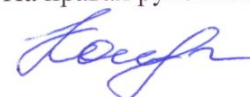


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) –
обособленное подразделение Институт биофизики
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Колесникова Ольга Дмитриевна

РАЗРУШАЕМЫЙ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТ
В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук, профессор
Волова Татьяна Григорьевна

Красноярск - 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. Биотехнологические препараты нового поколения для повышения продуктивности сельскохозяйственного производства	9
1.1 Пестициды и их влияние на окружающую среду и здоровье человека.....	9
1.2 Современные биотехнологические подходы в области создания гербицидных препаратов нового поколения	16
1.3 Разрушаемый поли-3-гидроксibuтират – целевой продукт биотехнологии.....	21
1.4 Потенциал микробных полигидроксиалканоатов для конструирования пролонгированных и адресных пестицидных препаратов нового поколения	30
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследований.....	33
2.1 Объекты исследований	33
2.2 Методы исследований	33
2.2.1 Питательная среда для культивирования микроорганизмов	33
2.2.2 Техника и методы культивирования штамма-продуцента ПГА.....	33
2.2.3 Методы контроля параметров процесса культивирования бактерий в режиме синтеза ПГА	36
2.2.4 Методы исследования химического состава и свойств ПГА.....	38
2.2.5 Конструирование долговременных форм пестицидных препаратов.....	38
2.2.6 Исследование деградации долговременных форм гербицидных препаратов в лабораторных почвенных микрэкосистемах	40
2.2.7 Анализ почвенной микрофлоры	40
2.2.8 Технология выращивания высших растений в лабораторных условиях.....	42
2.2.9 Измерение фотосинтетической активности высших растений	43
2.2.10 Количественное определение хлорофилл-белкового комплекса растений.....	44
2.2.11 Технология выращивания овощных и зерновых культур в открытом грунте	44
2.2.12 Статистическая обработка экспериментальных данных.....	46
ГЛАВА 3. Синтез ПГА – разрушаемой основы для конструирования долговременных форм гербицидных препаратов.....	47
3.1 Синтез и характеристика разрушаемых полимеров	47
3.2 Конструирование и исследование долговременных гербицидных препаратов, депонированных в разрушаемую смесовую основу П(ЗГБ)/ природные материалы	51

3.3 Исследование деградации депонированных форм гербицидов в лабораторных почвенных микрэкосистемах	57
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	72
ГЛАВА 4 Исследование биологической эффективности экспериментальных форм препаратов гербицидного действия в лабораторных условиях	73
4.1 Сравнительное исследование эффективности подавления сорных растений различных видов свободными и депонированными формами гербицидов.....	73
4.2 Сравнительное исследование эффективности действия свободных и депонированных форм гербицидов в лабораторных посевах зерновых культур, зараженных сорняками	79
4.3 Исследование функциональной активности фотосинтетического аппарата высших растений и нарушений в синтезе хлорофилл-белковых комплексов под воздействием гербицидов	85
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	92
ГЛАВА 5 Исследование эффективности применения депонированных гербицидных препаратов в полевых условиях.....	94
5.1 Характеристика условий выращивания культур в полевых условиях.....	94
5.2 Исследование эффективности применения депонированных гербицидов в зерновых культурах в полевых условиях.....	98
5.3 Исследование эффективности применения депонированных гербицидов в овощных культурах в полевых условиях.....	108
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Традиционное повсеместное применение продуктов химического синтеза, включая химические пестициды и синтетические не разрушаемые полимеры, получаемые из не возобновляемых природных ресурсов, приводит к чрезмерному росту количества не утилизируемых отходов. Это вступает в противоречие с мероприятиями, направленными на защиту окружающей среды и создает глобальные экологические проблемы, для решения которых, наряду с традиционными технологиями и средствами, все большее значение приобретают технологии, препараты и материалы, получаемые в процессах биотехнологии.

Масштабное применение химических средств защиты растений, без которых невозможно современное растениеводство, сопровождается экологическими проблемами. Химические пестициды не специфичны, основная их масса аккумулируется в биологических объектах, нарушая равновесие в природных экосистемах, загрязняет почвы, водоемы, воздух (Davoren и Schiestl 2018; Manfo et al., 2019; Smith et al., 2019). Это вызывает необходимость в разработке средств защиты растений нового поколения для снижения пестицидного пресса на природные экосистемы и окружающую среду в целом. Новейшее направление исследований ориентировано на разработку пестицидных препаратов с контролируемым выходом активного начала за счет использования биоразрушаемых материалов, которые разрушаются в почве под воздействием почвенной микрофлоры до безвредных продуктов и обеспечивают постепенный и длительный выход препаратов в почву (Tleuova et al., 2020; Rakhimol et al., 2020; Fraceto et al., 2020). Ключевой проблемой для создания таких препаратов является поиск и применение адекватного биоразрушаемого полимерного материала.

Объемы выпуска синтетических пластиков превысили 380 млн. тонн в год; их основная часть (свыше 80 %) скапливается на свалках, загрязняет почвы, аккумулируется в Мировом океане, вызывая масштабное загрязнение окружающей среды, нарушение стабильности и структуры природных экосистем и угрожая здоровью человека (Geyer et al., 2017). Ценным продуктом биотехнологии являются полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА) – разрушаемые полимеры, синтезируемые прокариотами в специализированных условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного депо энергии и углерода (Laycock et al., 2013; Zheng and Suh, 2019; Chen et al., 2016; Koller and Mukherjee, 2020; Volova et al., 2013; 2020). По физико-химическим свойствам ПГА сходны с синтетическими полиолефинами; устойчивость к УФ-лучам, отсутствие гидролиза в жидких средах, термопластичность позволяют перерабатывать ПГА в специализированные изделия

доступными способами из различных фазовых состояний (Tarrahi et al., 2020). Эти полезные свойства в сочетании с разрушаемостью и высокой биологической совместимостью выдвигают ПГА в разряд наиболее перспективных материалов XXI века для применения в различных сферах, – от фармакологии и биомедицины до коммунального и сельского хозяйства (Sudesh and Abe, 2010; Volova et al., 2014; 2020; Tarrahi et al. , 2020). Несмотря на то, что использование ПГА для депонирования пестицидов начато сравнительно недавно, полученные результаты позволяют говорить о высоком потенциале этих биополимеров для создания средств защиты растений нового поколения (Kwiecien et al., 2018; Zhu et al., 2018; Khan et al., 2020; Chen et al., 2021).

Однако широкое применение ПГА в сельском хозяйстве, а также в технических областях наталкивается на экономические ограничения в связи с все еще высокой стоимостью. Поэтому в диссертационной работе формулируется инновационное направление применение ПГА для конструирования долговременных и адресных гербицидных препаратов не в чистом виде, а в композиции с доступными природными материалами, играющими роль наполнителя. Этот подход отвечает актуальной концепции индустриальной экологии и «зеленой» химии (Qaiss et al., 2015), направлен на получение композитных материалов с новыми свойствами и открывает возможности для повышения доступности ПГА.

Цель работы и задачи исследования.

Цель работы - синтез биоразрушаемого поли-3-гидроксibuтирата и исследование потенциала для конструирования и применения депонированных гербицидных препаратов длительного действия.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Синтезировать и исследовать физико-химические свойства поли-3-гидроксibuтирата [П(ЗГБ)] с использованием в качестве С-субстрата глицерина – крупнотоннажного отхода производства биодизеля.
2. Сформировать смеси П(ЗГБ) с природными материалами (торф, глина, древесные опилки) в качестве разрушаемой основы для депонирования гербицидов; сконструировать и исследовать экспериментальные долговременные формы препаратов гербицидного действия, предназначенные для довсходового грунтового применения.
3. Исследовать закономерности разрушаемости депонированных гербицидов в почве, выхода действующих веществ и влияния на структуру почвенного микробиоценоза и спектр первичных деструкторов.
4. Исследовать гербицидную активность и повреждающее действие депонированных гербицидов метрибузина и трибенурон-метила в лабораторных культурах сорных растений различных видов и посевах зерновых культур, зараженных сорняками по

результатам регистрации динамики гибели, функциональной активности фотосинтетического аппарата и хлорофилл-белковых комплексов сорных растений.

5. Исследовать эффективность применения долговременных форм гербицидных препаратов в полевых экспериментах и влияние на показатели роста и развития зерновых (пшеница, ячмень) и овощных культур (томаты, свекла столовая), структуру урожая и качество продукции.

Научная новизна. В культуре бактерий *Cupriavidus necator* B10646 синтезированы и охарактеризованы партии разрушаемого поли-3-гидроксibuтирата (ПЗГБ) с использованием глицерина в качестве С-субстрата, повышающего доступность полимера; сформированы и исследованы смеси П(ЗГБ) с природными материалами наполнителями (торф, глина, древесные опилки). Сконструированы и исследованы гербицидные препараты длительного действия депонированием в разрушаемую основу поли-3-гидроксibuтират/природные материалы в виде гранул и прессованных таблетированных форм. Смешение полимера с природными материалами и гербицидами сопровождается аморфизацией и снижением степени кристалличности полимера до 47-60% в зависимости от состава компонентов в форме без негативного влияния на биологическую активность гербицидов. Депонированные гербициды представляют собой долговременные формы с периодом полураспада в почве от 60 до 80 суток в зависимости от геометрии и состава формы и не оказывают негативного действия на структуру почвенного микробиоценоза. Результаты регистрации динамики гибели и подавления фотосинтетической активности сорняков показали, что депонированные гербициды обладают высокой биологической активностью (от 60 до 100%) в зависимости от механизма действия гербицида и видовой специфики сорняков. В лабораторных и микрополевых экспериментах на примере зерновых и овощных культур показана высокая эффективность применения депонированных форм гербицидов и положительное влияние на рост, развитие и урожайность культур, а также качество получаемой продукции, оцениваемое по химическому составу зерна (белок, клейковина, натура), томатов и корнеплодов (сухие вещества, сахара, витамин С).

Практическая значимость. Долговременные формы гербицидных препаратов на основе П(ЗГБ) в композиции с природными материалами эффективны для подавления сорных растений в зерновых и овощных культурах при довсходовом грунтовым применении и внесении в почву одновременно с семенами; их применение сокращает количество технологических операций в период вегетации культивируемых растений. Депонированные формы гербицидов на основе разрушаемого П(ЗГБ) в сочетании с природными материалами обеспечивают их пролонгированную и адресную доставку растениям без негативного влияния на полезную биоту и окружающую среду, в отличие от традиционного опрыскивания растений растворами гербицидов в течение вегетации. Применение депонированных гербицидов позволяет снизить

нормы их внесения и риск неконтролируемого распространения ксенобиотиков в биосфере. Сформирована научная основа применения биоразрушаемых ПГА для конструирования пролонгированных и адресных препаратов нового поколения для использования в сельском хозяйстве.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Разрушаемый поли-3-гидроксibuтират в смеси с природными материалами наполнителями – основа для конструирования средств защиты культивируемых растений от сорняков.

2. Депонирование гербицидных препаратов на основе П(ЗГБ) обеспечивает их длительное функционирование в почве, постепенное, по мере разрушения полимерной основы, высвобождение действующих веществ и доставку сорным растениям без негативного влияния на почвенный микробиоценоз.

3. Депонированные формы метрибузина и тибенурон-метила обладают высокой биологической активностью, эффективно подавляют сорняки в течение вегетации, способствуя повышению урожайности зерновых и овощных культур.

Работа выполнена в ходе реализации мега-гранта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» по Постановлению Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных организациях высшего образования (VI очередь) № 220 от 09 апреля 2010 г. (соглашения №074-02-2018-328 от 12 мая 2019 г. и №075-15-2021-626 от 08 июня 2021 г.) и поддержана стипендией Корпорации Bayer CropScience (Научная инициатива «БайСтади»).

Апробация работы. Основные положения и научные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на международных конференциях: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив свободный – 2022» (Красноярск, 25-30 апреля 2022 года); Международная научная конференция «Биотехнология новых материалов – Окружающая среда – Качество жизни» (Красноярск, 10–13 октября 2021 года); Конкурс-конференция научных работ молодых ученых Института Биофизики СО РАН (Красноярск, 30 марта 2022 года); XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 12-23 апреля 2021 года); VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 22-26 сентября 2020 года). Исследования О.Д. Колесниковой отмечены наградами: победитель конкурса на премию профессора Сабу Томаса за лучшую научную работу «Prof. Sabu Thomas Best PG Thesis Award 2020»; победитель конкурса научных работ «БайСтади» 2021 г.

Публикации. По результатам исследований опубликовано 9 работ, включая 4 статьи и 5 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад. Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы: формулирование цели и задач исследования, выбор методов исследования, проведение экспериментов с последующим обобщением и анализом полученных результатов, подготовка публикаций и презентаций докладов.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается: большим массивом экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования, их повторяемостью и воспроизводимостью в независимых экспериментах; соответствием теоретических предпосылок с данными, полученными в ходе исследований.

Структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 141 страницах, содержит 52 рисунок и 28 таблиц. Библиография насчитывает 188 источников, из них 23 отечественных и 165 иностранных.

Благодарности. Автор безгранично благодарен своему научному руководителю Воловой Татьяне Григорьевне за помощь в диссертационной работе на всех этапах. Автор благодарит сотрудников базовой кафедры биотехнологии ИФБиТ СФУ за помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов.

Глава 1. Биотехнологические препараты нового поколения для повышения продуктивности сельскохозяйственного производства

Вызовы, с которыми человечество сталкивается сегодня, включают исчерпаемость сырьевых и энергетических ресурсов, возрастающий дефицит пищи, потребность в новых средствах диагностики и лечения, глобальное загрязнение окружающей среды, кардинально не могут быть решены традиционными технологиями и средствами и требуют привлечения новых технологий, препаратов, продуктов и материалов, получаемых в процессах биотехнологии. Одна из ключевых проблем XXI века – это необходимость интенсификации сельскохозяйственных технологий для ликвидации существующего глобального дефицита пищи, в том числе с привлечением процессов и продуктов биотехнологии.

Получение высоких урожаев и снижение потерь, связанных с вредоносностью сорняков и возбудителей заболеваний, возможно только при проведении интегрированной защиты и комплекса мероприятий, среди которых – применение здорового семенного материала, устойчивого к заболеваниям, рациональная агротехника с использованием эффективных пестицидов, а также удобрений, регуляторов роста и др. Большое значение имеют комплексные агротехнические мероприятия (Brasovean et al., 2009), которые включают правильный выбор предшественников посевов конкретных видов растений, изоляцию и уничтожение источников первичной инфекции семенного материала (Cooke et al., 2011), применение устойчивых к болезням сортов (Зотеева, Косарева, 2021), эффективное применение удобрений и химических средств защиты (Сухорученко и др., 2020), очистку хранилищ от источников инфекции и т.п.

На сегодняшний день одним из основных методов борьбы с сорняками, вредителями и возбудителями болезней культивируемых видов является химическая защита растений с помощью разнообразных пестицидов.

1.1 Пестициды и их влияние на окружающую среду и здоровье человека

В настоящее время интенсивное ведение сельского хозяйства немислимо без применения пестицидов. Во всем мире в среднем 37 % потенциального урожая теряется из-за вредителей: 13 % из-за насекомых, 12 % из-за сорняков и 12 % из-за болезней. Объем этих потерь оценивается в 2000 млрд. долларов в год (Oerke, 2005). Однако накопление пестицидов в биосфере через аккумуляцию и концентрирование в трофических цепях биоты агроценозов и природных экосистем создает глобальную экологическую проблему (Каплин, 2007). Только небольшая часть применяемых и вносимых в окружающую среду пестицидов достигает цели;

основная же масса этих веществ вызывает гибель полезных организмов, аккумулируется в биологических объектах, нарушает равновесие в природных экосистемах и биоценозах, загрязняет почвы, водоемы, воздух. Важность проблемы обусловлена тем, что масштабы применения пестицидов огромны, и они непрерывно растут.

Мировой рынок пестицидов приблизился к 60 млрд. долларов, и по некоторым оценкам превысил 3 млн. тонн в год, что составляет около 0,27 кг пестицидов на 1 га всей земной поверхности (Ippolito et al., 2015). При этом до 40 % приходится на гербициды, 17% инсектициды, 10 % фунгициды и 33 % другие биоциды (Popp et al., 2013). Важными сегментами рынка остаются гербициды для зерновых, сои и кукурузы. До 55-70 % общего объема пестицидов приходится на гербициды, которые представляют собой наиболее опасные загрязнители (Каплин, 2007).

Известно более 900 химических соединений, входящих в состав 1300 зарегистрированных продуктов, из которых 31 % составляют гербициды, 21 % инсектициды, 17 % фунгициды, 9 % акарициды и 2 % родентициды. Остальные 20 % продукции включают в себя множество биоцидов для борьбы с улитками (моллюскициды), водорослями (альгициды) и нематодами (нематоциды), а также регуляторы роста растений (6 %), природные или искусственные феромоны (5 %). Кроме того, 610 продуктов, в том числе хлорорганические инсектициды, которые использовали в прошлом, в настоящее время запрещены по причине высокой токсичности, или малой эффективности из-за развития резистентности у организмов-мишеней (Sánchez-Bayo et al., 2011).

Пестициды используют в виде смачиваемых аэрозолей, порошков, эмульсий, дустов и гранул. «Судьба» этих соединений в окружающей среде определяется комплексом физических, химических и биологических факторов. Так, тип почвы, ее минеральный и органический состав, влажность, содержание кислорода и температура влияют на скорость деградации пестицидов, происходящей в результате как окисления, адсорбции, гидролиза и каталитического разложения, так и под воздействием почвенных микроорганизмов.

На практике, как правило, используют значительно большее количество пестицидов, чем необходимо для уничтожения вредителя. Обрабатываемые пестицидами площади весьма значительны, что сопряжено с неизбежными негативными последствиями. Опасность применения пестицидов усугубляется тем, что многие пестициды могут сохраняться в почве месяцами и в течение многих лет, а также тем, что они распространяются далеко за пределы обрабатываемых площадей; не выше 25-50 % пестицидов, распыляемых из самолета, достигает цели, а остальная часть рассеивается вокруг посевов. Применение неопыляемых буферных зон может существенно уменьшить дрейф в прилегающие районы. Так, воздействие аэрозолей на

нецелевые объекты снижается до 41 % для гербицидов, 21 % для инсектицидов и 14 % для фунгицидов по сравнению с последствиями в предыдущие годы (Siebers et al., 2003).

Следует отметить, что ситуация с производством и применением пестицидов в мире, а также в РФ изменяется. Формирование и совершенствование ассортимента химических средств борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур происходит в несколько этапов, связанных с решением проблем защиты растений конкретного периода времени, технических возможностей для их осуществления и требований, предъявляемых к пестицидам по мере развития теоретических основ защиты растений (Сухорученко и др., 2020). Защита полезной биоты, человека и окружающей среды в целом от негативного воздействия химических препаратов является ключевой задачей нормативного регулирования в области современной агрохимии. Правила, регулирующие оборот химических средств защиты растений во многих регионах мира, включая США и страны ЕС, с каждым годом становятся все более строгими. Результат влияния норм регулирования на эволюцию средств защиты растений демонстрируют следующие данные. Если в 1950-х гг. средние нормы внесения химических пестицидов составляли 1200, 1700 и 2400 действующих веществ на гектар (г/га), соответственно, для фунгицидов, инсектицидов и гербицидов, то к 2000-м годам средние нормы внесения этих пестицидов снизились до 100, 40, и 75 г/га соответственно. Эта технологическая эволюция означает, что количество соответствующих действующих веществ, используемых в растениеводстве сегодня, примерно на 95 % ниже, чем в 1950-х годах. Эти данные демонстрируют значительный прогресс в разработке и выведении на рынок новых и более эффективных химических препаратов для защиты растений.

В последние годы отмечается существенный рост применения средств защиты растений в РФ. Так, с 2010 по 2019 гг. увеличение применения пестицидов составило 74,5% (FAOSTAT-<http://www.fao.org/faostat/ru/#data>). Основная причина того, что в России наблюдается существенное увеличение применения пестицидов, заключается в том, что ранее средства защиты растений применялись в количестве, ниже уровня, необходимого для достижения высоких урожаев. Сейчас ситуация меняется в сторону оптимизации технологий и объемов применения препаратов, и многие аналитики отмечают, что Россия обладает значительным потенциалом дальнейшего роста этого показателя. В таблице 1.1 приведены данные о предложении пестицидов за год, которое определяется как складские запасы пестицидов на начало года плюс объем пестицидов, завезенных из-за рубежа или произведенных внутри страны в течение года.

Таблица 1.1 - Объем 2016–2020 гг. и прогноз 2021–2025 гг. предложения пестицидов в РФ (тыс. т; %) (Business Stat, 2021)

Параметр	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025
Предложение (тыс. т)	178,4	206,7	203,4	206,2	239,8	248,1	255,9	268,7	284	297,7
Динамика (% к предыдущему году)	-	15,9	-1,6	1,4	16,3	3,4	3,2	5,0	5,7	4,8

По масштабам применения (40-50 %) и по ассортименту выпускаемых препаратов (около 40 %) гербициды составляют самую обширную группу пестицидов. Связано это с тем, что наибольший ущерб сельскому хозяйству причиняет распространение сорняков. Так, в РФ потери от сорняков в последние годы составляют от 15 до 25 % урожая зерновых культур. (Спиридонов и др., 2004, Накаева и др., 2020). Сокращение объема применения гербицидов и нарушения в комплексе противосорняковых мероприятий, связанные с экономическими трудностями страны, привели к тому, что почти повсеместно наблюдается увеличение засоренности посевов сельскохозяйственных культур, причем 50-70 % посевных площадей засорено в сильной или очень сильной степени.

Снижение урожая на засоренных полях происходит вследствие того, что сорняки отнимают у культурных растений свет, воду, питательные вещества. От затенения сорняками культурные растения особенно страдают в раннем возрасте, когда бурно развивающиеся сорняки опережают развитие культуры. Сорняки потребляют значительное количество воды и питательных веществ. Корневая система некоторых сорняков (марь белая (*Chenopodium album*), щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*), щетинники (*Setaria*), овсюг (*Avena fatua*)) может достигать 2 метров, что позволяет им потреблять огромное количество воды. Одними из самых вредоносных сорняков считаются марь белая (*Chenopodium album*) и щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*). Эти сорняки потребляют в 1,5 -2 раза больше влаги по сравнению с культивируемыми растениями, их транспирационные коэффициенты выше в 2-3 раза (Накаева и др., 2020).

Помимо прямого снижения урожая, увеличиваются затраты на обработку почвы, возникает необходимость создания машин для борьбы с сорняками, увеличиваются затраты на очистку семян от семян сорных растений. Сорняки также являются источниками многих болезней зерновых культур. Например, пырей ползучий (*Elytrigia repens*) способствует поддержанию популяции проволочника, сорняки из семейства крестоцветных (пастушья сумка (*Capsella*) и горчица полевая (*Sinapis arvensis*)) являются резерваторами грибковых заболеваний, таких как мучнистая роса и белая плесень. Некоторые сорняки являются

ядовитыми (чистотел большой (*Chelidonium majus*), звездчатка злаковая (*Stellaria graminea*), лютики (*Ranunculus*)) и могут причинить вред здоровью человека и животных. Проблема контроля численности сорняков особенно актуальна в современных условиях. Одним из основных способов борьбы с нежелательной засоренностью посевов это применение химических агентов – гербицидов (Li et al., 2006). Применение гербицидов ведет к снижению засоренности посевов, что положительно сказывается на урожайности культурных растений (Серёгин и др., 2009; Sun et al., 2018).

