen, Haixin Cui, Decheng Wu. Construction of a controlled-release delivery system for pesticides using biodegradable PLA-based microcapsules // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – Т. 144. – С. 38-45.
34. Doi, Y. Biodegradation of microbial poly(hydroxyalkanoates) / Y. Doi, Y. Kanesawa, N. Tanahashi // *Makromol. Chem. Rapid. Commun.* – 1989. – Vol. 10. – P. 227–230
35. Chan Zhang, RuzhuJia, Yuefeng Dong, Liangqi Zhao. Preparation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) microspheres for controlled release of buprofezin // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – С. 1-9.
36. Helal N. A. S. Nanotechnology in Agriculture: A Review // *Poljoprivredai Sumarstvo*. – 2013. – Т. 59. – №. 1. – С. 117-142.
37. Lindong Cao, Yajing Liu, Chunli Xu, Zhaolu Zhou, Pengyue Zhao, Shujun Niu, Qiliang Huang. Biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) microcapsules for controlled release of trifluralin with improved photostability and herbicidal activity // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – Т. 102. – С. 134-141.

38. Flores-Céspedes, F. Bentonite and anthracite in alginate-based controlled release formulations to reduce leaching of chloridazon and metribuzin in a calcareous soil / F. Flores-Céspedes, S. Perez-García, M. Villafranca-Sánchez, M. Fernández-Pérez // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 92. – P. 918–924.

39. 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.

40. Francesco Puoci, Francesca Iemma, Umile Gianfranco Spizzirri, Giuseppe Cirillo, Manuela Curcio, Nevio Picci. Polymer in agriculture: a review. // *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. - 2008. - T. 3. - № 1. – C. 299-314.

41. Kaur, G. Strategies for large-scale production of polyhydroxyalkanoates / G. Kaur, I. Roy // *Chem. Biochem Eng.* – 2015. – Vol. 29. – P. 157–172

42. Mohammad A. Chowdhury. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin-based biopolymer matrices // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2014. – T. 65. – C. 136-147.

43. Omid, F. Application of molecular imprinted polymer nanoparticles / F. Omid, M. Behbahani, H. S. Abandansari // *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. – 2014. – Vol. 12. – P. 137–147.

44. Rehab, A. Controlled-release systems based on the intercalation of polymeric metribuzin onto montmorillonite / A. Rehab, A. Akelah, M. M. El-Gamal // *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* – 2002. – Vol. 40. – P. 2513–2525.

45. Renato Grillo, Anderson do Espirito Santo Pereira et al. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: preparation, characterization and release kinetics in water // *Journal of hazardous materials*. – 2011. – T. 186. – №. 2-3. – C. 1645-1651.

46. 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.
47. Rummi Devi Saini. Biodegradable polymers // *International Journal of Applied Chemistry*. – 2017. – T. 13. – №. 2. – C. 179-196.
48. Sahoo, S. Kinetics of metribuzin release from bentonite-polymer composites in water // S. Sahoo, K. M. Manjaiah, S. C. Datta, A. Shabeer, J. Kumar // *J. Environ. Sci. Health, Part B*. – 2014. – Vol. 49. – P. 591–600
49. Sandeep Kumar, Neetu Chauhan, Madhuban Gopal, Rajesh Kumar, Neeraj Dilbaghi.. Development and evaluation of alginate–chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid // *International journal of biological macromolecules*. – 2015. – T. 81. – C. 631-637.
50. Sanchez-Bayo, F. Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems. // F. Sánchez-Bayo, P. J. van den Brink, R. M. Mann // *Bentham Science Publishers Ltd*. – 2011. – Vol. 4. – P. 63–87.
51. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biogenic polyesters // *Progress in polymer science*. – 2000. T.25. - №10. – C. 1503-1555.
52. Suzan Aline Casarin, Cassia Priscila Rodrigues, Osvaldo Francisco de Souza Junior, Francisco Rosario, Jose Augusto Marcondes Agnelli. Biodegradation in soil of the phb/wood flour (80/20) and PHB/sisal fiber (80/20) tubes // *Materials Research*. – 2017. – T. 20. – C. 47-50.
53. Tatiana Volova, Natalia Zhila, Evgeniy Kiselev, Svetlana Prudnikova, Olga Vinogradova, Elena Nikolaeva, Anna Shumilova, Anna Shershneva, Ekaterina Shishatskaya.. Poly(3-hydroxybutyrate)/metribuzin formulations: characterization, controlled release properties, herbicidal activity, and effect on soil

microorganisms //Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – T. 23. – №. 23. – C. 23936-23950.

54. Ya Wang, Chaonan Li, Yuxiang Wang, Ying Zhang, Xiaogang Li. Compound pesticide controlled release system based on the mixture of poly (butylene succinate) and PLA //Journal of microencapsulation. – 2018. – T. 35. – №. 5. – C. 494-503.

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

« 06 » июня 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Получение долговременных форм пестицидов в виде гранул и
таблетированных форм на основе поли-3-гидроксibuтирата
06.04.01 – Биология
06.04.01.09 – Фундаментальная и прикладная биология

Руководитель	 подпись, дата	доцент Базовой кафедры биотехнологии, к.б.н. должность, ученая степень	А.А.Шумилова инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата		Е.А. Лавицкая инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	зав.НИЛСиЭБ, к.б.н. должность, ученая степень	С.В. Овсянкина инициалы, фамилия

Красноярск 2020