На сегодняшний день существует огромное количество гербицидных препаратов, которые подразделяются на различные классы. По характеру действия гербициды подразделяются на две группы: сплошного и избирательного действия. Первая группа поражает все растения, вторая группа – отдельные виды и в определенных дозах безопасна для других видов. По воздействию на поражаемые растения гербициды подразделяются на контактные и системные. Контактные гербициды применяют непосредственно на вегетативные части растения, а системные гербициды способны передвигаться по сосудистой системе попадая в растение через корни или наземные органы. По срокам применения гербициды подразделяются на три группы: предпосевные, довсходовые и послевсходовые. Исходя из природы и механизма действия, гербициды подразделяются на следующие группы: гербициды, разрушающие клеточные мембраны, применяющиеся только после появления всходов сорняков, так как они слабо передвигаются в растениях и обладают слабой гербицидной активностью в почве (бипиридины, дифенилэфиры); гербициды, ингибирующие растительные ферменты, ответственные за синтез аминокислот (сульфонилмочевины, имидазолины); гормоноподобные гербициды (или синтетические ауксины), которые представляют собой синтетические регуляторы роста, копирующие растительные гормоны (феноксипропионовые кислоты, бензойные кислоты); гербициды – ингибиторы синтеза жиров, принадлежащие к разным химическим классам (циклогександиолы, бензофураны); гербициды нарушающие течение световых реакций фотосинтеза у растений, ингибиторы фотосинтеза (триазины, триазины); гербициды, ингибирующие синтез пигментов, необходимых для фотосинтеза, в основном каротиноидов и хлорофиллов (циклогександиолы, флуорохлоридон); гербициды, угнетающие рост проростков, (динитроанилины и хлорацетамиды) (Филиппов и Немченко, 2016; Куликова и Лебедева, 2010).

Среди современных гербицидных препаратов – производные сульфомочевины различного ареала и персистентности; феноксипропионовой и феноксипропионовой кислот, эффективные против широкого круга сорняков, в том числе однодольных. Важной группой гербицидов широкого действия являются препараты глифосат и глифосинат, разлагающиеся в почве до CO_2 , H_2O и фосфорной кислоты. Ряд гербицидов – производных акрилоксифеноксипропионовых кислот, выпускаемых в виде индивидуальных оптических

изомеров, позволяет существенно уменьшить расход препаратов (Серёгин и др., 2009). Еще одним перспективным классом среди гербицидов считаются ингибиторы фотосинтеза. Ингибиторы фотосинтеза нарушают течение световых реакций фотосинтеза, с помощью которых растения преобразуют солнечную энергию в химическую. Большинство ингибиторов фотосинтеза токсичны больше для двудольных, чем однодольных сорняков. Однако ряд гербицидов этого класса обладает также высокой токсичностью и по отношению к злаковым сорнякам. Значительное место среди ингибиторов фотосинтеза занимают производные триазинов и триазинонов, для которых характерны широкий спектр действия, избирательность и не слишком выраженная персистентность в почве. На практике чаще всего применяются метрибузин и атразин. Метрибузин входит в состав гербицидов «Зино», «Лазурит» и «Зенкор», выпускаемых в виде 70% СП. Рекомендованы для борьбы с однолетними двудольными и злаковыми сорняками в посадках томатов, картофеля, розы эфиромасличной, люцерны 2-го года вегетации (Куликова и Лебедева, 2010).

Несмотря на положительные результаты использования пестицидов в сельском хозяйстве, их применение также влечет за собой пагубные последствия для окружающей среды и здоровья человека (Chhira et al., 2017; Yadav et al., 2017). Пестициды занимают уникальное положение среди загрязняющих веществ окружающей среды благодаря своей высокой биологической активности и токсичности. Современная борьба с сельскохозяйственными вредителями часто приводит к потере 90 % применяемых пестицидов из-за различных факторов, негативно влияющих как на финансовое положение фермеров, так и на экосистему (Ghormade et al., 2011). Большинство пестицидов не проводят различия между вредителями и другими подобными случайными формами жизни. При неправильном использовании они потенциально вредны для людей, животных, и других живых организмов окружающей среды (Lee et al., 2011; Lobo et al., 2011; PAN, 2012; Roy et al., 2014; Singh et al., 2013; Mineau and Whiteside, 2013). Пестициды репротоксичны (Manfo et al. 2019) и тератогенны (Patel and Sangeeta 2019), обладают эпигенетической активностью (Kubsad et al., 2019), влияют на гуморальный иммунитет (Li et al., 2019); увеличивают долгосрочный риск онкологических заболеваний (Davoren и Schiestl, 2018).

Широкое применение пестицидов создает многочисленные источники загрязнения в окружающей среде. Практически невозможно ограничить распространение пестицидов в окружающей среде. Даже при обработке небольшой площади, пестициды распространяются в воздухе, впитываются в почву или растворяются в воде и в конечном итоге достигают гораздо большей территории (Иванцова, 2013). Пестициды, которые наносятся непосредственно на почву, могут быть смыты и достигают близлежащих поверхностных водоемов через

поверхностный сток или могут просачиваться через почву в нижние слои почвы и грунтовые воды (Jallow et al., 2017; Sasso et al., 2021).

Воздействие пестицидов на экологическую систему может варьироваться от незначительных отклонений до потери видового разнообразия (Pazikowska-Sapota et al., 2020). Инсектициды, применяемые для уничтожения вредителей, негативно влияют на нетаргетные организмы, такие как дождевые черви, естественные хищники и опылители. Например, карбаматные инсектициды очень токсичны для дождевых червей, а некоторые органофосфаты, как было показано, уменьшали популяцию дождевых червей (Edwards et al., 1987). Уничтожение этих естественных хищников может усугубить проблемы с вредителями. Кроме того, пестициды могут также влиять на поведение хищников и их жизненные параметры, включая скорость роста, время развития и другие репродуктивные функции. Большая часть нецелевых пестицидов из сельского хозяйства и других источников накапливается в почве и негативно влияет на ее свойства и почвенную микрофлору (Hussain et al., 2009). Деградируемые пестициды взаимодействуют с почвой и ее коренными микроорганизмами, изменяя тем самым ее микробное разнообразие, биохимические реакции и ферментативную активность (Munoz-Leoz et al., 2011). Любое изменение микробного разнообразия и почвенной биомассы в конечном итоге приводит к нарушению почвенной экосистемы и потере плодородия почвы (Hussain et al., 2009). Применение пестицидов может отрицательно влиять на жизненно важные биохимические реакции почв, включая азотфиксацию, нитрификацию и аммонификацию, активируя/деактивируя специфические почвенные микроорганизмы и/или ферменты (Hussain et al., 2009; Munoz-Leoz et al., 2011).

Чрезмерное и неконтролируемое использование пестицидов стало мощным фактором искусственного отбора, ведущего к изменению генетического состава вредителей и увеличению численности устойчивых вредителей и сорняков. Известно около 270 видов сорняков, устойчивых к гербицидам, порядка 150 возбудителей болезней растений, устойчивых к фунгицидам, и более 500 видов насекомых приобрели устойчивость к инсектицидам (De et al., 2014).

Таким образом, экологические последствия от применения пестицидов связаны с их высокой токсичностью. Недостатками химических пестицидов являются: фитотоксичность (сдерживает рост растений и начало плодоношения); опасность опадения завязи; снижение устойчивости растений к возбудителям болезней; формирование специфической групповой устойчивости популяций вредных организмов к химическим пестицидам; загрязнение окружающей среды; непредвиденное взаимодействие остатков различных химических препаратов в почве; уничтожение полезной энтомофауны и, как следствие, вспышки

размножения вредителей, не имевших ранее экономического значения; негативное влияние на насекомых-опылителей.

Перечисленные обстоятельства и высокая экономическая затратность химической защиты вызывают необходимость разработки новых и экологически безопасных средств и способов для снижения пестицидного пресса как на собственно возделываемые сельскохозяйственные культуры, так и на природные экосистемы и окружающую среду в целом.

Пестициды должны соответствовать следующим основным требованиям (Агроэкология, 2000): характеризоваться умеренной персистентностью в окружающей среде; иметь низкую токсичность для человека, животных и других полезных организмов; относительно быстро разлагаться в почве, воде, атмосфере и в организмах теплокровных животных без образования токсичных продуктов; не накапливаться в организме человека, животных, птиц, гидробионтов; не приводить к отдаленным негативным последствиям при длительном применении.

1.2 Современные биотехнологические подходы в области создания гербицидных препаратов нового поколения

Традиционное применение сельскохозяйственных препаратов вступило в явное противоречие с глобальной проблемой защиты окружающей среды. Это вызывает необходимость поиска других, более эффективных средств и методов защиты, не оказывающих отрицательного воздействия на человека и окружающую среду в целом.

В настоящее время получают развитие исследования, направленные на разработку принципиально новых средств защиты растений, среди которых – биологические препараты и препараты, разрабатываемые с применением методов и продуктов биотехнологии. Значимым трендом рынка является рост сегмента средств защиты растений биологического происхождения, которые, в отличие от химических средств защиты, представляют собой живые объекты или естественные биологически активные соединения, синтезируемые живыми организмами. Преимущества биопестицидов - высокая длительность действия, отсутствие аккумуляции в растениях, отсутствие привыкания к ним вредителей, обладание способностью расщеплять растительные остатки, повышение иммунитета у растений.

Биопестициды – это биологические средства защиты растений, которые в отличие от химических, представляют собой живые объекты или естественные биологически высокоактивные химические соединения, синтезируемые живыми организмами (Thakur et al., 2020). В основе биологической регуляции численности сорняков лежит конкуренция между сорным растением и его естественным врагом (Kumar et al., 2021). Наиболее широко для

защиты зерновых культур от болезней применяют препараты на основе грибов родов *Trichoderma* и *Penicillium*, живых культур и продуктов жизнедеятельности бактерий pp. *Bacillus*, *Streptomyces* и *Pseudomonas*. В настоящее время биопестициды охватывают лишь 2 % средств защиты растений, используемых во всем мире, однако темпы их роста демонстрируют тенденцию к увеличению в последние два десятилетия. По оценкам, мировое производство биопестицидов составляет более 3000 тонн в год, и этот показатель быстро растет. Во всем мире использование биопестицидов неуклонно растет на 10 % каждый год. Около 90 % микробных биопестицидов получают только из одной энтомопатогенной бактерии - *Bacillus thuringiensis*. Однако биологические препараты не свободны от недостатков, которые влияют на их рыночный успех. Как правило, они не способны уничтожить популяцию вредителя или патогена полностью, а только снижают их вредоносность; скорость действия биологических средств защиты растений, как правило, ниже химических; биологическая эффективность применения зависит от условий среды (температуры, влажности); их применение требует повторных обработок, которые необходимо повторять часто – из-за дождей, высокой освещенности, колебаний температуры. Таким образом, трудоемкость технологий получения биопрепаратов и высокая стоимость сдерживают широкое применение, которое имеет место главным образом за рубежом. В РФ такие препараты - в основном в стадии исследований, разработки и испытаний; их применение ограничено.

Другим актуальным и развивающимся направлением исследований является разработка и применение в сельском хозяйстве препаратов нового поколения с контролируемым выходом активного начала за счет использования для депонирования биоразрушаемых материалов, которые разрушаются в почве под воздействием почвенной микрофлоры до безвредных продуктов и обеспечивают постепенный и длительный выход действующих веществ в почву. Преимущества таких форм включают: пролонгированное действие препаратов, сокращение количества обработок, продление активности нестабильных пестицидов, снижение токсичности для биоты и возможности накопления пестицидов в трофических цепях, преобразование жидких форм в твердую, что делает безопасным их применение и облегчает транспортировку (Tleuova et al., 2020; Volova, 2020b).

Актуальное направление – это разработка и применение микрокапсульных форм пестицидов, используемых в виде водных дисперсий, эмульсий микрогранул для опрыскивания вегетативных органов растений или протравливания семян. Оптимизация подобных пестицидных средств направлена на повышение их стабильности в окружающей среде, повышение эффективности действия по отношению к сорнякам и фитопатогенам, а также снижение токсичности для целевых культивируемых растений и окружающей среды. Преимущества микрокапсульных пестицидов с контролируемым высвобождением

действующих веществ по сравнению с обычными свободными пестицидами, используемыми для опрыскивания посевов в период вегетации, включают (Ashitha et al., 2019, Fernández-Pérez et al., 2005, Kumar et al., 2020): увеличенный срок действия нестойких пестицидов, эффективность пестицидов улучшается за счет лучшего таргетирования, снижение токсичности для нецелевых видов, снижение загрязнения окружающей среды (снижение загрязнения поверхностных и грунтовых вод).

Для разработки подобных форм пестицидов исследуют материалы различного происхождения. В серии публикаций показана принципиальная возможность использования полимера этилцеллюлозы в качестве матрикса для депонирования гербицидов алахлора (Fernandez-Urrusuno et al., 2000) и норфлуазона (Sopena et al., 2005). В работе (Sopena et al., 2005) описана техника получения полимерных микросфер из этилцеллюлозы с инкапсулированным алахлором. Авторы показали, что в зависимости от исходного содержания алахлора в полимерной форме, возможно регулирование скорости оттока активного начала и контролирование роста сорняков.

Известна серия разработок по микрокапсульным формам гербицидов, которые запатентованы: это микрокапсульная форма гербицидов, предназначенная для использования в виде водных дисперсий для опрыскивания листьев растений (патент RU №2407288, МПК A01N47/34, опубл. 10.12.2009 г.); инкапсулированный гербицид алахлор (патенты США: №4280833A, МПК A01N37/18, опубл. 28.07.1981 г. и №4417916 МПК A01N43/48, опубл. 29.11.1983 г.), применение которого более эффективно по сравнению с некапсулированной формой этого препарата в высокой дозе (0,55 кг/га). Создана композиция на основе микрокапсулирования тиокарбаматных гербицидов и фосфорорганических инсектицидов с использованием в качестве капсулы полимочевины. Полимочевина достаточно быстро растворяется во влажной почве, что сопровождается быстрым выходом препарата, поэтому изобретение включает использование защитного коллоида (патент США №4285720, МПК A01N25/28, опубл. 25.08.1981 г.). Микрокапсулы из полимочевины, отличающиеся тем, что в качестве активного вещества содержат ацетохлор в смеси с антидотом (патент RU №2108036, МПК A01N25/28, опубл. 10.04.1998 г.). Недостатки микрокапсульных форм пестицидов - сложность состава, в т.ч. необходимость использования ряда вспомогательных веществ (ПАВы, эмульгаторы и др.), длительность изготовления, а также применение в виде эмульсий и дисперсий для опрыскивания посевов культурных растений – представляют опасность для полезной биоты и сельхозработников.

Более перспективной представляется разработка депонированных форм, предназначенных для грунтового дождевого применения. Ключевую роль в создании таких долговременных препаратов играет материал, используемый в качестве носителя. Среди

таковых исследуются: альгинат (Ashitha et al., 2019), смеси альгината с глиной (Fernández-Pérez et al., 2005; Macedo et al., 2019; Melo da Costa et al., 2021) и 2,6-дихлорбензонитрилом (Connick., 1988), поливиниловый спирт (Jabrail et al., 2019), древесный уголь в композиции с альгинатно-глинистыми смесями (Pepperman, 1991), глина (Granetto et al., 2022), целлюлоза (Nörnberg et al., 2019; Mendes et al., 2020), составы на основе сепиолита (del Carmen Galán-Jiménez, et al., 2020), карбоксиметилцеллюлозы и крахмала (Wilpiszewska et al., 2016), хитозан в смесях с альгинатом и бентонитом (Rashidipour et al., 2019; Mujtaba, 2020).

Таким образом, различные материалы с большим или меньшим успехом позволяют получить микронизированные формы пестицидов. Однако по большей части в публикациях описаны способы получения микрочастиц и микрокапсул, нагруженных пестицидами, а также результаты изучения выхода действующих веществ в модельных системах *in vitro*. При этом следует отметить, что результатов оценки эффективности подавления сорных растений и применения таких форм в культурах растений в лабораторных и тем более в полевых условиях крайне мало.

В работе (Salac et al., 2019) сополимеры гликолевой и молочной кислот использованы для создания полимерных микро - и субмикронных частиц с различной нагрузкой гербицида метазахлора, исследована кинетика выхода препарата в почве в зависимости от нагрузки и показана эффективность применения против целевых растений (полевой мак и трава коровника) и нецелевых растений (горчица и рапс). Напротив, в работе (Rychter et al., 2019) сополимер поли(лактид-со-гликолид) из-за медленной деградации в почве не рекомендован для депонирования гербицидов; но добавление к этому сополимеру поли(этиленгликоля), который повышает гидрофильность сополимера, ускорило гидролитическое и ферментативное разрушение микрочастиц, нагруженных метазахлором и пендименталином и обеспечивало 100% подавление в лабораторных условиях различных сорных растений (галинзоки мелкоцветной (*G. parviflora Cav.*), мари белой (*C. album L.*) и щавеля кислого (*R. acetosa L.*)).

В работе Akmal и соавторов (2015) представлены результаты микрокапсулирования 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д) с использованием микрокапсул поли(ε-капролактона), нагруженных атразином, которые оказались высокоэффективны для подавления проростков череды волосистой (*Bidens pilosa*) (Preisler et al., 2019; Sousa et al., 2018). Показано, что микрокапсулы на основе поликапролактона обеспечивают сохранность депонированного метрибузина в течение 60 дней, повышая биологическую активность гербицида по отношению к целевому растению *Portulaca oleraceae* (Diyanat and Saeidian, 2019). В работе (Kumar et al., 2010) исследован метрибузин, депонированный в основу из поливинилхлорида, карбоксиметилцеллюлозы и композита карбоксиметилцеллюлоза-каолинит; депонированный гербицид обладал высокой (76,1%) активностью и подавлял сорняки в посевах пшеницы в

течение 90 дней. Еще в одной работе (Taban et al., 2020) показана возможность использования ряда природных полимеров (арабской камеди/желатина, яблочного пектина, желатина) для инкапсулирования эфирного масла чабера (*Satureja hortensis L.*) в качестве природного гербицида и показана высокая биологическая эффективность применения в посадках томата (*Lycopersicon esculentum Mill.*) и амаранта (*Amaranthus retroflexus L.*). Суперабсорбирующие полимеры, синтезированные с использованием отходов кожи, акриловой кислоты и хлорида диметилдиаллиламмония, исследованы для депонирования гербицидов и их контролируемого выхода с целью улучшения эффективности (Xu et al., 2020).

В качестве носителя гербицидов исследованы ковалентные органические и неорганические каркасы, которые обладают высокой стабильностью и высокой адсорбционной способностью. Нанокompозит на основе бромид аэтидия использован для депонирования квинхлорака; полученный препарат обладал высокой гербицидной активностью против ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli*) (Deng et al., 2020). Однако применение подобных форм на основе металлов в сельском хозяйстве ограничено в связи с имеющимися данными об их токсичности для человека и окружающей среды (Singh et al., 2020).

Недостаток микронизированных пестицидных средств, используемых в виде суспензий или эмульсий из смесовых композиций микрочастиц или микрокапсул, прежде всего, заключается в сложном составе композиций, многоэтапности и сложности изготовления. Применение таких форм в виде суспензий или эмульсий для опрыскивания вегетативных частей растений с целью подавления негативных агентов не безопасно для полезной биоты, здоровья людей и окружающей среды в целом. При обработке вегетативных частей растений суспензиями или эмульсиями микронизированных композиций возникает ряд серьезных проблем, связанных с быстрым высвобождением действующего вещества, что снижает эффективность его действия и требует внесения повторных и больших доз. Использование таких микронизированных композиций для обработки и протравливания семенного материала также имеет недостатки, так как возможно снижение всхожести семян, подавление развития корневой системы культивируемых растений и роста рассады, а также весьма быстро исчерпывающийся биологический эффект, что делает необходимым применение дополнительной (повторной) обработки вегетативных органов растений.

Еще один из исследуемых в настоящее время вариантов применения депонированных пестицидов с контролируемым выходом действующих веществ – это использование принципа применения мульчирующих пленок, нагруженных препаратами. Мульчирование почвы является эффективным методом борьбы с патогенными микроорганизмами и сорняками, способствующим уменьшению количества используемых пестицидов. Полагают, что известная технология внесения органических удобрений с последующим мульчированием почвы

полимерными пленками может быть перспективным вариантом борьбы с сорняками, а также болезнями культивируемых растений, передаваемыми через почву (Núñez-Zofío et al., 2011). При таком подходе важно применение пленок из биоразлагаемых материалов, которые разрушаются в почве до безвредных продуктов и не наносят вреда окружающей среде (Sander, 2019), например карбоксиметилцеллюлозы, хитозана, полимолочной кислоты, и при этом в результате выхода действующих веществ по мере разрушения пленок контролируют развитие фитопатогенных грибов в почве. В работе (Khan et al., 2020) конъюгат 2-метил-4-хлорофеноксисукусной кислоты (МСРА) и разрушаемого биополимера из семейства микробных ПГА смешивали с биоразлагаемым поли(бутилен-адипат-терефталат/полилактидом) и использовали в качестве мульчирующей пленки в контролируемых условиях теплицы и горшечных экспериментах с растением фасоль обыкновенная (*Vicia faba*). Показано, что значительное количество гербицида высвободилось из биоразлагаемой пленки и подавило развитие нескольких видов широколистных сорняков даже при концентрации МСРА 1%. Однако более высокие концентрации гербицида (5; 7,5 и 10 %) отрицательно влияли на физиологические параметры роста и развития фасоли. В работе (Liang et al., 2020) описаны смесовые пленки для мульчирования из различных пропорций хитозана и гидроксипропил-метилцеллюлозы, нагруженные металаксилем. Скорость высвобождения металаксила в течение 72 ч составила 70,6 %, пленки подавляли развитие фитофтороза в лабораторных опытах, уровень заболеваемости растений сои составил 13,3 %. В работе (Wang et al., 2021) описана серия композитных пленок, полученных из поли(виниловый спирт)-крахмала для покрытия 2,4-дихлорофеноксисукусной кислоты (2,4-D). Сниженная скорость высвобождения была достигнута за счет композитной пленки, содержащей 2,4-D с глиной, монтмориллонитом натрия и альгинатной ионно-сшивающей структурой.

Ключевым моментом для создания экологически безопасных препаратов является наличие материала, используемого в качестве матрикса, обладающего специальными свойствами, среди которых обязательными являются биоразрушаемость, безопасность для живой и неживой природы, длительная (недели и месяцы) сохраняемость в природной среде, контролируемая деструкция с образованием нетоксичных продуктов, возможность переработки доступными способами, совместимость с депонируемыми препаратами.

1.3 Разрушаемый поли-3-гидроксibuтират – целевой продукт биотехнологии

Гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксibuтират, П(ЗГБ)) – это самый распространенный, выпускаемый в наибольших промышленных масштабах, а также активно изучаемый представитель семейства разрушаемых микробных полимеров, т.н.

полигидроксиалканоатов (ПГА). Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются резервными макромолекулами клеток (депо энергии и углерода) и синтезируются прокариотами в специфических условиях несбалансированного роста, когда синтез основных соединений (белка и нуклеиновых кислот) ограничен, но при избытке углерода в среде. Специфика образования ПГА – это сугубо биологический внутриклеточный синтез, реализуемый бактериями на различных углеродных субстратах. ПГА – это разрушаемые полимеры микробиологического происхождения, деградируемые естественной природной микрофлорой до CO_2 и H_2O , не нанося вреда биоте и окружающей среде в целом (Sudesh et al., 2010; Volova, 2004; Volova et al., 2013; Chen et al., 2016). ПГА синтезируют прокариоты на различных субстратах, включая отходы (Kumar et al., 2021).

В зависимости от набора и соотношения мономеров в С-цепи, базовые свойства ПГА (кристалличность, температурные и молекулярно-массовые характеристики, скорости биораспада) значительно варьируют, что позволяет получать изделия с различными физико-механическими характеристиками (Laycock et al., 2013; Zheng et al., 2020; Volova et al., 2020b). Свойства (устойчивость к УФ-лучам, отсутствие гидролиза в жидких средах, термопластичность) позволяют перерабатывать ПГА в специализированные изделия доступными способами из различных фазовых состояний (растворы, эмульсии, порошки, расплавы) (Zhang et al., 2019; Dwivedi et al., 2020; Tarrahi et al., 2020). Из полигидроксиалканоатов возможно получение широкого спектра изделий (пленок, мембран, волокон, пористых матриксов, микрочастиц) различными способами, так как эти полимеры можно перерабатывать различными методами из расплавов, холодным прессованием, поливом из растворов, гель-технологиями и др.

ПГА были обнаружены сравнительно недавно. Первым из этого семейства полимеров был идентифицирован поли-3-гидроксибутират П(ЗГБ). В течение последующих 30 лет особого интереса этот внутриклеточный метаболит не вызывал. И только после появления в 1958 г. первой работы по физиологической роли этого полимера к данному соединению возник интерес. После этой публикации в течение последующих 40 лет разворачивались всесторонние исследования природы процесса аккумуляции поли-3-гидроксибутирата различными микроорганизмами. Было установлено, что П(ЗГБ) синтезируют с различными выходами многие прокариотические микроорганизмы на различных субстратах.

Существуют различные микроорганизмы из грамотрицательных и грамположительных бактерий, которые могут накапливать ПГА в качестве запаса энергии, включая таксоны *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*), *Corynebacterium*, *B. circulans*, *B. thuriangiensis*, *Micrococcus sp.* и *Burkholderia sp.* Каждый микроорганизм производит ПГА различного мономерного состава,

который зависит от типа потребляемого источника углерода (Ratnaningrum et al., 2019). Среди различных продуцентов ПГА - *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas spp.* и *Bacillus spp.* получили наибольшее внимание благодаря своей способности расти до высокой плотности клеток и производить сополимеры малой длины цепи (ПГА_{кц}) и средней длины цепи (ПГА_{сц}) из широкого спектра субстратов (Kalia et al., 2021). *Cupriavidus* накапливает до 85 % клеточной биомассы в качестве П(ЗГБ) в условиях ограничения питательных веществ (Angra et al., 2022). Различные типы экстремофилов, к которым относятся галофилы, психрофилы и термофилы широко используются для биосинтеза ПГА. В настоящее время *Halomonas* широко используется для производства поли-3-гидроксибутирата, так как способен накапливать до 70-80 % ПГА при использовании глюкозы в качестве углеродного субстрата. При культивировании на глюкозе бактерий *Halomonas venusta* КТ832796 содержание сухой биомассы и П(ЗГБ) составили 3,52 г/л и 70,56 % полимера, соответственно (Stanley et al., 2020). Использование термофилов для производства ПГА также считается высокоэффективным подходом, так как энергия не тратится на охлаждение и нагрев. *Bacillus thermoamylovorans* штамм РНА005, выделенный из сточных вод завода по производству пальмового масла, способен накапливать до 63,27 % ПГА средней длины цепи (Choonut et al., 2020).

В качестве перспективной альтернативы производству ПГА на основе бактериальных продуцентов, предлагается использовать трансгенные высшие растения. Использование высших растений в качестве продуцентов ПГА крайне заманчиво, поскольку фотосинтез обеспечивает источником углерода и энергии биосинтез полимера, что значительно снижает затраты на субстрат и процесс культивирования микроорганизмов-продуцентов. *Arabidopsis thaliana* - первое растение, в котором был успешно получен поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)). Первоначально П(ЗГБ) продуцировался в цитоплазме с помощью двух ферментов ацетоацетил-КоА-редуктазы и ПГА-синтазы, кодируемых генами *phbB* и *phbC* *Ralstonia eutropha*. *Arabidopsis thaliana* способен накапливать до 14 % П(ЗГБ) от сухой массы (Khan et al., 2021). Генномодифицированный *Camelina sativa* - цветущее растение, относящиеся к семейству *Brassicaceae*, также способно накапливать ПГА (Angra et al., 2022).

Водоросли также могут быть использованы для производства ПГА, поскольку они дают ряд значимых преимуществ. Во-первых, выращивание водорослей очень устойчиво, так как они содержат высококачественные масла, белки и пигменты. Другие преимущества использования водорослей заключаются в том, что они не требуют специальных сельскохозяйственных угодий для выращивания и обладают способностью выживать в различных средах, таких как сточные воды. Первая продукция П(ЗГБ) была замечена у *Chlorogloea fritschii*, который показал накопление около 10 % от сухой клеточной массы (Afreem et al., 2021). Самый высокий выход одноклеточных цианобактерий получен штаммом *Synechococcus sp.* МА19, который

продуцирует около 55 % ПГА (Angra et al., 2022). Нитчатые цианобактерии *Nostoc muscorum* обладают способностью накапливать до 31 % П(ЗГБ-со-3ГВ) при использовании нерафинированного глицерина в качестве источника углерода (Shetye et al., 2022).

ПГА-продуцирующие микроорганизмы используют широкий спектр углеродных субстратов для роста и накопления полимера. Моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза, дисахариды, такие как сахароза, мальтоза, декстроза и др. (Volova et al., 2004).

Жиродержащие субстраты также могут быть использованы в качестве единственного источника углерода для производства ПГА, что позволяет использовать отработанные, малоценные или возобновляемые масла для производства ПГА. На скотобойнях и перерабатывающих производствах образуется большое количество остаточных животных жиров, главным образом в виде свиного сала и жира. Дешевые, обильные отходы животных жиров могут быть использованы в качестве возможной основы роста для производства ПГА (Ganesh Saratale et al., 2021). *Ralstonia eutropha* Re2058/pCB113 способна накапливать до 90 мас.% сополимера поли(гидроксibuтират-со-гидроксигексаноат) при культивировании на гидролизате низкокачественных субпродуктов животного происхождения, содержащих в основном фракцию жира, жирнокислотный состав которого C14–C18 ЖК (Saad et al., 2021). Высокая продукция ПГА на животном жире была продемонстрирована штаммом *Pseudomonas aeruginosa* МН142144 (6,9 г/л) и штаммом *Bacillus tequilensis* МН142145 (14,2 г/л) (Sohail et al., 2020). С использованием низкокачественных отходов животного жира получено 60 мас.% П(ЗГБ-со-3ГГ) рекомбинантным *C. necator* Re2058/pCB113 (Surendran et al., 2020). *Burkholderia ceracia* JC-1 эффективно использует липиды экстрагированного куриного жира для синтеза ПГА с выходом П(ЗГБ) до 1,49 г/л (Chin et al., 2022).

Растительные масла в качестве углеродного сырья имеют много преимуществ по сравнению с другими традиционными источниками углерода (сахарами), в том числе конкурентоспособность по цене и значительно более высокие выходы ПГА. Основными химическими компонентами растительных масел являются триацилглицерины (ТАГ). Чтобы использовать растительные масла в качестве источника углерода, микроорганизмы должны быть способны секретировать липазы, которые гидролизуют ТАГ в жирные кислоты, которые впоследствии через путь β -окисления преобразуются в ПГА (Talan et al., 2020). *Bacillus thermoamylovorans* РНА005 способен утилизировать отработанное растительное масло с выходом ПГА более 80 масс.% (Sangkhak et al., 2021). *Pseudomonas oleovorans* NCIMB 6576 и *Ralstonia eutropha* NCIMB 10442 также используют отработанное растительное масло для синтеза ПГА (Barde et al., 2021). *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1287 эффективно использует пальмовое масло в качестве источника углерода для синтеза ПГА, содержащих четыре смешанных типа мономеров, включая 3-гидроксигексаноат, 3-гидроксиоктаноат, 3-гидрокси-2-

октеноат и 3-гидроксидецеаноат (Tanikkul et al., 2020). Масло хлопкового дерева (*Ceiba pentandra*) использовано для синтеза П(3ГБ-со-ГВ) бактериями *Cupriavidus necator* МТСС 1954 с выходом ПГА 8,51 г/л (Arumugam et al., 2020). Масло из семян каучука использовано для культивирования бактерий *Cupriavidus necator* Н16 с выходом ПГА 15,4 г/л (Pendyala et al., 2019). *Pseudomonas sp.* НЗ утилизирует масла пищевых отходов с выходом ПГА 2,4 г/л (65 мас.%) (Pan et al., 2021). Масла канолы и авокадо использованы для синтеза короткоцепочечного и среднецепочечного ПГА рекомбинантным штаммом *Cupriavidus necator* Н16/pMPJAS03 (Flores-Sánchez et al., 2020). *Burkholderia cepacia* JC-1 утилизирует кокосовое, пальмовое и соевое масла для синтеза П(3ГБ) (Chin et al., 2022).

В поисках способа снижения себестоимости биополимеров исследованы отходы и стоки производства растительного масла, сахара, крахмала, сыра, производства бумаги и биодизельного топлива. Во всем мире производится огромное количество биодизельного топлива, в результате чего образуется глицерин в виде отходов, который можно рассматривать как эффективный источник углерода для синтеза ПГА (Ganesh Saratale et al., 2021). В литературе встречается множество статей по использованию глицерина в качестве единственного С-субстрата. *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 (de Meneses et al., 2020), *Burkholderia sensu lato* (Alvarez-Santullano et al., 2021), *Pseudomonas putida* KT2440 (Borrero-de Acuña et al., 2021), *Paraburkholderia sp.* C3 (Ramírez et al., 2022), *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Corrêa et al., 2021) используют глицерин в качестве единственного источника углерода.

Сырная или молочная сыворотка может быть отличным источником углерода для бактерий, продуцирующих полигидроксиалканоаты. Для утилизации сыворотки чаще всего используют двухстадийный режим ферментации, где на первом этапе лактоза ферментируется бактериями до молочной или уксусной кислоты, а на втором эти кислоты непосредственно используются микроорганизмами для синтеза ПГА (Zandona et al., 2021). В работе Chang с соавторами (2021) в двухстадийном режиме биосинтеза использовали сырную сыворотку в качестве источника углерода. На первом этапе с помощью бактерий *Acetobacter pasteurianus* C1 лактоза сыворотки была преобразована в уксусную кислоту, которая в дальнейшем использовалась для синтеза ПГА на втором этапе с помощью бактерий *Bacillus sp.* CYR1. В другом исследовании в двухстадийном режиме использовали штаммы бактерий *Lactobacillus sp.* (на 1 этапе) и *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374 (на 2 этапе) для синтеза ПГА (до 67 мас.%) из сырной сыворотки (Carlozzi et al., 2021).

Другим перспективным субстратом для производства ПГА является меласса. Меласса, побочный продукт производства сахарозы из сахарного тростника или сахарной свеклы, вырабатывается мировой сахарной промышленностью в объеме 50 млн. тонн ежегодно. Это

недорогой источник углерода, содержащий сахарозу, фруктозу, глюкозу, различные витамины группы В (тиамин, рибофлавин, ниацин, пиридоксин, биотин и фолиевую кислоту), а также минералы (калий, фосфор, кальций, магний, медь и железо) (Ertan et al., 2021). *Bacillus megaterium* (Schmid et al., 2022), рекомбинантный штамм *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599, *R. eutropha* 437-540 (Jo et al., 2021), *Cupriavidus necator* ATCC 25207 (Ertan et al., 2021), *Burkholderia sp.* B73 (Endah et al., 2021) способны использовать свекловичную или тростниковую мелассу в качестве С-субстрата и накапливать до 60-80 % ПГА в клетках.

Существуют три общие стратегии ферментации бактерий с целью получения ПГА: периодическая, периодическая с подпиткой субстрата и непрерывная (Shahid et al., 2021). Для достижения высокой эффективности процесса стратегия культивирования заключается в том, чтобы увеличить массу клеток, обеспечив сначала достаточное количество питательных веществ в среде, а затем ограничив их, за исключением углеродного субстрата. Культивирование с подпиткой субстратом является наиболее распространенным биотехнологическим процессом, включая производство ПГА, благодаря контролю поступления питательных веществ и углерода, что позволяет избежать углеродных ограничений на протяжении всего процесса. Контроль этих условий позволяет повысить эффективность процесса, что приводит к увеличению плотности клеток и накоплению ПГА. Мониторинг и регулирование концентрации субстрата в режиме реального времени, а также корректировка условий в рамках процесса создают проблемы в поддержании стандартизированного воспроизводимого процесса, но контролируют прогнозируемую скорость роста и потребление питательных веществ (Dalton et al., 2022).

ПГА представляют собой структурно разнообразные полимеры, включающие по меньшей мере 150 гидроксикарбоновых кислот с молекулярными массами в диапазоне от 50 до 2000 кДа. Основываясь на размерах их мономеров, ПГА можно разделить на короткоцепочечные (ПГА_{кц}), состоящие из мономеров длиной от двух до пяти атомов углерода (C2-C5), и ПГА со средней длиной цепи (ПГА_{сл}), содержащие мономеры от C6 до C14. (Zheng, Y. et al., 2020). Одним из универсальных свойств ПГА является их термопластичность, другие свойства варьируются в зависимости от их химической структуры (Dalton et al., 2022). Изучены ПГА с линейными мономерными звеньями, разветвленными, ароматическими боковыми цепями, насыщенными и ненасыщенными связями (Shahid et al., 2021). Протяженность боковой цепи мономерного звена наряду с функциональным звеном существенно влияет на характеристики ПГА, такие как, кристалличность, температура стеклования, температура плавления и т.д. Термические свойства, такие как температура стеклования ($T_{стек}$) и температура плавления ($T_{пл}$), наряду с механическими свойствами, такими как предел прочности при растяжении

(МПа) и растяжение до разрыва (%), являются ключевыми для определения целесообразности использования полимеров ПГА для различных практических применений (Dalton et al., 2022).

Температурные характеристики ПГА являются значимыми параметрами, так как определяют их термомеханические свойства. Их температуры плавления колеблются в пределах 30-180 °С (таблица 1.2). Наиболее изученный ПГА, поли(3-гидроксибутират), термические свойства которого подобны полипропилену, является сильно кристаллическим материалом с плохой упругостью. Гомополимер П(ЗГБ) имеет температуру плавления ($T_{пл}$) около 180 °С, близкую к температуре его разложения (Turco et al., 2021); диапазон температуры стеклования составляет от -15 °С до 9 °С в зависимости от структуры П(ЗГБ) и его сополимеров. Температура разложения 210-220°С П(ЗГБ) ограничивает технологичность расплава П(ЗГБ) из-за узкого температурного окна между температурами расплава и разложения. ПГА_{сц} и его сополимеры обладают более низкими термическими свойствами из-за разветвленных и длинных боковых цепей, которые препятствуют тесной упаковке полимерных цепей в кристаллические структуры. ПГА_{сц} имеют значение температуры стеклования в диапазоне от -65 °С до -25 °С. Увеличение содержания от 4 до 7 атомов углерода в боковой цепи ПГА повышает температуру плавления с 45 °С до 69 °С. (Dalton et al., 2022).

ПГА обладают рядом полезных характеристик, таких как: оптическая чистота, влагостойкость и нерастворимость в воде. Это отличает ПГА от существующих разлагаемых пластмасс, которые являются влаголюбивыми. ПГА также обладают гораздо меньшей устойчивостью к воздействию жидкостей и является хорошим естественным барьером от воздействия ультрафиолетового излучения (Shahid et al., 2021). ПГА обладают хорошими газобарьерными свойствами, которые считаются ценными в упаковочном производстве. (Dalton et al., 2022).

ПГА традиционно являются жесткими и хрупкими из-за их высокой степени кристалличности (таблица 1.2). Механические свойства ПГА аналогичны полипропилену, однако меньшее удлинение и высокая жесткость не позволяют полимерам ПГА заменить синтетические пластмассы, такие как полипропилен. Предел прочности на разрыв измеряет величину силы, необходимой для вытягивания материала до тех пор, пока он не разрушится, и его значения обычно лежат в диапазоне от 8,8 до 50 МПа для П(ЗГБ), синтезированного из различных сырьевых материалов. Модуль Юнга представляет собой характеристику жесткости; ПГА_{кц} показывают модуль $3,5 \times 10^3$ МПа. Относительное удлинение при разрыве - это мера способности материала растягиваться до тех пор, пока он не разрушится, которая выражается в процентах от первоначальной длины материала. Процентное удлинение ПГА_{кц} при разрыве колеблется от очень низких значений до 15% и >200% в зависимости от его химической и физической структуры. Хотя П(ЗГБ) обладает плохими пластичными свойствами, добавление

сомономеров, пластификаторов, различных полимеров и наполнителей значительно повышает его относительное удлинение и прочность на разрыв за счет снижения кристалличности полимера. Например, введение сомомера 3-гидроксигексаноата в П(ЗГБ) до 17 мол.% повышало пластичность поли-3-гидроксibuтират-со-3-гидроксигексаноата (Dalton et al., 2022). В целом ПГА_{сц} более гибки и подходят для многих применений, в том числе упаковки пищевых продуктов и тканевой инженерии, где требуются биodeградируемость и биосовместимость (Grigore et al., 2019).

Таблица 1.2 - Характеристики ПГА и полипропилена

Свойства	ПГА _{кц}	ПГА _{сц}	П(ЗГБ-со-ЗГВ)	П(ЗГБ-со-ЗГГ)	Полипропилен
Температура плавления (°C)	80–180	30–80	102–180	110–130	170
Температура стеклования (°C)	от -5 до -20	от -25 до -49	от -8 до -4	от -1 до -2	от -15 до -45
Кристалличность (%)	30–90	20–40	30–70	20–35	50–70
Относительное удлинение на разрыва (%)	2–8	300–555	2.8–100	400–900	400
Плотность (г/см ³)	1.18–1.26	1–1.05	1.16–1.25	-	0.905–0.94
Молекулярная масса (Да)	1×10 ⁴ –3×10 ⁶	1.35–5×10 ⁵	1.7–9.8×10 ⁵	1.9–7×10 ⁵	2–7×10 ⁵

В настоящее время лабораторные исследования все чаще ориентируются на промышленную и коммерческую сферу применения. ПГА могут проявлять различные свойства из-за их огромного разнообразия мономерных компонентов, что делает их пригодным для широкого спектра применений, включая продукты, пригодные для вторичной переработки (Dalton et al., 2022). ПГА используется во многих медицинских сферах: в стоматологии, ортопедии (Pecorini et al., 2022), перевязке ран (Kalaoglu-Altan et al., 2021), кардиологии (Kovalcik et al., 2020), фармацевтике, адресной доставке лекарств и др. (Pandian et al., 2022).

В последние годы биоразлагаемые полимеры, полученные из возобновляемых ресурсов, становятся альтернативными упаковочными материалами для смягчения экологических последствий, вызванных упаковочными отходами. Использование биоразлагаемых материалов в упаковке пищевых продуктов широко распространено, поскольку так же, как и синтетические пластмассы, биоупаковка обеспечивает физическую, механическую, химическую и микробиологическую защиту от внешней среды. Среди многих биополимеров наибольший интерес вызывают полигидроксиалканоаты, которые считаются инертными, гидрофобными, нетоксичными, стабильными на воздухе материалами, что делает их идеальными претендентами для использования в пищевой упаковке. Ряд работ демонстрируют огромный

потенциал использования биопластика в качестве упаковочных изделий (Chilali et al., 2020; David et al., 2021; Gómez-Gast et al., 2022; Gigante et al., 2020; Musioł et al., 2020; Pracello et al., 2021; Smith et al., 2020; Varghese et al., 2020; Yasim et al., 2021).

В сельском хозяйстве ПГА используются в качестве одноразовых горшков и мешков для выращивания растений. В ряде работ получены мульчирующие пленки из смеси поли(бутиленадипата-со-терефталат) / поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) (Wang et al., 2021; Khan et al., 2020), полилактид / полигидроксиалканоат (Anunciado et al., 2021). Ряд немногочисленных работ демонстрирует огромный потенциал использования ПГА в чистом виде и в смеси с другими биоразлагаемыми материалами для контролируемой доставки удобрений и пестицидов. Успешно сконструированы пленки поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) с фунгицидом протиоконазол (Chen et al., 2021), получена смесь поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксигексаноат)/сосудистые пучки масличной пальмы в сочетании с удобрением нитроаммофоска (Mugugan et al., 2020).

Масштабы производства ПГА приближаются к 100 000 тонн в год (Pratt et al., 2019). Однако цена ПГА все еще высока и составляет от 2,0 до 6,5 долларов США/кг в зависимости от способа и объемов производства. Это превосходит стоимость полиолефинов, составляющую порядка 1,0 доллар США/кг. Применение ПГА и, в частности, поли-3-гидроксibuтирата, возможно в двух направлениях. Одно из них - это небольшие производства, предназначенные для выпуска специализированной продукции с высокой стоимостью; второе направление – это крупномасштабное производство ПГА для технических сфер и для выпуска доступных и недорогих изделий (упаковка, тара, бытовые изделия, пленочная и горшечная продукция для тепличных хозяйств и т. п.).

Первым производителем ПГА стала компания Imperial Chemical Industry Biological (ICI), Лондон, Великобритания, которая начала производство П(3ГБ-со-3ГВ) после нефтяного кризиса в 1970-х годах. В этом процессе *Alcaligenes eutrophus* NC 1В использовали в качестве производственного штамма. ICI запустила свой коммерческий производственный завод мощностью 5000 тонн в год и продавала продукцию под торговой маркой BIOPOL™ (в США под торговой маркой PHBV™) по 7-8 долларов США за килограмм. В 2008 году производство ПГА было приостановлено. В настоящее время несколько компаний занимаются производством ПГА и его сополимеров, как в опытном, так и в промышленном масштабе. Большое количество этих компаний расположено в Китае. Компания Tianan производит П(3ГБ-со-3ГВ), торговое название Enmat Y1000™. Компания Green Bio-DSM производит Kaneka П(3ГБ-со-3ГГ). Компания Tianzhu также производит П(3ГБ-со-3ГГ). Другая китайская компания производит П(3ГБ-со-4ГБ) под торговой маркой AmBio™ Shenzhen Ecomann Biotechnology Co. Ltd. Компания Biomer, базирующаяся в Швальбахе, Германия, была одним из первых

промышленных производителей П(ЗГБ), использующих штамм *Azohydromonas australica* (ранее известный как *Alcaligenes latus*) и сахарозу в качестве углеродного сырья (da Cruz Pradella, 2020). Другой компанией, коммерциализирующей гомополиэфир П(ЗГБ), является PNB Industrial S. A. в Бразилии (PNB/ISA). Их продукция BIOCYCLE™ производится в годовом масштабе примерно 50-100 тонн. В этом процессе *C. necator* культивируют в периодическом режиме на гидролизованной сахарозе. Nafigate (Чехия) производит гомополиэфир П(ЗГБ) из отработанного масла для жарки и прибегает к процессу извлечения полимеров с использованием масел, что, как утверждает компания, делает весь процесс примерно на 50% менее энергоемким по сравнению с производством поли(этилена). Newlight Technologies LLC производит гомополиэфир П(ЗГБ) под торговой маркой AirCarbon с использованием диких штаммов микроорганизмов, обнаруженных в океане. Компания Bio-On, расположенная недалеко от Болоньи, Италия, производит П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) для различных применений под торговой маркой Minerv™. Его мощность составляла 2000 тонн в год. PNB Industrial S. A. (PNB/ISA) в Серране, Бразилия, также производит сополиэфир П(ЗГБ-со-ЗГВ) из гидролизованной сахарозы сахарного тростника в дополнение к производству П(ЗГБ). Genesis Bioindustries Inc. производит П(ЗГБ-со-ЗГВ) (Онтарио, Канада) из органических пищевых отходов. В Швеции Bioextraх АВ, основанная в 2014 году как дочернее предприятие биотехнологического факультета Лундского университета, производит П(ЗГБ-со-ЗГВ). Danimer Scientific (Бейнбридж, Джорджия) производит П(ЗГБ-со-ЗГГ) под торговой маркой Meridian РНА с производственной мощностью в 10 000 т в год. Сингапурская и американская компания RWDC Industries Ltd. производит П(ЗГБ-со-ЗГГ) под торговой маркой Solon™ РНА путем переработки отходов кулинарного масла. Также они производят готовую продукцию: соломенные трубочки, кофейные чашки и крышки, одноразовую посуду, пакеты (Koller and Mukherjee, 2020).

1.4 Потенциал микробных полигидроксиалканоатов для конструирования пролонгированных и адресных пестицидных препаратов нового поколения

Относительно разрушаемых полигидроксиалканоатов, следует подчеркнуть, что несмотря на то, что использование ПГА для депонирования пестицидов начато сравнительно недавно, полученные результаты позволяют говорить о высоком потенциале этих биополимеров для создания средств защиты растений нового поколения.

В одной из первых работ по исследованию возможности использования ПГА для депонирования пестицидов (Savenkova et al., 2002) описаны пленочные системы из двух типов ПГА (гомополимера П(ЗГБ) и сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ)), нагруженные фунгицидными

препаратами «Сумилекс» (действующее вещество дициклидин) и «Ронилан» (действующее вещество винклозолин). Депонированные формы гербицидов аметрин и атразин в виде микросфер из П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) были получены в работах (Grillo et al., 2010; Lobo et al., 2011). В работе (Suave et al., 2010) инсектицид мелантион депонирован в микросферы как из чистых П(ЗГБ) и ПКЛ, так и из смесей (поли-3-гидроксипропионат/поли(ϵ -капролактон) с различным соотношением полимеров и исследована кинетика его выхода *in vitro*. Agustien с соавторами (Agustien et al., 2016) разработали форму на основе матрицы из П(ЗГБ), которая обеспечивала медленное высвобождение системного гербицида метсульфурон-метила. Еще один часто используемый гербицид (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота), депонированный в основу из разрушаемого сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) в смеси с полилактидом и поли(адипинат-со-бутилен терефталатом) при различном соотношении компонентов, получен и исследован в работе (Kwiecien et al., 2018). Компания Jiangsu Changqing Agrochemical (Китай) сообщила о создании и начале выпуска высокоэффективного фунгицида феноксанила, депонированного в микрокапсулы из П(ЗГБ), которые показали хорошие характеристики контролируемого высвобождения и снижение токсичности фунгицида для окружающей среды (Zhu et al., 2018). В исследовании Сао и соавторов (2019) обсуждается влияние параметров приготовления микрокапсул с использованием сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ), в который инкапсулировали трифлуралин. Еще одной формой депонированных пестицидных препаратов, разрабатываемой в настоящее время с использованием ПГА, стали мульчирующие пленки, предназначенные для подавления сорняков и заболеваний корневой системы растений (Khan et al., 2020; Chen et al., 2021).

Выполненный анализ публикаций показывает, что представительная серия работ по проблеме создания депонированных пестицидов с использованием ПГА принадлежит сотрудникам Института биофизики СО РАН. С использованием в качестве основы поли-3-гидроксипропионата в различных фазовых состояниях (растворы, эмульсии, порошки) было сконструировано семейство депонированных пестицидов гербицидного и фунгицидного действия, а также азотных удобрений; изучены структура и свойства разработанных форм, закономерности биодegradации в почве и выхода действующих веществ. В лабораторных условиях на примере сорных растений различных видов, культурных растений (салат листовой, редис) и посевов пшеницы, зараженных сорняками и фитопатогенами, показано, что разработанные депонированные в основу из П(ЗГБ) пестициды эффективны по отношению к сорнякам и возбудителям корневых гнилей, и их биологическое действие по силе сопоставимо, а в ряде случаев превосходит эффект при применении свободных форм препаратов. Разработанные формы азотного удобрения существенно сокращают потери азота за счет его

постепенного выхода из форм (Киселев и Барановский, 2016; Boyandin et al., 2017; Shershneva et al., 2019; Volova et al., 2017; Zhila et al., 2017).

Однако нельзя не отметить, что широкое применение ПГА в сельском хозяйстве, а также в технических областях наталкивается на экономические ограничения в связи со все еще высокой стоимостью полигидроксисилканоатов в отличие от узкоспециализированных направлений применения высокотехнологичных изделий в технологиях реконструктивной медицины и тканевой инженерии. При этом следует подчеркнуть ключевую роль материалов, используемых в качестве основы для депонирования пестицидных препаратов, которые должны обеспечивать не только долговременность, адресность и эффективность действия, но также быть доступными по цене.

В этой связи в диссертационной работе формулируется новое инновационное направление - применение для конструирования долговременных и адресных гербицидных препаратов ПГА не в чистом виде, а в композиции с доступными природными материалами, играющими роль наполнителя. Целесообразность применения композитной основы для депонирования пестицидов диктуется несколькими обстоятельствами – необходимостью снижения стоимости и обеспечения доступности препаратов, так как экономический аспект весьма важен для возможности выхода на рынок и массового применения препаратов нового поколения в сельском хозяйстве, а также открывает возможности для получения на основе ПГА семейства композитных материалов с новыми и улучшенными свойствами и пути для регулирования процессов разрушения полимерной основы в почве, выхода действующих веществ и их доставку растениям.

Этот подход отвечает актуальной концепции индустриальной экологии и «зеленой» химии, ориентированный на создание новых экологичных материалов, получаемых в том числе из возобновляемых источников. В настоящее время активизируются исследования, направленные на получение композитов ПГА с различными материалами наполнителями (филерами). Описаны результаты наполнения полигидроксисилканоатов глиной и ее производными, растительными волокнами, лигнином, древесными стружками и опилками (Chan et al., 2019).

Анализ доступной современной литературы не обнаружил публикаций применения ПГА в композиции с природными материалами для конструирования пестицидных препаратов для защиты культурных растений от сорняков и возбудителей болезней. Это определило цель диссертационной работы, направленной на исследование эффективности применения разрушаемого поли-3-гидроксибутирата в смеси с доступными природными материалами для конструирования долговременных и адресных препаратов гербицидного действия.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследований

2.1 Объекты исследований

В качестве продуцента полимеров исследован штамм *Cupriavidus necator* В-10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Штамм обладает широким органотрофным потенциалом и способен в качестве источника углерода использовать сахара, аминокислоты, органические кислоты, спирты и др.; в качестве источника азота использует нитраты, соли аммония, карбамид, аминокислоты (Volova et al., 2004).

2.2 Методы исследований

2.2.1 Питательная среда для культивирования микроорганизмов

Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде при стартовой концентрации глюкозы 5-10 г/л. За основу принята среда Шлегеля, представляющая собой сильный фосфатный буфер следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NH_4Cl (или $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) – 1,0 (г/л). Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводили из расчета 5 мл/л среды. Микроэлементы вносили в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NiCl – 0,008 (г/л). В режиме синтеза ПГА принята лимитирующая рост бактерий концентрация азота 0,4-0,6 г/л (NH_4Cl или $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$).

В качестве С-субстрата использованы глицерин дистиллированный («Duth glycerol refinery», Нидерланды), содержание основного вещества 99,7% (в составе примесей присутствовали: сульфаты < 0,002%, хлориды < 0,003%, органические примеси < 0,1%, вода 0,09%, тяжелые металлы < 5 мкг/г, сложные эфиры жирных кислот 0,21%).

2.2.2 Техника и методы культивирования штамма-продуцента ПГА

Для культивирования бактерий использована лабораторная ферментационная техника различного объема и оснащения. Культивирование проводили в стеклянных колбах объемом 1 и

2 литра, заполненных на 50%, с использованием термостатируемых шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova®» серии 44 «New Brunswick Scientific» (США) (рисунок 2.1). Масштабирование процесса реализовано в ферментерах с различным объемом ферментационных сосудов, от 8,0-15,0 до 150,0 л (рисунки 2.2-2.3).



Рисунок 2.1 - Фото шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova 44» для культивирования бактерий в колбах

Использовали ферментационную технику, оснащенную перемешивающими устройствами в виде турбинных и лопастных мешалок с различным коэффициентом массопереноса по кислороду (KLa) от 200 до 460 $ч^{-1}$. Массовое культивирование бактерий проводили, используя серию автоматизированных ферментационных комплексов BioFlo 115 «New Brunswick Scientific» (США) (рисунок 2.2) с объемом ферментационного сосуда 8-15 л, оснащенных для компрессирования и подачи воздуха аэропомпой марки EL-200 и компрессор марки Zenith 05-270 производительностью 35 $м^3/ч$.



Рисунок 2.2 - Автоматизированные ферментационные комплексы BioFlo 110 и 115 «New Brunswick Scientific» (США); объем ферментеров от 8,0 до 15,0 л

Для масштабирования процесса использовали ферментационную линию фирмы «Bioengineering» (Швейцария) серии NLF 22 с объемом посевного и рабочего ферментеров 30,0 и 150,0 литров при коэффициенте заполнения 0,5-0,7; объемный коэффициент массопереноса по кислороду ферментеров регулировали в диапазоне от 500 до 1000 ч⁻¹ (рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 - Фото самостерилизующихся ферментеров («Bioengineering», Швейцария) объемом 30 л (слева) и 150 л (справа)

Бактерии культивировали в периодическом режиме, соблюдая условия, разработанные для биосинтеза ПГА ранее (Volova et al., 2012). Для инокулята в качестве посевного материала использовали музейную культуру бактерий, хранящуюся на агаризованной среде Шлегеля при температуре 5 °С. Инокулят получали в строго стерильных условиях в стеклянных колбах объемом 0,5 л ресуспендированием музейной культуры и далее использовали для засева колб большего объема (1-2 л) или ферментационных аппаратов. Стартовая концентрация клеток в инокуляте составляла при использовании колб порядка 0,1-0,2 г/л; ферментеров - не менее 1,0 г/л. Бактерии культивировали на солевой среде Шлегеля при pH 7,0, при стартовой концентрации С-субстрата 5-10 г/л и температуре среды 30°С с лимитированием роста бактерий по азоту – фактор, стимулирующий суперпродукцию ПГА. Применяли периодический двустадийный процесс. На первом этапе (30-35 ч) использовали среду с уменьшенным в два раза от физиологической потребности бактерий содержанием азота (до 60 мг/л на 1,0 г синтезируемой биомассы клеток). В качестве азота использовали хлорид аммония или карбамид. На втором этапе (30-35 ч) процесс продолжали при тех же параметрах, но в безазотной среде. В высокоплотных ферментационных культурах по мере увеличения концентрации клеток в культуре периодически проводили подпитку среды

концентрированными растворами С-субстрата и минеральных макро- и микроэлементов с помощью перистальтических насосов-дозаторов.

После процесса ферментации культуральная среда в зависимости от объема концентрируется с применением центрифуги при 6000 об/мин или вакуум-выпарной установки. Полученная паста лиофильно высушивается в сублимационной установке IlshinBioBase (Корея) и используется для экстракции полимера с применением органических растворителей (дихлорметан, трихлорметан). Для осаждения полимера полученный экстракт направляют в осадительную ванну с использованием гексана (Киселев и др., 2014).

2.2.3 Методы контроля параметров процесса культивирования бактерий в режиме синтеза ПГА

В процессах культивирования бактерий оценивали биомассу клеток в культуре измерением оптической плотности при 440 нм на спектрофотометре и определением веса сухой биомассы бактерий. Урожай биомассы бактерий в культуре регистрировали весовым способом: 10-25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин на центрифуге Centrifuge с ротором 5810 R («Eppendorf», Германия); дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали и с высушивали при температуре 105°C в сушильном шкафу («SANYO», Япония) в течение 24 ч; охлаждали в эксикаторе и взвешивали.

Концентрацию глюкозы в среде определяли глюкозооксидазным методом с применением набора реагентов «Глюкоза – ФКД» (Россия), включающего ферментно – хромогенную смесь и калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией, 10 ммоль/л), фотометрически на фотоколориметре КФК-2МП (Россия) сравнивая оптическую плотность рабочей (E_0) и калибровочной (E_k) проб против холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 490 нм. Концентрацию глюкозы в пробах рассчитывали по формуле: $K=(E_0/E_k)10$.

Концентрацию глицерина определяли методом, основанным на окислении глицерина перйодатом натрия в растворе серной кислоты до формальдегида и колориметрическим анализом с использованием хромотроповой кислоты (Nakamura et al., 2016).

Для определения содержания в среде аммонийного азота использовали количественный метод – супернатант разводили дистиллированной водой в 100 раз, затем к 10 мл полученного раствора добавляли каплю щелочи (33 %-го раствора KOH) и 0,5 мл реактива Несслера. Оптическую плотность измеряли на фотоколориметре КФК-2МП (Россия) при длине волны 400 нм (длина оптического пути 10 мм). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Концентрацию азота рассчитывали по калибровочному графику.

Регистрировали урожай биомассы клеток в культуре (X , г/л), выход ПГА (г/л и в % от веса абсолютного сухого вещества клеток); удельные скорости роста бактерий и синтеза

ПГА (μ , ч^{-1}), продуктивность процесса биосинтеза по биомассе и полимеру (Π , $\text{г/л}\cdot\text{ч}$), экономический коэффициент (Y , г/г), которые находили общепринятыми методами (Перт, 1978). Находили значения общего (валового) урожая биомассы (X , г/л) и каталитически активную биомассу ($X_{\text{кат}}$), величина которой составляла разницу между валовым урожаем и внутриклеточным содержанием полимера.

Удельную скорость роста культуры бактерий (μ , ч^{-1}) определяли по уравнению

$$\mu = \ln\left(\frac{x_k}{x_n}\right) / \Delta\tau, \quad (2.1)$$

где:

x_k , x_n – начальная и конечная концентрация бактерий кг/м^3 ;

τ – время культивирования, ч.

Удельную скорость синтеза полимера ($\mu_{\text{ПГА}}$, ч^{-1}) определяли по формуле:

$$\mu_{\text{ПГА}} = \ln\left(\frac{\text{ПГА}_k}{\text{ПГА}_n}\right) / \Delta\tau, \quad (2.2)$$

где:

ПГА_n , ПГА_k – начальная и конечная концентрация полимера в клетках, кг/м^3 .

Продуктивность процесса по биомассе (Π_x) и полимеру ($\Pi_{\text{пга}}$), $\text{кг/л}\cdot\text{ч}$ находили, используя:

$$\Pi = q_s \cdot Y_{p/s} \cdot X, \quad (2.3)$$

где :

q_s – скорость потребления субстрата, $\text{кг}/(\text{кг}\cdot\text{ч})$;

$Y_{p/s}$ – выход продукта (экономический коэффициент), кг/кг ;

X – концентрация биомассы, P – продукт, S – субстрат, кг/м^3 .

Экономический коэффициент культуры по продукту Y , кг/кг рассчитывали по формуле:

$$Y = m_x / m_c, \quad (2.4)$$

где:

m_c – масса субстрата, затраченного на получение продукта, кг ;

m_x – масса продукта (X , полимер), кг .

Скорость утилизации компонентов субстрата культурой q , $\text{кг}/(\text{кг}\cdot\text{ч})$ определяли по формуле:

$$q = \frac{G_r}{x \cdot V}, \quad (2.5)$$

где G_r – расход потребляемого субстрата, кг/ч ;

x – концентрация бактерий, кг/м^3 ;

V – рабочий объем аппарата, м^3 .

2.2.4 Методы исследования химического состава и свойств ПГА

Внутриклеточное содержание полимера в бактериальных клетках и его состав определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс детектором 5975C («Agilent Technologies», США).

Структуру полимера определяли на образцах полимерных пленок с помощью ИК-Фурье-спектрометра ИНФРАЛЮМ ФТ-02 («Люмэкс», Россия); ИК-спектры были сняты в диапазоне 500-4500 см⁻¹.

Молекулярно-массовые характеристики ПГА определяли с применением высокоэффективной жидкостной гельпроникающей хроматографии на установке Agilent 1200 (США) с набором полистироловых стандартов «Sigma»; находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу.

Термический анализ образцов проведен с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («Mettler Toledo», Швейцария); определяли температуру плавления ($T_{пл}$) и термической дегградации ($T_{дегр}$) по экзотермическим пикам на термограммах.

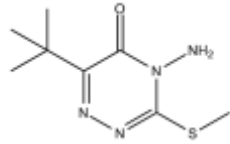
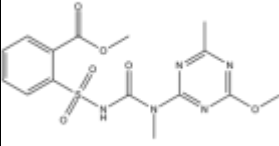
Рентгеновские эксперименты для определения степени кристалличности образцов выполнены на дифрактометре D8 ADVANCE («Bruker AXS», Германия) с линейным детектором VANTEC. Степень кристалличности определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным аморфным фоном к площади без вычитания фона. Для вычислений использована программа Eva из программного приложения к дифрактометру.

2.2.5 Конструирование долговременных форм пестицидных препаратов

Для депонирования гербицидов использовали гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)). В качестве наполнителей полимерной основы (филеров) были взяты природные материалы: торф (ЗАО Росторфинвест, произведено в России, ООО Академия цветоводства); древесные опилки (компания «СтанкоПремьер», Россия); глина п – 2,32; р – 2,85 (Красноярский край, Красноярск, Кузнецовское месторождение глины).

Исследованы системные гербициды (таблица 2.1), повсеместно применяемые и разрешенные к применению в России (Справочник по пестицидам, Агрорус, 2011).

Таблица 2.1- Характеристика исследованных гербицидов

Препараты	Структурные формулы	Эффективность против сорняков	Нормы внесения
метрибузин (4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазин-5(4Н)-он), Мг 214,3 г/моль		однолетние двудольные и злаковые сорняки	- на легких почвах – 300-360 г/га, - на средних почвах – 360-450 г/га. - на тяжелых почвах – 450-660 г/га
трибенурон-метил (метиловый эфир 2-(6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил(метил)карбомоилсульфамойл)бензойной кислоты), Мг 395,39 г/моль		двудольные сорные растения	10-25 г/га

Депонированные формы препаратов получали из смеси полимера и филлера, предварительно измельченные ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрифужной мельнице ZM 200 («Retsch», Германия). Для достижения тонкого помола полимера, измельчаемый материал и корпус с размольными элементами мельницы предварительно охлаждали при -80°C около 30 мин в морозильной камере InnovaU101 (NEWBRUNSWICKSCIENTIFIC, США). Размол проводили при использовании сита с диаметром отверстий 2 мм и скорости вращения ротора 18000 об/мин. Фракционный состав полимера и наполнителей определяли с помощью аналитической просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия). Смешивание смесей производили в настольном планетарном миксере SpeedMixer DAC 250 SP (Hauschild Eng., Германия), время смешения 1 мин, скорость 1000 об/мин. Для получения форм гербицидов в виде гранул использовали сырую пасту полимера, увлажненную этанолом, смешанную с филлерами и гербицидом с применением гранулятора Fimar (Италия). Прессованные формы изготавливали методом холодного прессования с использованием автоматического пресса «Усиленный Суперпресс» (Белоруссия). Соотношение компонентов в формах варьировало в зависимости от задач исследований.

Свойства разработанных депонированных форм гербицидов исследовали аналогично приведенным выше методам исследования ПГА с применением ИК-спектроскопии, термического и рентгеноструктурного анализа

Для детекции метрибузина в формах использовали газовую хроматографию, руководствуясь методическими рекомендациями (МУК 4.1.1405–03). Для построения

калибровочных графиков использовали ГСО 7713-99. Измерения проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометром (7890/5975С, Agilent Technologies, США). Для построения калибровочных графиков гербицидов использовали широкий диапазон концентраций действующих веществ и два режима ввода пробы: режим с разделением потока гелия 30:1 (split) и без разделения потока (splitless), что позволило строить калибровки в широком диапазоне концентраций от 0,6 нг/мкл до 1,4 мкг/мкл.

Для определения трибенурон-метила использовали жидкостную хроматографию, так как эти вещества являются малолетучими и термически нестабильными. Руководствовались Методическими указаниями МУК МУК 4.1.2022-05; в качестве стандартов действующих веществ использовали ГСО и ГСО 8628-2004 (трибенурон-метил). Использовали систему ВЭЖХ Agilent 1200 с диодной матрицей (Agilent Technologies, США). Для построения калибровочных графиков использовали градуировочные растворы действующих веществ с низкими концентрациями 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мкг/мл, а также с высокими концентрациями, от 50 до 500 мкг/мл.

2.2.6 Исследование деградации долговременных форм гербицидных препаратов в лабораторных почвенных микрэкосистемах

Деградацию экспериментальных форм гербицидов исследовали в лабораторных почвенных микрэкосистемах. Для этого в пластиковые контейнеры объемом от 250 до 500 см³ с охарактеризованной почвой помещали исследуемые формы препаратов, предварительно затаренные в мешочки из мельничного газа. Контейнеры размещали в термостате при стабилизации температуре (20 °С) и влажности почвы (50 %) на сроки до 3-х месяцев. Периодически образцы извлекали из почвы, тщательно очищали от остатков почвы, промывали и высушивали до постоянного веса. Динамику деградацию форм оценивали по убыли веса (весы 4-го класса точности).

2.2.7 Анализ почвенной микрофлоры

Для анализа почвенных проб использовали общепринятые микробиологические методы. Общую численность органотрофных бактерий определяли на мясопептонном агаре, численность микромицетов – на агаре Сабуро. Эколого-трофические группы микроорганизмов определяли методом посева на чашки с диагностическими средами по общепринятой методике. Чистые культуры микроорганизмов выделяли из изолированных колоний на МПА, отбирая 8-10 морфотипов каждого изолята. Морфологию бактериальных клеток изучали на фиксированных

и окрашенных мазках. Выделение доминантных микроорганизмов и их идентификацию проводили общепринятыми методами на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов, приведенных в определителях (Нетрусов и Котова, 2022).

Выявление первичных микроорганизмов-деструкторов П(ЗГБ) проводили с использованием метода прозрачных зон высевом проб на минеральный агар, содержащий в качестве единственного источника углерода мелкодисперсный порошок ПГА. Идентификацию микроорганизмов-деструкторов проводили в лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Для идентификации микроорганизмов-деструкторов определяли последовательность нуклеотидов фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК для бактерий и 28S рРНК для грибов. ДНК выделяли с использованием набора реактивов AquaPure Genomic DNA Isolation (Bio-Rad, США) по рекомендованному производителем протоколу. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Размер, количество и чистоту ПЦР продуктов проверяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с использованием 0,5%-ного TAE буфера. Визуализацию проводили окрашиванием бромистым этидием с последующим документированием на трансиллюминаторе Doc Print (Vilber Lourmat, Франция).

Для получения качественных сиквенсов неочищенные ПЦР продукты клонировали в векторе pCR4-TOPO (Invitrogen, США), которым трансформировали клетки *E. coli* TOP10. Полученные клоны проверяли рестрикционным анализом на наличие в векторе вставки нужного размера. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, США) по рекомендованному производителем протоколу. Секвенирование выполнено в двух направлениях на автоматическом ДНК анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, США) с использованием универсальных праймеров T3 и T7 и набора Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями в базах данных GenBank, EMBL и DDBJ с использованием программы BLAST для поиска высоко гомологичных последовательностей веб-ресурса NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Нуклеотидные последовательности выделенных доминирующих микроорганизмов почвенных микробных экосистем и первичных разрушителей ПГА были внесены в базу данных GenBank.

2.2.8 Технология выращивания высших растений в лабораторных условиях

Гербицидная активность разработанных форм МЕТ и ТРИБ исследована в лабораторных культурах сорных растений различных видов: щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*), горчица полевая (*Sinapis arvensis*), щетинник-лисий хвост (*Setaria macrocheata*), гулявник Лезеля (*Sisymbrium loeselii*), нивяник (*Leucanthemum maximum*), овсюг обыкновенный (*Avena Fatula L*), эльсгольция реснитчатая (*Elsholtzia ciliata*). На трех сорняках (щирица запрокинутая, горчица полевая и нивяник) исследовано действие свободных и депонированных форм метрибузина и трибенурон-метила; на гулявнике Лезеля и эльсгольции реснитчатой – две формы трибенурон-метила; на овсюге обыкновенном и щетиннике-лисий хвост – две формы метрибузина. Выбор препаратов по отношению к сорным растениям обусловлен чувствительностью исследуемых сорняков к гербицидам и исходя из действующих рекомендаций использования гербицидов по отношению к конкретным сорнякам (Справочник по пестицидам, Изд-во Агрорус, 2011).

Растения выращивали с использованием лабораторных почвенных микрэкосистемах в эксперименте длительностью 35 суток. Использована почва полевого стационара Красноярского государственного агроуниверситета, расположенного в окрестностях г. Красноярска. Это лугово-черноземная почва, по строению профиля близкая к черноземам с мощным гумусовым горизонтом и рыхлой зернистой структурой. Почва имела нейтральную реакцию, низкую гидролитическую кислотность, высокое содержание азота, подвижного фосфора и обменного калия. Почву помещали в пластиковые контейнеры объемом 500 см³ (масса почвы в контейнере составляла 400 г) и засевали семенами растений. Одновременно в почву вносили гранулы с депонированными гербицидами на глубину 1,5-2,0 см. В качестве положительного контроля в почву вносили растворы свободных гербицидов в концентрации, рекомендованной для полевого применения и сопоставимой с концентрацией гербицидов в гранулах. Необходимую концентрацию депонированных гербицидов регулировали внесением в почву различного количества гранул.

Гербицидную активность исследуемых форм изучали в лабораторных посевах зерновых культур на примере яровой пшеницы сорта «Новосибирская 15», зараженных сорняками, семена которых вносили в почву одновременно с зерновками. В качестве сорняков в посевах пшеницы использовали овсюг обыкновенный и щирицу запрокинутую. Второй исследуемой культурой был яровой ячмень сорта «Биом», зараженный горчицей полевой и щирицей запрокинутой. Почву помещали в пластиковые контейнеры объемом 700 см³ и засевали одновременно семенами зерновых культур и сорных растений. Растения выращивали в климатической камере (Фитотрон-ЛиА-2 (Россия)) (Рисунок 2.4), 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. Освещенность изменялась от 0 до 300 мкмоль/м²/с с шагом 100 мкмоль/м²/с.

Показателем состояния посевов под действием свободных и депонированных форм гербицидов относительно отрицательного контроля служил ежедневный осмотр и периодическое фотодокументирование. В ходе эксперимента регистрировали динамику гибели сорняков и биологическую эффективность гербицидов, которую оценивали по динамике гибели сорняков ($C_{испр}$) по формуле Аббота (Abbot, 1925).



Рисунок 2.4 - Культивирование растений в автоматизированных климатических камерах

2.2.9 Измерение фотосинтетической активности высших растений

Фотосинтетическую активность листьев определяли на основе показателей быстрой флуоресценции хлорофилла, регистрируемых методом индукции флуоресценции хлорофилла с использованием флуориметра JUNIOR-PAM фирмы Walz (Effeltrich, Germany). Перед измерением листья адаптировали к темноте в течение 30 минут. Интенсивность актинического света ступенчато возрастала (0, 66, 90, 125, 190, 285, 420, 625 и 820 $\times 10^{-6}$ М фотонов \times м⁻² \times с⁻¹) с интервалом в 10 секунд. Температура и влажность находились на уровне окружающей среды при измерении параметров флуоресценции. В ходе эксперимента регистрировали следующие параметры флуоресценции: $Y(II)_{max}$ - максимальный квантовый выход ФСII, отражающий внутреннюю эффективность преобразования энергии реакционными центрами ФСII. $Y(II)$ уменьшается в результате стресса и обычно отождествляется с повреждением светособирающих комплексов ФСII. ETR_{max} – максимальная скорость нециклического

транспорта электронов. Данное значение отражает скорость передачи фотосинтетической энергии. $Y(NPQ)_{\max}$ -максимальный квантовый выход нефотохимического тушения определяют для количественной оценки доли энергии возбуждения, рассеиваемой в виде тепла через фотозащитные механизмы; чем выше показатель, тем больше энергия рассеивается в виде тепла, тем ниже эффективность процесса фотосинтеза. Показатели опытных образцов сравнивали с отрицательным контролем (Kramer et al., 2004).

2.2.10 Количественное определение хлорофилл-белкового комплекса растений

Навеску тканей листа (без центральной жилки) (40-60 мг) помещали в пробирку, добавляли 5 мл 95 % этилового спирта, 10 мг $CaCO_3$ (порошок), закрывали пробкой. Экстракцию пигментов проводили на водяной бане при температуре $60^{\circ}C$ до полного обесцвечивания листа в течение 20-30 мин. После водяной бани пробирки изолировали от света и помещали на 12 часов в холодильник ($+ 4^{\circ}C$) для окончательной экстракции пигментов и осветления раствора.

Оптическую плотность определяли спектрофотометрически на спектрофотометре (UNICO, США). Концентрацию хлорофиллов C_a , C_b и суммы ксантофиллов и каротинов C_{x+c} (мкг/мл) рассчитывают по следующим формулам (Lichtenthaler et al., 2001):

$$C_a = 13,36 \times (D_{664} - D_{720}) - 5,19 \times (D_{648} - D_{720})$$

$$C_b = 27,43 \times (D_{648} - D_{720}) - 8,12 \times (D_{664} - D_{720})$$

$$CAR = (1000 \times (D_{470} - D_{720}) - 2,13 \times C_a - 97,4 \times C_b) / 209$$

Содержание пигментов выражают в $mg \cdot g^{-1}$ сырой массы или $mg \cdot g^{-1}$ сухой массы.

2.2.11 Технология выращивания овощных и зерновых культур в открытом грунте

Микрополевые испытания гербицидов проведены на полях Красноярского аграрного университета, расположенных в окрестностях г. Красноярска. Почва – луговой чернозем, мощная тяжелосуглинистая. Агрехимическое обследование почвенных участков и диагностика почвы проведена перед началом посевных работ. В смешанном агрохимическом образце, составленном из 20 индивидуальных проб и отобранном из слоя 0-20 см, определяли: гумус по методу Тюрина (ГОСТ 26213-91); актуальную кислотность ($pH_{\text{водн}}$) потенциометрическим методом (ГОСТ 26483-85); гидролитическую кислотность по методу Каппена (ГОСТ 26212-91); сумму поглощенных оснований по методу Каппена (ГОСТ 27821-88); обменный кальций и магний атомно-абсорбционным методом (ГОСТ 19 26487-85); нитратный азот (ГОСТ 26951-

86); обменный аммоний (ГОСТ 26489-85); подвижный фосфор и обменный калий по методу Чирикова (ГОСТ 26204-91).

В период вегетации полевых культур определяли влажность и температурный режим 0-20 см слоя почвы термовесовым методом электронным влагомером для почвы TR – 46908 с температурным датчиком в период с мая по сентябрь на 3 пробных площадях, выделенных в пределах опытных делянок. Интервал измерения температуры и влажности почвы – 11-17 дней.

Исследования проведены на зерновых культурах (пшеница «Новосибирская 15» ячмень «Биом») и овощных культурах (свекла столовая сорта «Цилиндра», томаты сорта «Загадка»). Схема проведения исследований включала для каждой культуры серию вариантов: негативный контроль (интактные растения); положительный контроль (опрыскивание растений растворами гербицидов); эксперимент (депонированные гербициды метрибузина (МЕТ) и трибенурон-метила (ТРИБ) в виде гранул, которые вносили в почву одновременно с посевом семян и высадкой рассады томатов).

Площадь каждой делянки составляла 1,0 м²; повторности три. Семена томатов были посажены 25 марта; 4 апреля были удалены верхушки перед двумя-тремя листьями; рассада была пересажена в открытый грунт 14 июня. Система посадки - 4 растения на 1 м². Семена свеклы были посеяны в конце мая, используя схему посадки 25 × 7 см. Томаты были собраны 20 августа, а свекла - 11 сентября. Учет и оценка структуры урожая томатов проведены в один срок 20.08.2019 г. В структуре урожая учтены масса плодов с 1 м², количество плодов шт./м², количество плодов на одно растение, средняя масса плодов с одного растения. Учет и структура урожая корнеплодов свёклы осуществлены 11.09.2019 г. по следующим показателям: масса корнеплодов с 1 м², количество корнеплодов шт./м², средняя масса одного корнеплода или плода. Зерновые высеяны 23.05.2019 г. вручную по общепринятой схеме: расстояния между рядками 15 см, расстояние между зернами 1,5 - 2 см, глубина заложения семян 5 - 6 см. Площадь опытных делянок составляла 1 м², повторность – 3-х кратная, размещение – систематическое. Гранулы вносили в междурядья на глубину 5-6 см в количестве 315 шт на 1 м². Опрыскивание растворами гербицидов проводили 14 июня, согласно нормам внесения. Сроки сбора урожая зерновых культур выполнены 20 августа.

Сравнительное исследование применения свободных и депонированных форм гербицидов включало еженедельный осмотр и фотодокументирование культур и ежемесячный отбор проб для анализов. В ходе эксперимента полив и внесение удобрений в посадки овощных и зерновых культур не производили. Биологическую урожайность зерновых культур определяли в фазе полной спелости культуры. Урожайность учитывали по каждой делянке с пересчетом на 14-% влажность. Фиксировали структуру урожая согласно общепринятым методикам (Серегин и др., 2009).

Химические исследования зерна пшеницы и ячменя включали определение натуры (ГОСТ Р 5489-5-2020), белка (ГОСТ 10846-91), клейковины и ИДК (ГОСТ Р 54478-2011). Химический анализ плодов томатов и корнеплодов свёклы включал определение нитратного азота нитратомером «Созэкс», сухого вещества (ГОСТ 28561-90), сахара по М 04-69-2011, витамина С по методике «ЛЮМЭКС» М 04-86-2016 на системе капиллярного электрофореза Капель-105М.

Концентрация пестицидов (МЕТ и ТРИБ) в плодах томатов, корнеплодах свеклы, а также в зерне пшеницы и ячменя проанализирована хроматографически в ФБУ «Красноярский центр стандартизации и метрологии» в соответствии с Методическими указаниями «4.1. Методы контроля. Химические факторы. Определение остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах, сельскохозяйственном сырье и объектах окружающей среды». Измерения проводили на хроматографе «Кристалл 5000» с детектором электронного захвата.

2.2.12 Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистический анализ результатов проводился общепринятыми методами с использованием стандартного программного пакета Microsoft Excel для Windows 10 и Statgraphics Centurion 8. Средние значения и стандартные отклонения были найдены при избранной доверительной вероятности $\alpha = 0,95$ с использованием методологии фильтрации данных с целью удаления из экспериментального массива результатов с экстремальными величинами. Результаты влияния гербицидов на урожайность овощных культур, выращиваемых в открытом грунте, обработаны методом дисперсионного анализа (Дмитриев, 1995).

ГЛАВА 3. Синтез ПГА – разрушаемой основы для конструирования долговременных форм гербицидных препаратов

3.1 Синтез и характеристика разрушаемых полимеров

Синтез полимера реализован, исходя из необходимости повышения их доступности и удешевления. Для этого избран подход расширения сырьевой базы и привлечения в качестве основного ростового субстрата глицерина, являющегося отходом крупнотоннажного производства биодизеля. На рисунке 3.1 представлены результаты синтеза ПГА в ферментационном комплексе Bio-Flo с объемом ферментера 15,0 л.

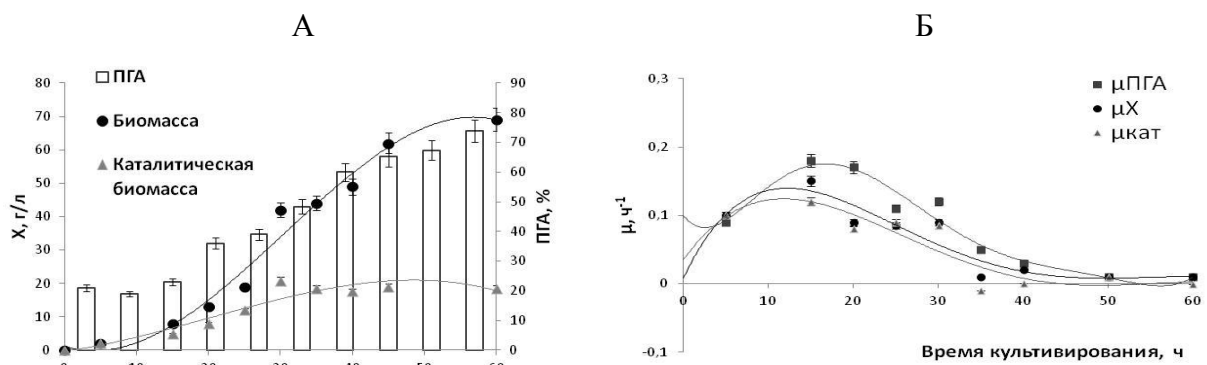


Рисунок 3.1 - Продукционные показатели культуры *C. necator* B-10646 в 15-л ферментере, выращиваемой на глицерине: А - концентрации общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); Б - динамика удельной скорости прироста общей (μ , ч^{-1}) и каталитически активной ($\mu_{\text{кат}}$, ч^{-1}) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($\mu_{\text{полимер}}$, ч^{-1}) (Петровская, 2020)

На очищенном глицерине урожай общей биомассы максимально достиг 70 г/л, содержание полимера в клетках порядка 75 %. Удельные скорости прироста общей и каталитически активной биомассы и потребление культурой глицерина имели самые высокие показатели в начальный период процесса, составив, соответственно, 0,15 ч^{-1} и 0,14 ч^{-1} (рисунок 3.1б). В этот период наиболее активного прироста биомассы клеток С-субстрат, глицерин, потреблялся культурой с наибольшей скоростью (порядка 4,0 г/г·ч). В эти сроки скорость синтеза полимера достигала 0,19 ч^{-1} . К концу первого этапа процесса общая концентрация биомассы клеток составила 42 г/л при внутриклеточной концентрации полимера 48 %. Далее процесс продолжали при исключении азота из состава среды. Подача в культуру глицерина и минеральных элементов с помощью насосов дозаторов была продолжена для исключения дефицита. В течение второго этапа процесса удельные скорости роста клеток и синтеза полимера постепенно снижались на фоне падения потребления глицерина. В конце процесса (60

ч) общий урожай биомассы клеток составил практически 70 г/л при содержании полимера 73 %. Расход глицерина составил 3,5 кг, что соответствует экономическому коэффициенту Y_p 0,29 г/г (Петровская, 2020).

Для получения партий полимера в необходимых количествах процесс был масштабирован в условиях пилотного производства с использованием посевного ферментера с объемом 30 л и рабочего ферментера объемом 150 л с коэффициентом заполнения 0,7 (рисунок 3.2). Длительность процесса, включая процесс в посевном аппарате (получение инокулята для засева производственного ферментера), и процесса в ферментере объемом 150 л составил 84 ч: из них 24 ч - это получение инокулята и 60 ч – процесс в производственном ферментере. Объем инокулята составил 20 литров; содержание биомассы 30 – 35 г/л при внутриклеточной концентрации П(ЗГБ) < 20 %. Полученный инокулят по стерильной линии перекачивался в пилотный ферментер, где разбавлялся стерильной средой до концентрации клеток 10 – 12 г/л. Далее процесс проводился в две стадии: первая стадия - на среде с ограниченной подачей азота, вторая стадия - без азота. Урожай биомассы бактерий в конце процесса составлял 150 ± 10 г/л; концентрация полимера в клетках 83 %. Наиболее активный рост клеток имел место на первой стадии процесса (с 8 до 20 ч) при максимальных значениях удельной скорости роста ($0,16 \text{ ч}^{-1}$), которая в последующие часы снижалась, достигая к концу первой стадии до $0,06 \text{ ч}^{-1}$.

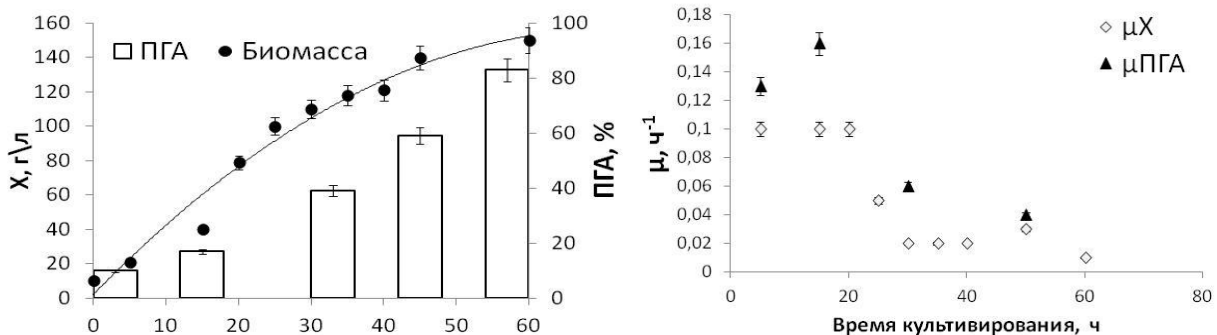


Рисунок 3.2 - Продукционные показатели процесса синтеза ПГА культурой *S. necator* V-10646 в условиях опытного производства на глицерине в качестве С-субстрата

На второй стадии процесса в основном происходила аккумуляция полимера из промежуточных метаболитов, синтезированных на первой стадии. Потребление С-субстрата наиболее активно на первой стадии процесса ($3,1 - 3,2 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$) и далее снижалось по мере снижения скорости роста клеток. Увеличение биомассы в культуре связано не с ростом и делением клеток, то есть не с образованием метаболически активной биомассы, а с накоплением в клетках полимера. Средний расход углеродного субстрата на второй стадии процесса составлял порядка $1,4 - 1,7 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$; к концу процесса снижался до $0,4 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$.

Экономический коэффициент по биомассе для глицерина определен на уровне $0,34 \pm 0,02$, по полимеру – $Y_{\text{ПГА}} 0,29 \pm 0,02$.

Синтезирована серия образцов ПГА в культуре *S. necator* В-10646 на глицерине в качестве единственного источника углерода (таблица 3.1). Как следует из представленной ионной хроматограммы с масс-спектром (рисунок 3.3), образцы ПГА, синтезированные на глицерине, представляли собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты П(ЗГБ).

Полимер, синтезированный на глицерине культурой *S. necator* В-10646, имел по сравнению с образцами, полученными на глюкозе, несколько сниженные значения среднечисловой и средневесовой молекулярной массы M_n 200-260 кДа и M_w 640-780 при значениях полидисперсности (\bar{D}) до 3,0-3,2. Снижение показателей молекулярно-массовых характеристик ПГА, синтезированных с использованием глицерина, связано с тем, что глицерин действует как агент переноса цепи в полимеризации ПГА. Это связано с этерификацией глицерина на концевых группах мономеров 3-гидроксibuтирата и блокированием дальнейшей полимеризации мономеров, т.е. происходит блокирование С-цепи (Volova et al., 2019).

Таблица 3.1 - Физико-химические свойства образцов П(ЗГБ), синтезированных на глицерине в сопоставлении с глюкозой (Петровская, 2020)

Образцы, используемый С-субстрат	M_n , кДа	M_w , кДа	\bar{D}	C_x , %	$T_{\text{пл}}$, °С	$T_{\text{дегр}}$, °С
Глюкоза	365	920	2,52	76	178	295
Глицерин:						
(образец № 1)	260	780	3,00	69	174	296
(образец № 2)	200	640	3,20	70	176	296
(образец № 3)	220	693	3,15	72	172	295

«-» – пик отсутствует

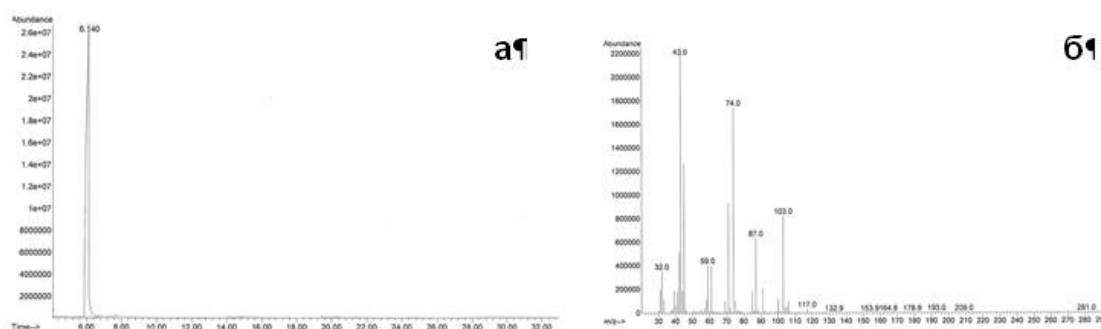


Рисунок 3.3 - Ионная хроматограмма образца П(ЗГБ), синтезированного *S. necator* В-10646 на глицерине (а), время удержания метилового эфира ЗГБ – 6,140; масс-спектр метилового эфира мономеров 3-гидроксibuтирата (б)

Полигидроксиалканоаты, в частности П(ЗГБ), относятся к полукристаллическим полимерам, у которых соотношение аморфной и кристаллической фаз варьируется в зависимости от набора и соотношения мономеров. Все образцы П(ЗГБ) имели близкие значения степени кристалличности (70-74 %). Температуры плавления ($T_{пл}$) и термической деградации ($T_{дегр}$) находились в ранее выявленных пределах значений, полученных на образцах П(ЗГБ), синтезированных на других С-субстратах (CO_2 и сахарах). Для образцов, синтезированных на глицерине, $T_{пл}$ составила 172-176, $T_{дегр}$ – 172-176 °С.

На основе полученных экспериментальных данных проведена предварительная оценка потенциальных затрат на углеродный субстрат при замене сахаров глицерином (таблица 3.2).

Таблица 3.2 - Удельные затраты С-субстрата на производство ПГА

С-субстрат	Стоимость субстратов, руб/кг	Расход субстрата, кг/кг ПГА	Удельная стоимость субстрата, руб/кг ПГА
Фруктоза	101,00	3,0	303,0
Глюкоза	69,00	2,8	193,2
Очищенный глицерин («Duth glycerol refinery», Нидерланды)	59,00	3,0	177,0
Неочищенный, «сырой» глицерин («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия)	44,00	3,1	136,4

Следует отметить, что удельный расход исследованных углеродных субстратов (сахаров и глицерина) на синтез ПГА штаммом *S. necator* В-10646 сопоставим. Однако стоимость сахаров и глицерина различается. При использовании фруктозы примерная стоимость составляет 303,0 руб/кг полимера. При замене фруктозы глицерином в зависимости от его марки и остаточного количества примесей затраты на углеродный субстрат могут быть снижены на 41,6 % при использовании очищенного глицерина и на 55 % при использовании «сырого» глицерина. Глюкоза значительно дешевле фруктозы, при ее использовании затраты на С-субстрат снижаются до 193,2 руб/кг полимера. В случае применения глицерина по сравнению с глюкозой затраты на углеродный субстрат снижаются на 8,4 % при использовании очищенного глицерина и на 29,4 % при использовании «сырого» глицерина. Таким образом, показанная возможность синтеза ПГА на глицерине потенциально может способствовать значительному снижению затрат на углеродный субстрат.

Наработанные в условиях опытного производства образцы полимера П(ЗГБ) в необходимых количествах использованы для формирования смесей с природными материалами-наполнителями и конструирования долговременных форм гербицидов.

3.2 Конструирование и исследование долговременных гербицидных препаратов, депонированных в разрушаемую смесовую основу П(ЗГБ)/ природные материалы

Партии охарактеризованных полимеров использованы для формирования смесей с природным материалом (березовыми опилками, глиной, торфом) в качестве основы для депонирования пестицидов. Связано это с тем, что ПГА в настоящее время все еще дороги и применение их в сельском хозяйстве и технических сферах требует удешевления. В связи с огромными массивами пестицидных препаратов, используемых в современном растениеводстве, было признано целесообразным использовать полимер не в чистом виде, а в смеси с доступными природными материалами (древесными опилками, глиной или торфом).

Выбор материалов обусловлен следующим: глина является естественным природным материалом, её основные преимущества – широкое распространение и относительная дешевизна; она активно исследуется в области получения нанокompозитов. Опилки, наряду с другими отходами древесины, образуются в больших количествах повсеместно, поэтому также представляют интерес для получения гибридных материалов. Относительно экологически безопасного природного материала, которым является торф, и запасы которого огромны, – он доступен в любых количествах; внесение торфа в почву в составе биоразрушаемой тары или основы удобрений и других препаратов, безопасно для почвенной биоты и способствует улучшению структуры почвы.

Из П(ЗГБ) и природных материалов (глины, торфа, березовых опилок), существенно различающихся исходными свойствами (таблица 3.3), получено семейство смесей «П(ЗГБ)/филлер» в виде гомогенных мелкодисперсных порошков с различным соотношением компонентов. П(ЗГБ) – высококристаллический материал, в котором доминирует упорядоченная фаза, и степень кристалличности (C_x) как правило, составляет свыше 70-78 %; у исследованного образца 75 %. В отличие от П(ЗГБ), у материалов наполнителей рентгенограммы имели другой вид. Из исследованных материалов наиболее высокие значения C_x (53 %) характерны для глины. В опилках и, в особенности в торфе, доминирует аморфная фаза, их степень кристалличности низкая, соответственно, 26 и 9 %. Наполнение полимера природными материалами сопровождалось аморфизацией и снижением величины C_x без значимого влияния на температурные показатели (таблица 3.3) (Колесникова, 2022).

Таблица 3.3 - Физико-химические свойства исходных материалов и полученных смесей (Колесникова, 2022)

Образец	C _x , %	T _{плав.} , °C	T _{крист.} , °C	T _{дегр.} , °C	Энтальпия плавления, Дж/г
Исходные материалы:					
П(ЗГБ)	75	176	108	287	89,3
глина	53			200*	
торф	9			130*	
опилки	26			220*	
Смеси:					
П(ЗГБ)/глина:					
90:10	72	177	110	286	52,4
70:30	60	175	110	283	38,5
П(ЗГБ)/торф:					
90:10	60	174	107	288	64,1
70:30	48	176	108	292	59,7
П(ЗГБ)/опилки:					
90:10	65	178	107	279	66,9
70:30	47	175	106	273	51,3

Для определения характера взаимодействия компонентов в смесях полимер/природный материал привлечена ИК-спектроскопия (рисунок 3.4). ИК-спектры поглощения П(ЗГБ) содержат полосы поглощения, соответствующие колебаниям основных структурных звеньев полимеров, кроме полос поглощения колебаний концевых С-ОН и СООН-групп. Полосы упорядоченных оптических плотностей (кристаллическая фаза) лежат в области 1261 см⁻¹; разупорядоченной (аморфной фазы) сдвинуты до 1182 см⁻¹. Отчетливо зарегистрированы полосы поглощения асимметричных валентных колебаний СН₃- и СН₂-групп (2978 и 2960 см⁻¹); валентные симметричные колебания СН- и СН₂-групп (2994, 2937 см⁻¹), а также валентные колебания карбонильных групп С=О, сопряженных (1687 см⁻¹) и несопряженных (1720 см⁻¹); скелетные СН (599 см⁻¹) и СН деформированные группы (622 см⁻¹) (Колесникова, 2022).

Характерным отличием в ИК-спектрах торфа по сравнению с П(ЗГБ) является присутствие полос поглощения валентных групп -S-S- (521 см⁻¹); групп -C-O-, характерных для углеводов (1029 см⁻¹), деформационных колебаний -CH₂- групп (718 см⁻¹), а также скелетных колебаний бензольного кольца С=C (лигнин), С=N, N-H (1513 и 1597 см⁻¹), валентных колебаний -ОН групп в области 3300 см⁻¹, не выявленные в спектрах П(ЗГБ). Представленный ИК-спектр глины содержит в сравнении с ИК-спектром П(ЗГБ) полосы поглощения в области 776 и 795 см⁻¹, соответствующие валентным и симметричным колебаниям Si-O-Si(Al), а также Fe-O в α-Fe₂O₃; валентные (Al-O), (Si-O-Al) и -Al₂O₃ в области 692 см⁻¹. В области 978 см⁻¹ имеются полосы поглощения, соответствующие деформационным колебаниям (O-Si). Частота поглощения, наблюдаемая при 1635 см⁻¹, указывает на деформационные колебания Н-О-Н,

указывающие на сорбцию воды на поверхности минерала. Полоса поглощения в 3615 и 3392 см^{-1} соответствует валентным и симметричным колебаниям АЮ-Н, для связанной воды. Полоса 3619 см^{-1} совпадает с валентными колебаниями внутримолекулярных гидроксидов, расположенных на поверхности октаэдрических и тетраэдрических пластин (Bensalah, 2017, Nekhlaoui, 2014). В ИК-спектрах березовых опилок зафиксированы плоскостные деформационные колебания гваяцильного кольца лиственного лигнина (1031 см^{-1}), валентные колебания -С-О-; -С-О-С- (1235 см^{-1}), скелетные колебания сиригильного кольца лиственного лигнина (1324 см^{-1}), валентные и скелетные колебания бензольного кольца (1422 см^{-1} , 1504 см^{-1} , 1593 см^{-1}), валентные колебания -С=О сопряженных и не сопряженных групп (1652 см^{-1} , 1734 см^{-1}), внутримолекулярные и межмолекулярные валентные колебания -ОН групп и воды (3337 - 3342 см^{-1}).

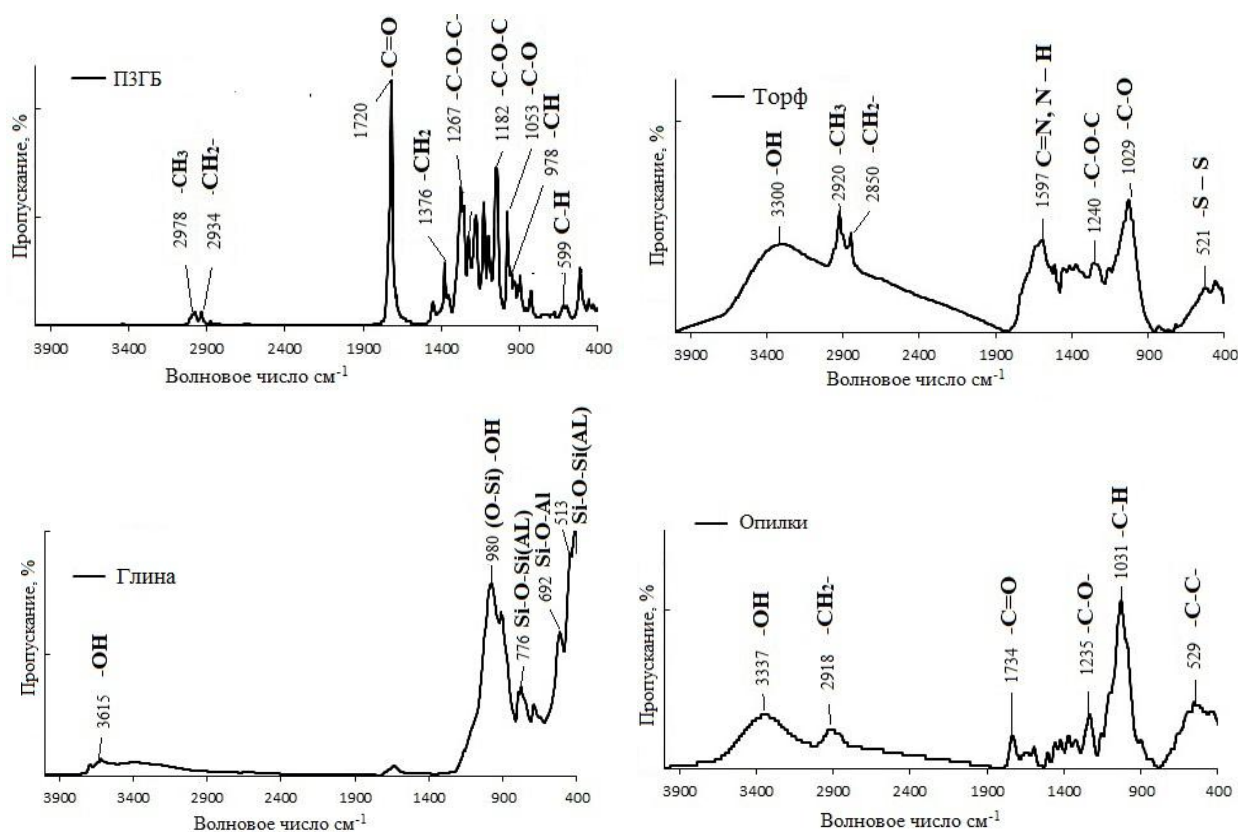


Рисунок 3.4 - ИК-спектры П(ЗГБ) и природных материалов (Колесникова, 2022)

В ИК-спектрах сформированных смесей отдельно сохраняются характеристические полосы поглощения исходных компонентов как для П(ЗГБ) – это CH , CH_2 , CH_3 , C-OH и COOH -групп; так и для торфа дополнительные и характерные для него -S-S- , C=C , C=N , N-H группы; для глины -Si-O-Si(AL) , а также Fe-O в $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; для березовых опилок это -C-O- ; -C-O-C- (рисунок 3.5).

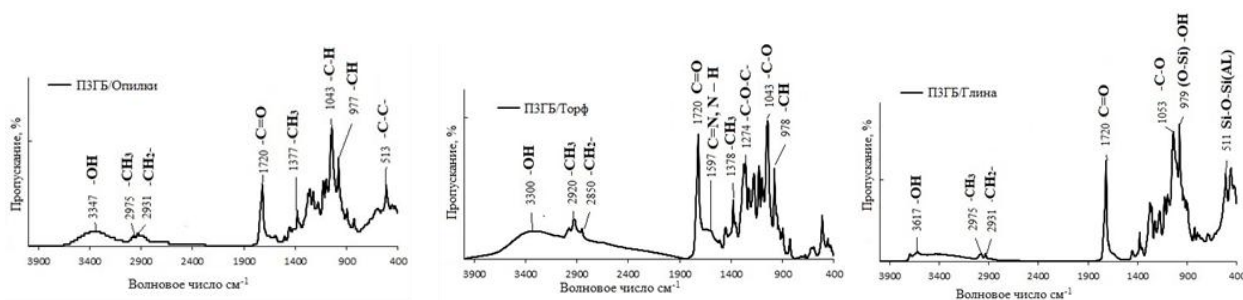


Рисунок 3.5 - ИК-спектры смесей П(ЗГБ)/природные материалы (Колесникова, 2022)

В спектрах смесей полосы поглощения видны либо в виде отдельных полос, либо в виде совмещенных пиков, в том числе и измененной формы. Незначительное различие в цифрах находится в пределах погрешности снятия спектра – 4 см^{-1} (накопление 256 сканов), а также может быть следствием повышенной влажности отдельных образцов. Новых видимых значимых полос поглощения в смесях не выявлено, что позволяет предположить отсутствие образования новых химических связей и позволяет сделать вывод о физическом характере смесей, полученных исследованными методами (Колесникова, 2022).

На основе полученных результатов предложена схема взаимодействия полимера и природных материалов наполнителей в полученных гомогенных смесях (рисунок 3.6).

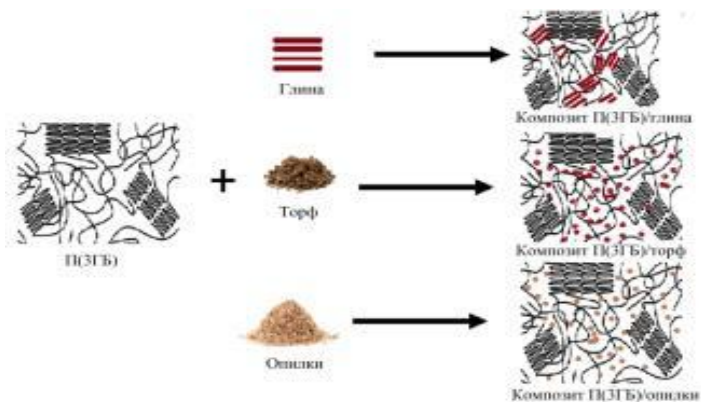


Рисунок 3.6 - Схематическое изображение структуры сформированных смесей П(ЗГБ) и природных материалов наполнителей

РЭМ снимки сформированных смесевых форм представлены на рисунке 3.7. Сформированные и охарактеризованные смеси полимер/природный материал использованы для депонирования гербицидов. Для исследований выбраны системные препараты, пригодные для длительного грунтового дождевого применения, совместимые с полимерной основой, способные подавлять развитие сорняков и возбудителей болезней, развивающихся как в посевах зерновых, так и овощных культур.

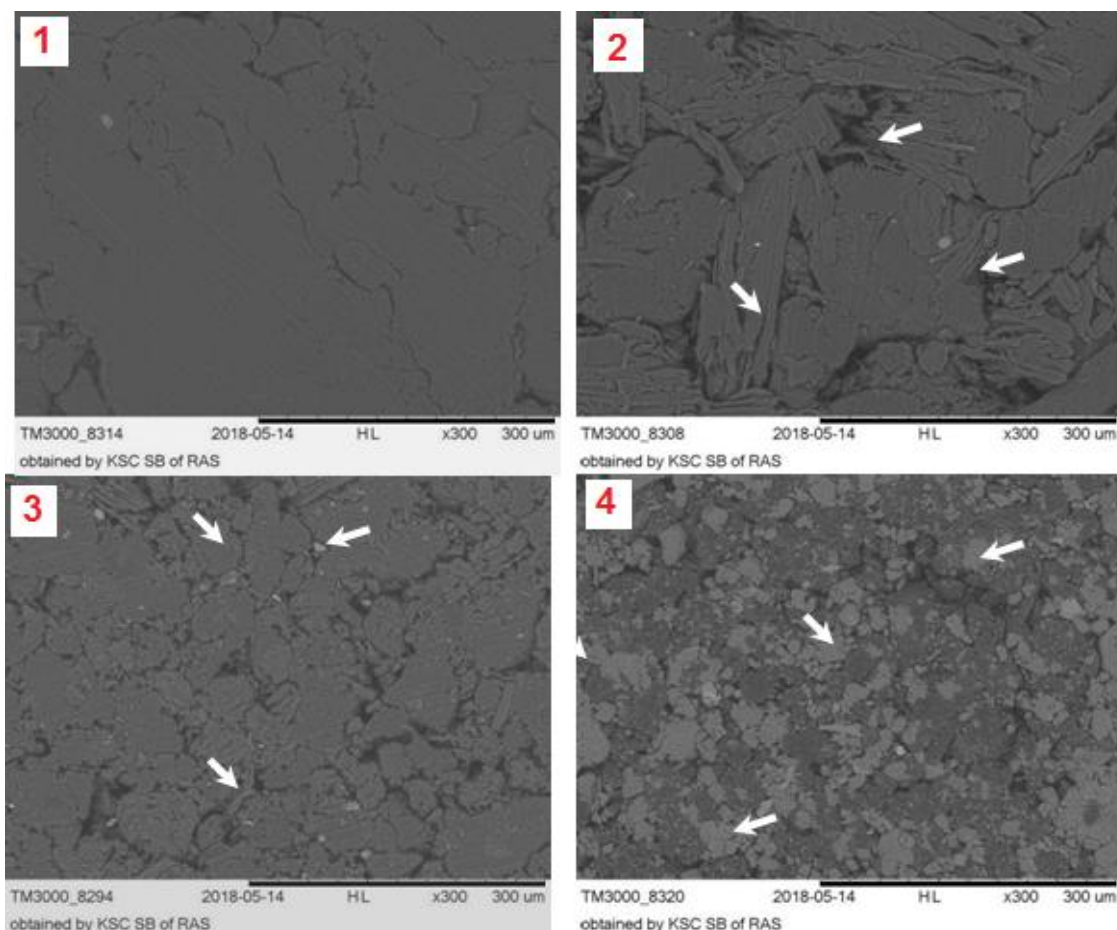


Рисунок 3.7 - РЭМ-снимки образцов: 1 – П(ЗГБ); 2 – П(ЗГБ)/опилки; 3 – П(ЗГБ)/торф; 4 – П(ЗГБ)/глина (стрелкам обозначены частицы материалов-филлеров)

С применением сухих гомогенных порошков трехкомпонентных смесей полимер/природный материал/гербицид получены формы в виде прессованных таблеток. Формирование гранул выполнено с применением пасты. Для этого из порошков была получена паста с помощью добавления 40 % этанола. Фото и РЭМ снимки образцов даны на рисунке 3.8 и 3.9. Электронная микроскопия выявила некоторые отличия, связанные с типом выбранных препаратов и химической структурой наполнителей. Для смесевой формы П(ЗГБ) с опилками была характерна плотная структура поверхности для всех типов пестицидов, в сравнении с таблетированными формами, содержащими глину и торф. Для этих образцов было отмечено формирование более рыхлой структуры поверхности с наличием неоднородного рельефа.



Рисунок 3.8 - Фото полученных долговременных форм гербицидов в виде таблетированных форм (внизу) и гранул (вверху), депонированных в смесовую основу различного состава

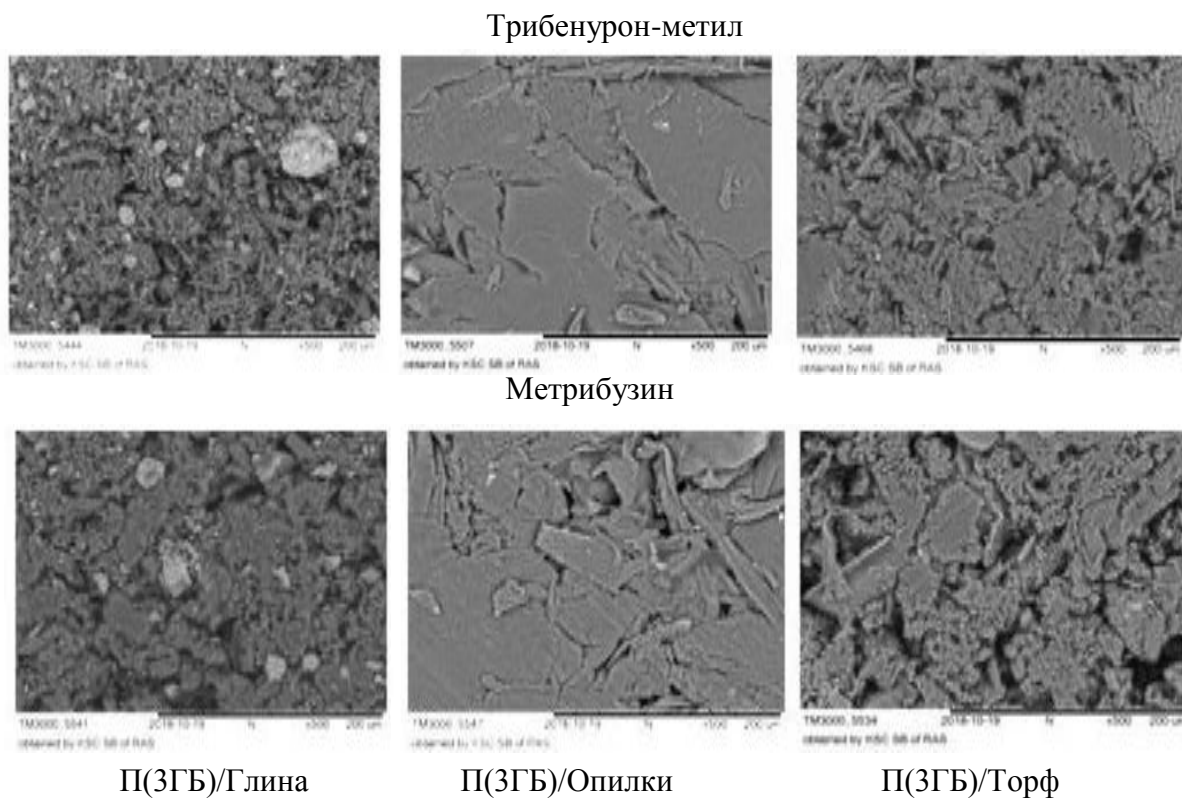


Рисунок 3.9 - РЭМ-снимки таблетированных форм на основе П(ЗГБ) с наполнителями (торф, глина, опилки), содержащие трибенурон-метил и метрибузин. Маркер 200 мкм

Таким образом, сконструированы и охарактеризованы долговременные формы препаратов гербицидного действия. Нарботаны партии препаратов в требуемых количествах для проведения исследований в лабораторных и полевых условиях.

3.3 Исследование деградации депонированных форм гербицидов в лабораторных почвенных микроэкосистемах

В связи с тем, что сконструированные формы гербицидов предназначены для грунтового применения, важный вопрос настоящего исследования заключался в изучении закономерности и динамики разрушения в почве. Дegradация ПГА в биологических средах представляет собой одно из наиболее привлекательных свойств этих полимеров, но это также и наиболее сложный и многофакторный процесс. Разрушаемость ПГА зависит от многих составляющих, таких как химический состав и структура используемого типа ПГА, микробная составляющая биоты как главного агента их биодegradации, а также условия среды, которые, в свою очередь, определяются биологическими, гидротермическими, климатическими и погодными условиями.

Изучение разрушения полимерной основы, выхода препаратов в почву и влияния на структуру почвенных микробоценозов выполнено с учетом состава полимерной основы, типа и геометрии формы, химической структуры действующих веществ гербицидов.

Первоочередной задачей было изучение свойств почвы, в которой экспонировали образцы, а также структуру микробиоценоза как главного фактора, определяющего закономерности и кинетику разрушения ПГА. Для исследования разрушения сконструированных форм препаратов и исследования выхода действующих веществ использованы лабораторные почвенные микроэкосистемы (рисунок 3.10).



Рисунок 3.10 - Фото лабораторных почвенных микроэкосистем, в которых экспонировали и исследовали сконструированные препараты, затаренные в чехлы из мельничного газа

Использованы образцы охарактеризованной агрогенно-преобразованной полевой почвы, отобранной с экспериментальных полей Красноярского государственного аграрного университета «Миндерлинское» (56° северной широты, 92° восточной долготы). Это чернозем

тяжелосуглинистого гранулометрического состава, плотность от 0,80 до 1,24 г/см³; pH 7,3 с высоким содержанием аммонийного (35 мг/кг) и нитратного (9,2 мг/кг) азота. Содержание фосфора составляло 280 мг/кг; калия 250 мг/кг. Анализ полевой почвы выявил следующую эколого-трофическую структуру микробиоценоза (таблица 3.4).

Таблица 3.4 - Структура микробиоценоза исходных образцов полевой почвы

Эколого-трофические группы микроорганизмов	Численность, КОЕ в 1 г почвы	Коэффициент минерализации	Коэффициент олиготрофности
Копиотрофы	$(1,13 \pm 0,88) \times 10^6$	4,72	6,76
Прототрофы	$(5,34 \pm 1,78) \times 10^6$		
Олиготрофы	$(76,7 \pm 12,4) \times 10^6$		
Азотфиксаторы	$(2,0 \pm 1,34) \times 10^6$		
Микромицеты	$(37,3 \pm 9,8) \times 10^3$		

Высокая численность олиготрофных микроорганизмов и высокие коэффициенты олиготрофности и минерализации указывают на зрелость почв и низкое содержание органических форм азота. Численность азотфиксирующих микроорганизмов также была высокой, что свидетельствует о дефиците легкодоступных форм азота в почве.

Анализ таксономического состава образцов полевой почвы выявил доминирование грамположительных бактерий (73,2 %), среди которых большую часть занимали актинобактерии (38,6 %), в том числе *Streptomyces* – 18,3 %, и спорообразующие палочки (34,6 %) из родов *Bacillus* – 24,8 и *Paenibacillus* – 9,8 % (рисунок 3.11, А). Грамотрицательные палочки были представлены в основном бактериями рода *Pseudomonas* – 9,4 %. В сообществе почвенных микромицетов доминировали представители рода *Penicillium*, составляющие 69,7 % от всех выделенных изолятов (рисунок 3.11, Б). Доля грибов рода *Fusarium* составила 8,4 %, остальные представители микромицетов были малочисленны – от 1,2 до 3,8 %. В целом, доля микромицетов с фитопатогенным потенциалом (*Alternaria*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium*) была высокой – 15,3 %, что указывает на преобладание в севообороте зерновых культур, ведущее к накоплению фитопатогенов в почве.

На первом этапе исследована деградация собственно смесовых форм (П(ЗГБ), П(ЗГБ)/торф; П(ЗГБ)/опилки; П(ЗГБ)/глина) в виде таблетированных форм и гранул в полевой почве, нагруженных гербицидами (рисунок 3.12, 3.14). Доля действующих веществ в формах составила 20 %, доля наполнителя 30 %; доля П(ЗГБ) – 50 %. Эксперименты проведены при стабилизации температуры (25°C) и влажности (50%) почвы. Внешний вид образцов в процессе разрушения представлен на рисунке 3.12; РЭМ-снимки – рисунке 3.13.

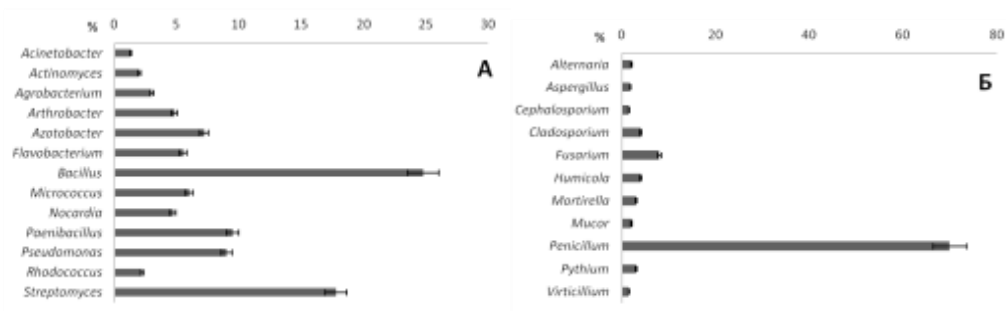


Рисунок 3.11 - Соотношение (%) доминирующих бактерий (А) и микромицетов (Б) в исходных лабораторных почвенных микрэкосистемах



Рисунок 3.12 - Фото таблетированных форм и гранул, нагруженных гербицидными препаратами, в ходе разрушения при экспозиции в полевой почве

РЭМ-снимки (рисунок 3.13) показали, что в ходе разрушения изменялась структура таблетированных форм всех типов, независимо от состава основы; поверхность исходно плотных образцов становилась рыхлой и неоднородной. В ходе разрушения полимерного матрикса отмечено появление пустот.

При исследовании динамики разрушения образцов в виде гранул и прессованных таблеток, экспонированных в почве, корректные результаты приведены для таблетированных форм. Это связано с тем, что образцы в виде гранул, полученные из сырой пасты полимера, имели достаточно рыхлую и пористую структуру, поэтому в процессе экспонирования в почве земля заполняла поры гранул, наполнители (торф, глина, опилки) набухали. Эти образцы теряли форму в процессе разрушения, при извлечении из почвы их невозможно было

Активная биodeградация образцов в исследованной полевой почве происходила после некоторой лаг-фазы и мало зависела от типа материала наполнителя. В конце эксперимента остаточная масса таблетированных форм составила для смеси с метрибузином П(ЗГБ)/торф 45 %, П(ЗГБ)/опилки 52 %, П(ЗГБ)/глина 46 %; с трибенурон-метилом П(ЗГБ)/торф 52 %, П(ЗГБ)/опилки 55 %, П(ЗГБ)/глина 53 %. Это свидетельствует о длительном процессе разрушения всех форм в почве и о пригодности смесовых форм на основе П(ЗГБ) с выбранными природными материалами для конструирования долговременных препаратов сельскохозяйственного назначения, предназначенных для грунтового применения. На разрушаемость депонированных форм гербицидов оказывал влияние процесс растворения и вымывания из полимерной основы собственно гербицидов, доля которых в формах составляла 20%вес. Отметим, что по растворимости исследованные ТРИБ и МЕТ относятся к достаточно хорошо растворимым пестицидам. Растворимость МЕТ и ТРИБ составляет, 1200 и 2040 мг/л соответственно (Петровская, 2021а).

Для детекции концентрации гербицидов в формах и почве поставлены высокочувствительные хроматографические методы. С учетом необходимости применения методов анализа, позволяющих детектировать концентрации пестицидов и их метаболиты на следовом уровне, а также в связи с тем, что действующие вещества МЕТ и ТРИБ имеют разную химическую природу, использованы методы газовой (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для детектирования концентраций исследуемых гербицидов в широком диапазоне (10-500 мкг/мл) построены калибровочные графики с использованием высокочистых действующих веществ (ГСО). Поскольку метрибузин летучее и термостабильное соединения, для его детекции использовали газовую хроматографию. Для определения трибенурон-метила использовали жидкостную хроматографию, так как это вещество является малолетучим и термически нестабильным. В качестве примера приведены хроматограмма и масс-спектры метрибузина и полученный калибровочный график (рисунок 3.15).

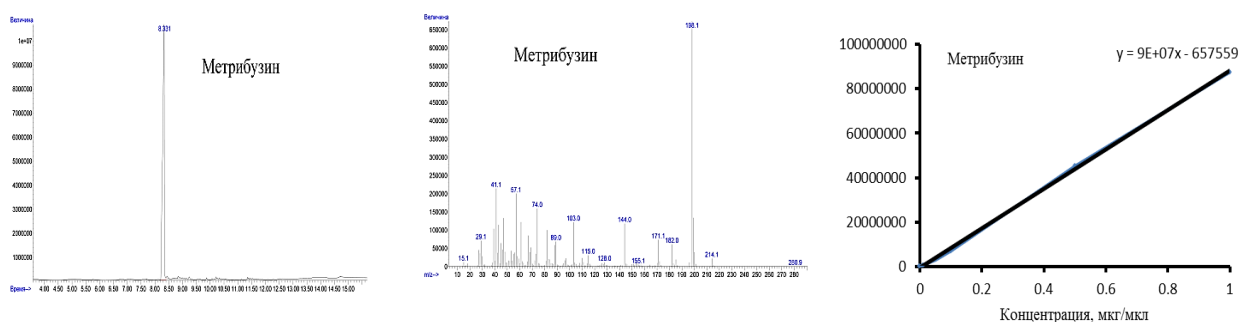


Рисунок 3.15 - Хроматограмма и масс-спектр метрибузина и калибровочный график для ГСО определения методом ГХ

Для детектирования исследуемых соединений в низких концентрациях методом ВЭЖХ с применением детектора на основе диодной матрицы построены калибровочные графики для концентраций от 1 до 500 мкг/мл, исходя из литературных данных о максимумах поглощения детектируемых веществ. На рисунке 3.16 приведены полученные калибровочные графики МЕТ и ТРИБ.

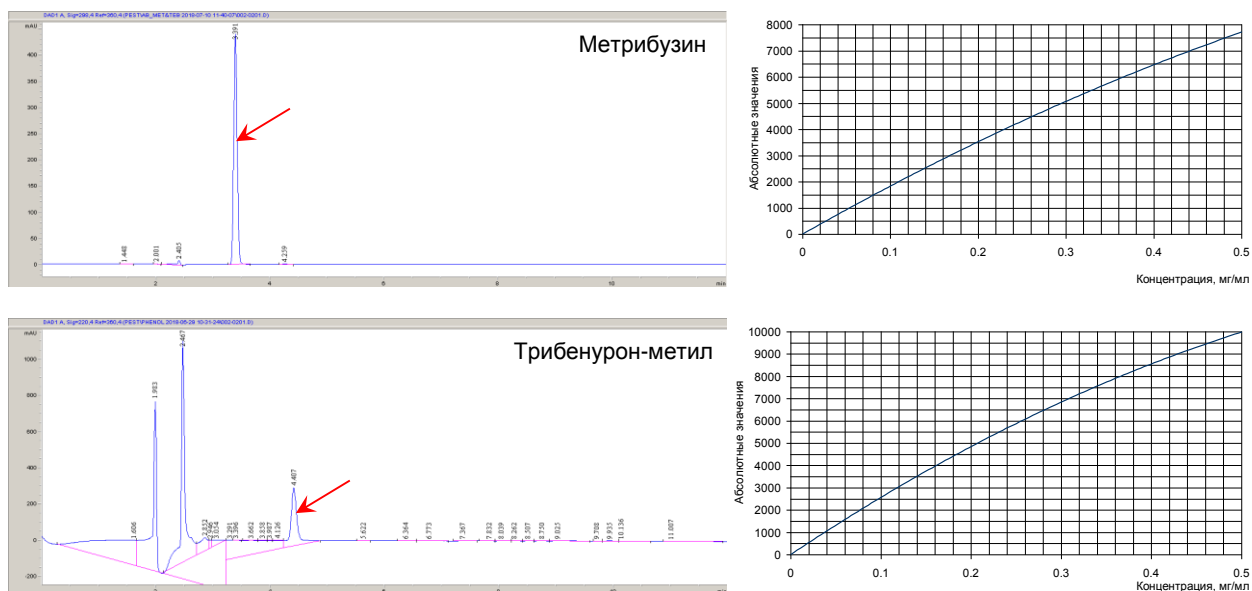


Рисунок 3.16 - Калибровочные графики для определения гербицидов методом ВЭЖХ с использованием детектора на основе диодной матрицы

Выход депонированных МЕТ и ТРИБ из форм в почву в течение эксперимента составил почти 90-100 %, при этом убыль массы форм составила порядка 45–55 %. При этом собственно разрушение П(ЗГБ) зарегистрировано на уровне 50–60 %. Из разработанных форм препаратов, содержащих в основе хорошо растворимые пестициды, убыль массы происходила за счет двух факторов: вымывания (растворения метрибузина, трибенурон-метила) и в процессе биоразрушения П(ЗГБ) основы.

Процесс разрушения полимерной основы зависит от микробиологической активности почвы. Поэтому в работе особое внимание уделено микробиологическим исследованиям. Установлено, что количественный и качественный состав микробного сообщества значительно изменяется при экспозиции в почве гербицидов.

Для исследования влияния собственно гербицидов на микрофлору почвы на предварительном этапе МЕТ и ТРИБ были внесены в почву в свободном виде, в концентрации согласно рекомендуемым нормам внесения. На рисунке 3.17 показано, как влияли на развитие микроорганизмов эти гербициды в свободном виде. Выявлена селективность действия гербицидов. Так, метрибузин не подавлял развитие копитрофов и олиготрофов, но

значительно ингибировал прототрофов, азотфиксаторов и микромицетов. Негативное действие трибенурон-метила проявлялось только по отношению к копиотрофам и микромицетам. Наиболее чувствительными к пестицидам оказались микромицеты; самыми устойчивыми – олиготрофные микроорганизмы.

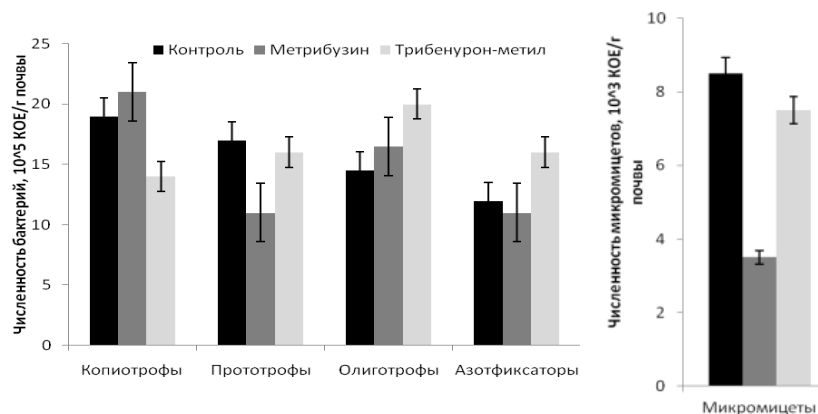


Рисунок 3.17 - Влияние внесения в почву исследуемых МЕТ и ТРИБ на численность микроорганизмов

Иную и более сложную картину изменения структуры почвенного микробиоценоза наблюдали при внесении в почву разработанных препаратов, то есть пестицидов, не в свободном виде, а депонированных в разрушаемую смесовую основу. С одной стороны, внесение в почву П(ЗГБ) и появление в ней продуктов распада полимера – это дополнительный субстрат для роста и развития микроорганизмов, но, с другой стороны, высвобождающийся в процессе разрушения форм пестицид мог оказывать негативное влияние на микрофлору. Как оказалось это влияние зависело от вида формы и пестицида (таблица 3.5). Так, обнаружено стимулирующее действие экспериментальных форм пестицидов на рост копиотрофных бактерий. Влияние форм с различным составом смесовой основы (полимер/глина, торф, опилки), существенно различающихся химическим составом, по-разному влияло на почвенную микрофлору. Внесение в почву форм полимер/опилки, нагруженных метрибузином и трибенурон-метилом, увеличивало численность копиотрофов, но снижало коэффициенты минерализации и олиготрофности, что, по всей видимости, связано с поступлением в почву дополнительного субстрата – П(ЗГБ) и продуктов его разрушения, а также компонентов опилок, включая гуминовые кислоты. Для других типов образцов, например полученных на основе смесей полимер/глина, выявлены, напротив, более высокая численность олиготрофных бактерий, и коэффициенты олиготрофности по сравнению с другими наполнителями.

Изменение качественного состава микрофлоры почвы при внесении разработанных форм гербицидов проявилось в усилении доминирования спорообразующих бактерий, в том

числе рода *Bacillus* до 30 %, а также в увеличении доли бактерий *Streptomyces* и *Pseudomonas* до 25,6 % и 12,3 % соответственно. Среди мицелиальных грибов преимущественно выделялись представители рода *Penicillium*, составившие в среднем 88,2 % от общей численности микромицетов (рисунок 3.18).

Таблица 3.5 - Структура микробного сообщества почвенных микроэкосистем при внесении разработанных форм препаратов с различным составом смесовой основы и нагруженных различными пестицидами (Петровская, 2021а)

Пестицид; материал- наполнитель смесовой основы	Численность микроорганизмов					Коэффициент минерализации	Коэффициент олиготрофности
	Копитрофы	Протогтрофы	Олиготрофы	Азотфиксаторы	Микромицеты		
	10 ⁵ КОЕ в 1 г почвы						
Контроль (-)	19,0±3,4	17,0±3,1	14,5±2,9	12,0±2,7	8,5±1,4	0,89	0,76
Метрибузин + опилки	16,7±2,4	2,0±2,0	1,1±0,2	1,7±0,4	1,7±0,9	0,12	0,07
Метрибузин + глина	8,7±3,6	1,7±1,6	3,2±0,8	3,3±2,2	3,0±1,3	0,19	0,37
Метрибузин + торф	16,2±3,7	1,3±1,1	2,8±0,6	1,3±0,9	2,0±0,3	0,08	0,17
Трибенурон-метил + опилки	15,3±3,1	1,7±1,1	1,4±0,3	1,3±0,4	5,0±0,7	0,11	0,09
Трибенурон-метил + глина	6,7±1,8	5,3±2,4	1,9±0,2	5,3±1,6	5,7±1,1	0,80	0,29
Трибенурон-метил + торф	10,7±1,1	2,7±0,9	1,1±0,3	1,0±0,7	4,3±1,8	0,25	0,10

Особое внимание уделено выявлению и идентификации микроорганизмов - деструкторов полимера. Высев проб на плотные среды (метод прозрачных зон) (рисунок 3.19) из пленок обрастания, образующихся на поверхности образцов после экспонирования в почве, позволил выделить ключевые виды микроорганизмов-деструкторов исследуемых типов смесовых разрушаемых форм.

Впервые проведено выделение и идентификация первичных деструкторов П(ЗГБ) в смесях с различными природными материалами (глина, опилки, торф). Выделены и с применением молекулярно-генетических методов идентифицированы общие и специфические деструкторы для исследуемого набора образцов, среди которых 6 штаммов бактерий (таблица 3.7) и три штамма грибов. Последовательности нуклеотидов фрагментов генов, кодирующих

16S рНК для бактерий и 28S рНК для грибов депонированы в базе данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> под номерами МК300053-МК300061.

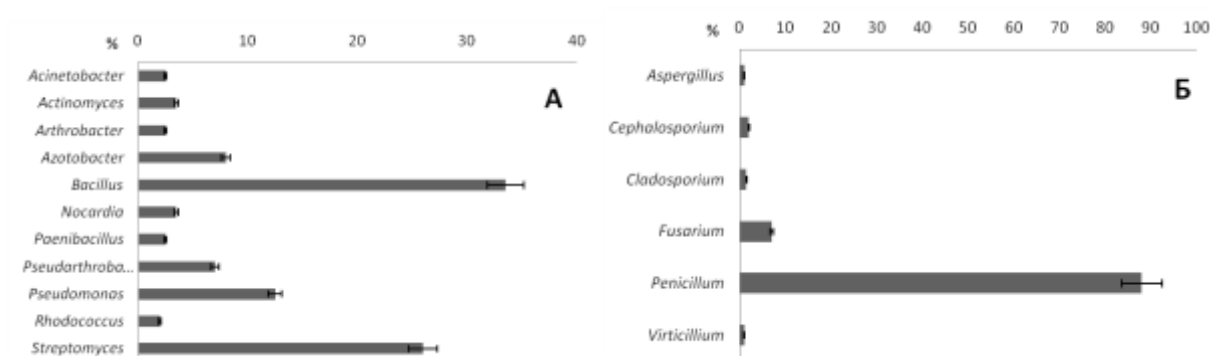


Рисунок 3.18 - Соотношение (%) доминирующих бактерий (А) и микромицетов (Б) в лабораторных почвенных микроэкосистемах после экспозиции экспериментальных форм препаратов

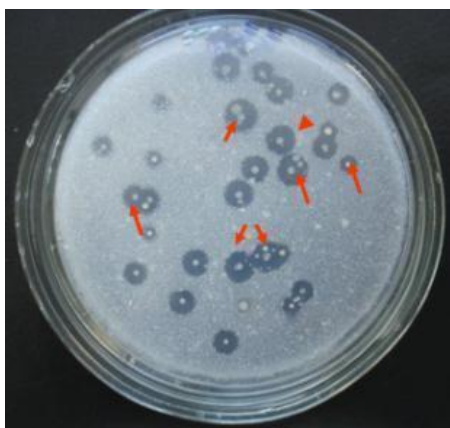


Рисунок 3.19 - Выявление микроорганизмов – деструкторов поли-3-гидроксибутирата, – проявление деполимеразной активности по образованию прозрачных зон (обозначены стрелками) на плотной диагностической среде с порошком полимера в качестве единственного источника углерода

Морфология бактерий-деструкторов представлена на рисунке 3.20-3.21; результаты выявления степени гомологии ключевых деструкторов П(ЗГБ), доминирующих в исследованных почвенных микроэкосистемах, с последовательностями, включенными в базу данных NCBI GenBank, даны в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Степень гомологии генов выделенных и идентифицированных ключевых деструкторов П(ЗГБ), доминирующих в исследованных почвенных микрэкосистемах, с последовательностями, включенными в базу данных NCBI GenBank

Штаммы	Штамм, уже существующий в базе данных NCBI (код)	Гомология
18-1	<i>Pseudomonas sp.</i> KOPRI-2 (MH018887), выделен из антарктической почвы; <i>Pseudomonas lini</i> S32005 (AB649011), выделен из почвы рисовых полей в Японии; <i>Pseudomonas sp.</i> KJF11-6 (JQ800176), морские бактерии из субарктического ледникового фьорда	99%
18-4	<i>Bacillus cereus</i> Хрq-15 (MK184559), выделен из ризосферы ячменя, стимулятор роста растений	100%
18-5	<i>Bacillus licheniformis</i> 55L2-1 (JN366759), выделен при анализе разных стадий промышленного процесса получения какао-порошка	100%
	<i>Bacillus licheniformis</i> SS1 (MF375465), выделен из сточных вод в Китае	99%
18-6	<i>Bacillus simplex</i> ИНВВ 9817 (KR085892), выделен из иловых отложений озера Сурай Тал, Индия <i>Bacillus butanolivorans</i> РНВ-7а (CP030926), выделен из почвы в США, метаболизирует пара-гидроксибензоат	99%
18-7	<i>Pseudarthrobacter sp.</i> МВ10 (KY445627), выделен из почвы в Южной Корее	99%
18-8	<i>Streptomyces sp.</i> SC002 (LC435667), выделен из почвы в Таиланде <i>Streptomyces parvulus</i> K-15 (KY038196), выделен из почвы в Китае, используется для синтеза наночастиц серебра <i>Streptomyces spectabilis</i> ССТСС М2017417 (KY604743), выделен из почвы в Китае	98%
FgD18-4	<i>Talaromyces purpureogenus</i> CBS 129768 (MH877076), штамм из коллекции Института биоразнообразия грибов Вестердейка, выделен в США, Канзас	99%
FgD18-5	<i>Penicillium chrysogenum</i> CBS 132211 (MH877436), штамм из коллекции Института биоразнообразия грибов Вестердейка, выделен в Нидерландах	100%
FgD18-18	<i>Talaromyces funiculosus</i> CBS 129801 (MH876987), штамм из коллекции Института биоразнообразия грибов Вестердейка, выделен в США, Висконсин	100%

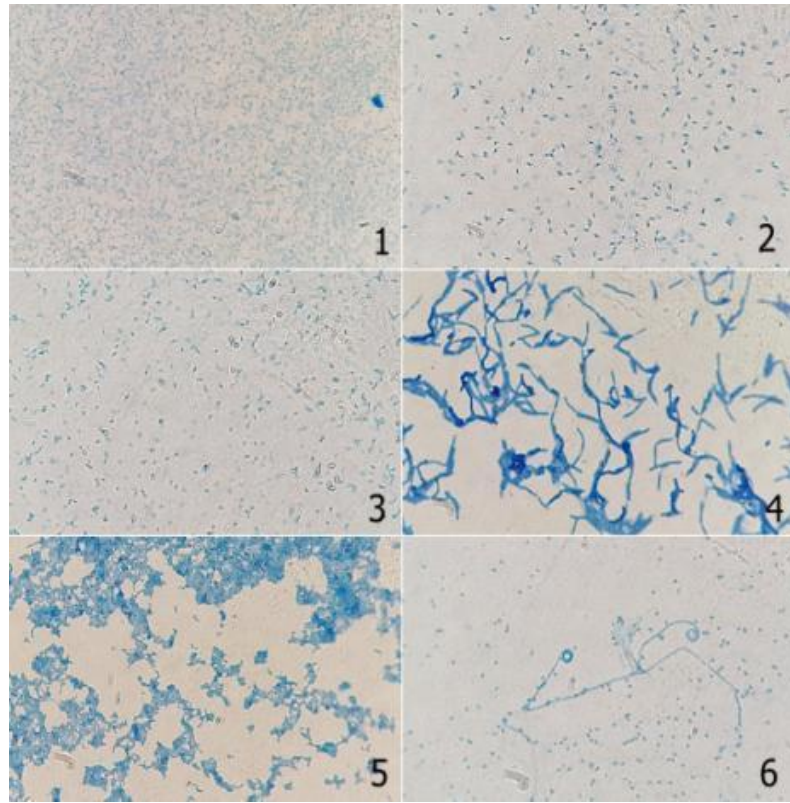


Рисунок 3.20 - Доминирующие виды бактерий-деструкторов П(ЗГБ): 1 – *Pseudomonas sp.* 18-1, 2 – *Bacillus cereus* 18-4; 3 - *Bacillus licheniformis* 18-5; 4 – *Bacillus simplex* 18-6; 5 – *Pseudarthrobacter sp.* 18-7; 6 – *Streptomyces sp.* 18-8

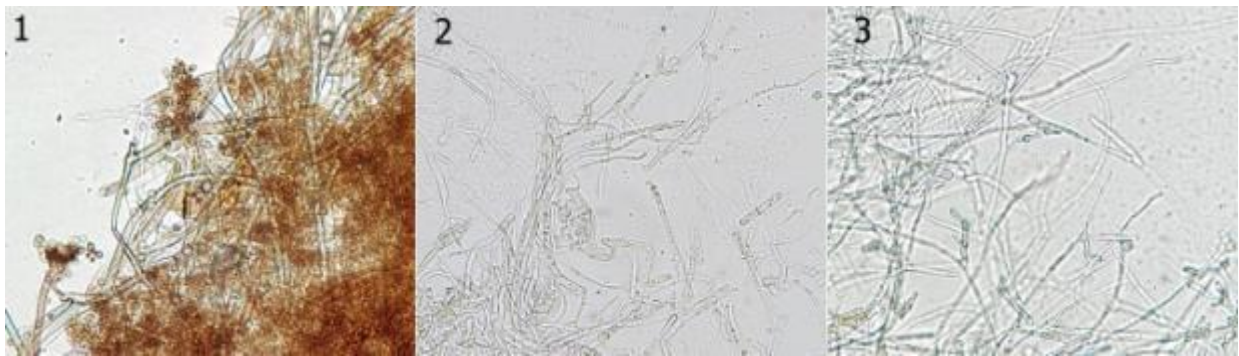


Рисунок 3.21 - Доминирующие виды грибов-деструкторов П(ЗГБ), выделенных с поверхности разработанных форм препаратов: 1 – *Talaromyces purpureogenus* FgD18-4, 2 – *Penicillium chrysogenum* FgD18-5, 3 – *Talaromyces funiculosus* FgD18-18

Филогенетический анализ с использованием данных нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК бактерий и 28S рНК грибов и наиболее близких культивируемых штаммов из GenBank представлен на рисунке 3.22 – 3.23.

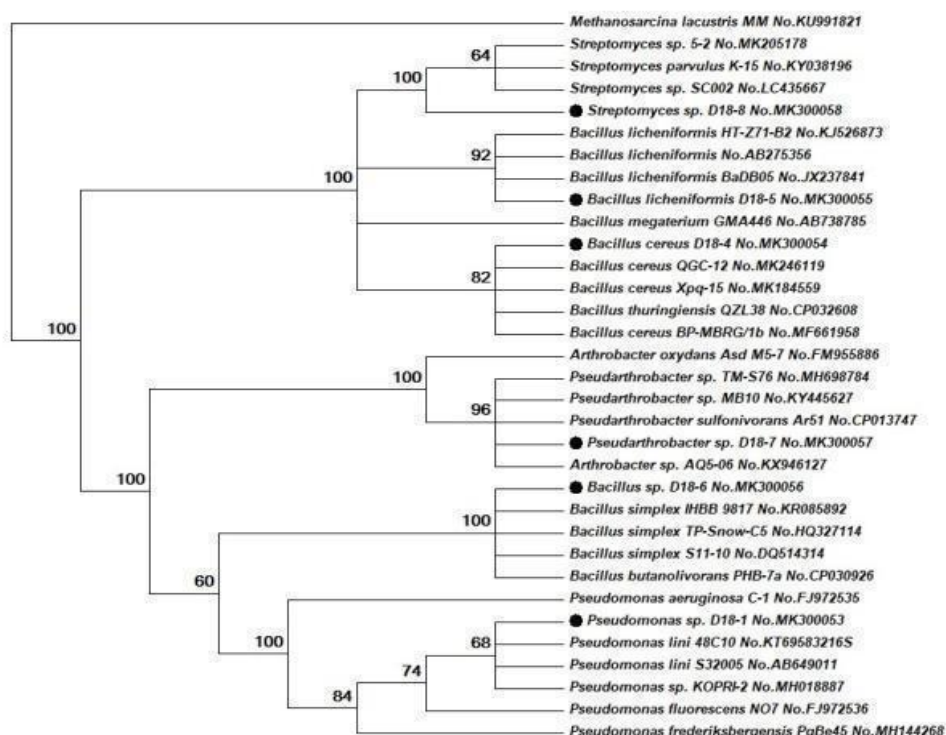


Рисунок 3.22 - Бескорневое филогенетическое древо, построенное на основе филогенетического анализа последовательностей гена 16S рНК бактерий-деструкторов П(ЗГБ). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа (значащими признаются значения больше 50). Штаммы деструкторов обозначены черным маркером

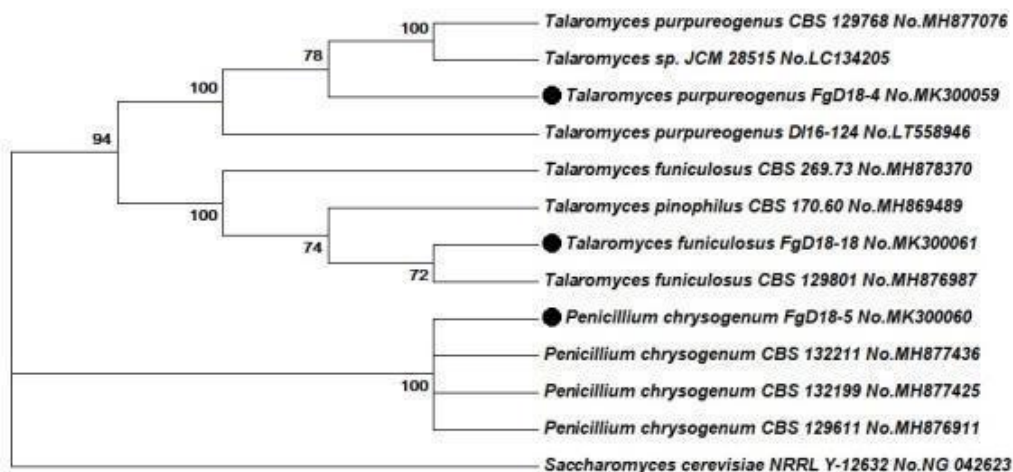


Рисунок 3.23 - Бескорневое филогенетическое древо, построенное на основе филогенетического анализа последовательностей гена 28S рНК грибов-деструкторов П(ЗГБ). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа (значащими признаются значения больше 50). Штаммы деструкторов обозначены черным маркером

Различия разрушаемости в почве исследованных форм препаратов отразились на выходе препаратов и их накоплении в почве. Как было отмечено выше, при описании характеристик исследуемых пестицидов, они значительно отличались по растворимости в воде, что влияло на динамику выхода из форм, особенно в начальный период наблюдения. Кроме этого, пестициды имели различную стабильность; среди них МЕТ - долгоживущий препарат; а ТРИБ - быстро инактивируемый. Поэтому содержание пестицидов в почве зависело не только от динамики выхода из форм, но также в значительной степени определялось их «временем жизни» в почве. Аналитические исследования замеров остаточных содержаний гербицидов в формах и в почве позволили получить результаты по динамике выхода этих препаратов из форм и накоплению в почве.

Результаты анализа выхода пестицидов из форм в виде гранул и таблетированных форм и их содержания в почве представлены на рисунках 3.24-3.25. Различия разрушения образцов в почве отразились на динамике выхода препаратов из них. На выход препаратов из форм в почву значительно влияли тип полученной формы (таблетированные формы или гранулы) и также состав смесовой основы, влияние которой, однако, было выражено в меньшей степени. Выход препаратов из гранул в целом был более активным, особенно в начальный период. Поэтому время достижения максимума концентрации действующих веществ в почве наступало значительно раньше, чем у таблетированных форм, как правило, уже через 10 суток после внесения гранул в почву. В то же время достижение максимума концентрации препаратов в почве при выходе их из таблетированных форм имело место на 30-40-е сутки. Динамика накопления препаратов в почве также была различной в зависимости от типа препаратов и их стабильности в почве. Важно отметить, что в целом даже при различной стабильности препаратов их содержание в почве в динамике наблюдения по большей части показало соответствие рекомендованным нормам.

Для кривых, отражающих динамику выхода веществ из форм, характерен более активный выход препаратов в начальный период, что связано, по всей видимости, с пассивным вымыванием гербицидов из форм и растворением во влажной почве (влажность почвы поддерживалась на уровне 50 %). Далее динамика выхода и содержания препаратов в почве выходила на плато, длительность которого у разных форм была различной. На этом этапе выход препаратов в большей степени был связан с разрушением полимерной основы. Однако при исследовании форм с нестабильными и быстро инактивируемым ТРИБ зона насыщения на кривых отсутствовала; после достижения максимума содержания этого гербицида в почве зафиксировано снижение этой величины в результате разрушения. Важно отметить, что депонированием препаратов в сформированную полимерную основу удалось обеспечить их

весьма длительный выход из форм, то есть наличие в почве в течение длительного периода (от 40 до 80 и более суток) даже для быстро инактивируемого трибенурон-метила.

При исследовании форм с хорошо растворимым в воде метрибузином в течение первой недели эксперимента в почву из таблетированных форм вышло от 20 до 30 % от включенного гербицида, в зависимости от состава смесовой основы, то есть типа филлера (рисунок 3.24). При этом из форм в виде гранул в эти сроки выход препарата составил до 60-65 %. Максимум выхода препарата в почву в случае таблетированных форм зафиксирован через 4-5 недель, когда концентрация препарата в почве достигла 50-80 мкг/г почвы, и поддерживалась на таком уровне в течение длительного времени, с незначительным спадом к концу эксперимента.

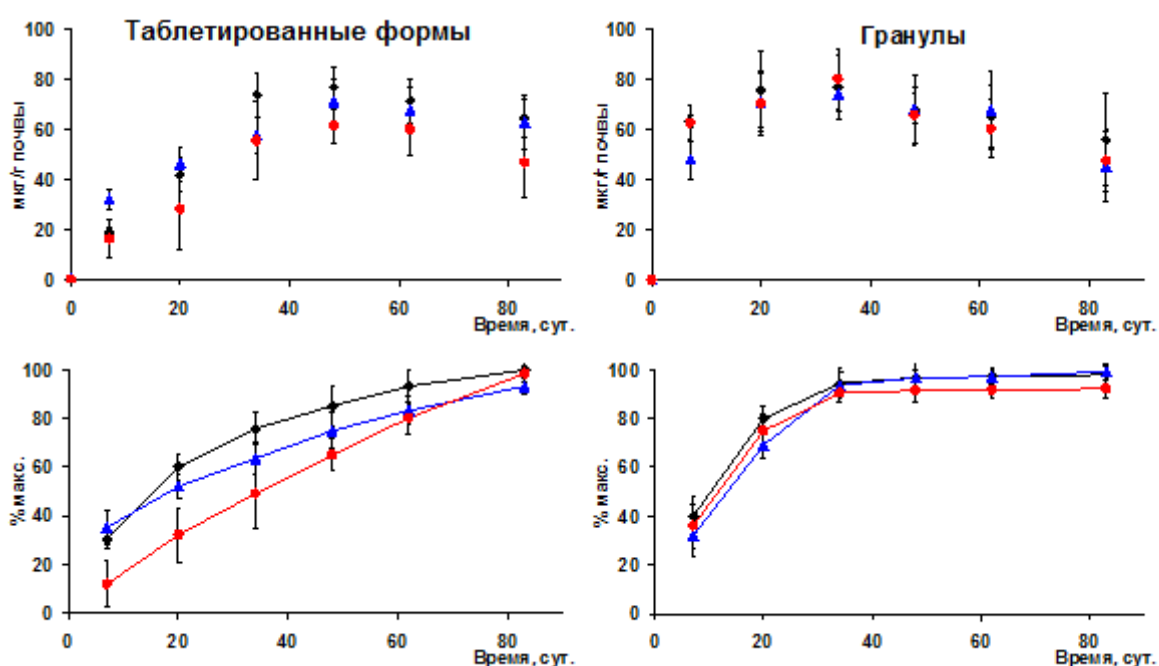


Рисунок 3.24 - Динамика выхода метрибузина (в % от депонированного) и концентрации в почве (мкг/г почвы) из таблетированных форм и гранул с различным типом наполнителя полимерной основы: черный – глина, красный – торф, синий – березовые опилки)

Остаточное содержание метрибузина в формах к концу эксперимента было крайне низким (не более 5-8 % от исходного), то есть практически весь депонированный препарат вышел в почву. Незначительное падение концентрации в сроки на 10-13 неделях связано, по всей видимости, с разрушением препарата, в том числе в результате деятельности микроорганизмов. По литературным данным время полураспада препарата в различных почвах может значительно варьировать, от 11 до 172 суток. В случае анализа выхода метрибузина из форм в виде гранул кривая иная, при этом максимумы выхода и содержания в почве зафиксированы значительно раньше (через полторы- три недели).

В случае с также хорошо растворимым трибенурон-метилом динамика выхода была иной (рисунок 3.25). Достижение максимума выхода препарата и его концентрации в почве из таблетированных форм и гранул различались примерно на 20-40 суток. На этот процесс оказывал влияние тип формы и состав полимерной основы. Для всех кривых, отражающих динамику выхода препарата, характерно отсутствие плато. После пиковой концентрации отмечено весьма резкое снижение, более выраженное для гранул. При этом на протяжении всего периода измерений содержание пестицида в почве составляло менее 10 % от исходного депонированного, порядка 6-7 мкг/г почвы и менее, несмотря на практически полный выход из форм. Это можно объяснять более быстрым распадом трибенурон-метила в почве по сравнению с метрибузином, что согласуется с литературными данными о времени полураспада этого препарата, составляющего 11–14 суток. В случае таблетированных форм наиболее высокие концентрации в почве (на уровне 6 мкг/г) зафиксированы при использовании в качестве наполнителей полимера глиной или торфом, тогда как выход гербицида из образцов из основы с опилками носил более плавный характер, поддерживаясь на уровне 2-3 мкг/г.

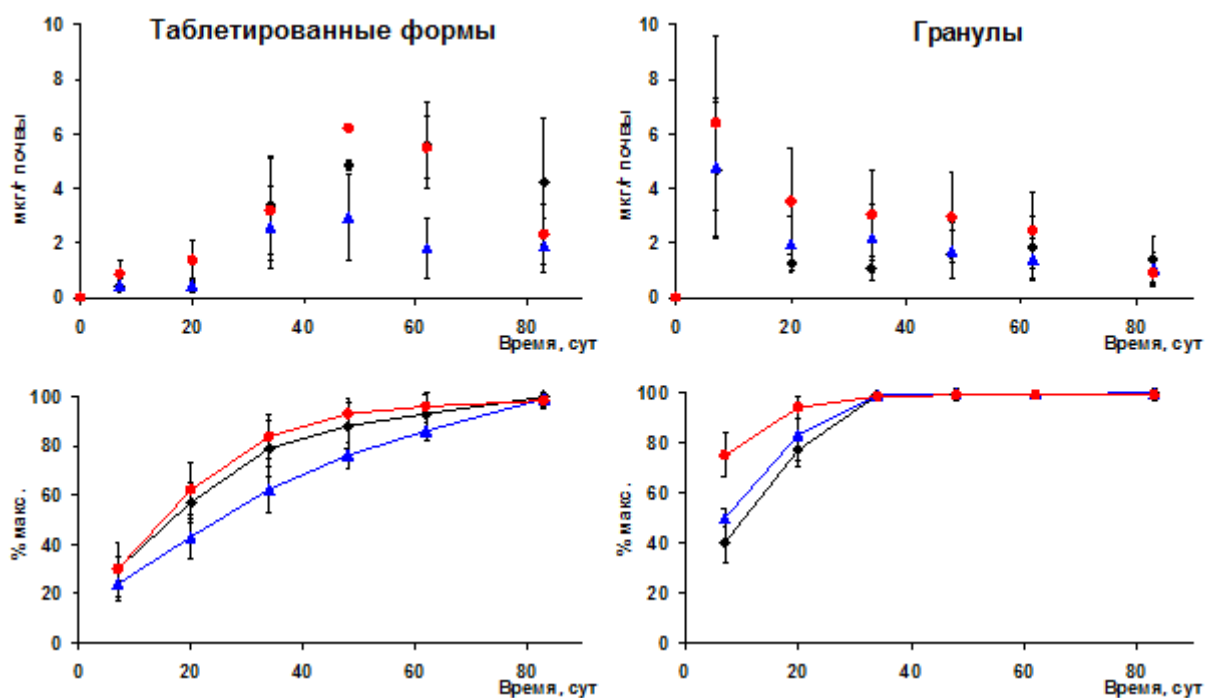


Рисунок 3.25 - Динамика выхода трибенурон-метила (в % от депонированного) и концентрации в почве (мкг/г почвы) из таблетированных форм и гранул с различным типом наполнителя полимерной основы: черный – глина, красный – торф, синий – березовые опилки)

Важно отметить, что наличие в почве весьма неустойчивого препарата на протяжении длительного времени показало эффективность применения разработанных форм для обеспечения пролонгированного эффекта трибенурон-метила.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

Для конструирования депонированных гербицидов осуществлен синтез разрушаемых полимеров (полигидроксиалканоатов, ПГА), исходя из необходимости повышения их доступности и удешевления. Для этого избран подход расширения сырьевой базы и привлечения глицерина - более дешевого углеродного субстрата по сравнению с сахарами, являющегося отходом крупнотоннажного производства биодизеля. Исследованы химический состав и физико-химические свойства полимера с применением хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией, ЯМР-спектроскопией, ВЭЖХ, X-Ray, ДСК. Отобраны и исследованы различные материалы, из которых получены в качестве основы для депонирования препаратов смеси. В качестве основного компонента смесовой основы использован разрушаемый полимер 3-гидроксимасляной кислоты (П(ЗГБ)) – представитель разрушаемых полигидроксиалканоатов (ПГА). Для удешевления форм привлечены материалы наполнители (филлеры) – доступные природные материалы (глина, торф, древесные опилки). Для конструирования долговременных форм отобраны системные препараты гербицидного действия, относящиеся по строению и спектрам действия к различным классам, различной химической структуры, широко применяемые в растениеводстве и допущенные к применению в РФ. Из сформированных и охарактеризованных смесей полимер/природный материал/гербицид сконструировано и охарактеризовано пионерное семейство пролонгированных препаратов гербицидного действия, пригодных для довсходового грунтового применения; получены экспериментальные формы в виде гранул и прессованных форм. Характер взаимодействия компонентов смесовой основы исследован с привлечением ИК-спектроскопии; свойства – методами ДСК, рентгеноструктурного анализа. Исследовано разрушение форм в почве с учетом структуры почвенного микробиоценоза; выделены и идентифицированы ключевые деструкторы полимера. Исследована динамика выхода действующих веществ в зависимости от геометрии формы, типа материала наполнителя и препарата. Показано, что все разработанные формы являются долговременными и способны обеспечивать доставку гербицидов растениям в течение периода вегетации. Исследование выхода действующих веществ в почву на фоне биоразрушения разработанных экспериментальных форм гербицидов показало более выраженное влияние на этот процесс геометрии формы (гранулы, таблетированные формы). В целом, показано, что депонирование препаратов в разработанную полимерную основу с медленно разрушаемым П(ЗГБ) и добавками природных материалов обеспечивает не только длительное функционирование форм в почве (от полутора до трех и более месяцев), но также позволяет стабилизировать активность быстро инактивируемого трибенурон-метила.

ГЛАВА 4 Исследование биологической эффективности экспериментальных форм препаратов гербицидного действия в лабораторных условиях

4.1 Сравнительное исследование эффективности подавления сорных растений различных видов свободными и депонированными формами гербицидов

Исследование эффективности действия разработанных долговременных форм гербицидных препаратов метрибузина (МЕТ) и трибенурон-метила (ТРИБ) проводили относительно их действия в свободном виде на серии сорных растений, повсеместно распространенных в посевах сельскохозяйственных культур, отличающихся анатомо-физиологическим строением, а также чувствительностью к гербицидным препаратам, и также в лабораторных посевах зерновых культур, зараженных сорняками. Сконструированные формы МЕТ и ТРИБ с соотношением смесовой основы (полимер/березовые опилки) и гербицид как 50/30/20 (масс. %) вносили в почву одновременно с семенами сорных растений. Растения выращивали в летнее время (июнь-июль) при естественном суточном цикле освещенности и комнатной температуре, которая изменялась от 18 °С (ночью) до 23–25 °С (днем), при влажности почвы на уровне 50–55 %. В ходе эксперимента проводили еженедельное фотодокументирование состояния растений; регистрировали время начала и массовости гибели сорных растений и сухо-воздушную биомассу. Для определения биологической эффективности гербицидов использовали количественные методы учета сорных растений.

В связи с исследованной динамикой разрушения исследуемых долговременных форм гербицидов и замедленного и постепенного выхода действующих веществ из форм и поступления к растениям (Глава 3, раздел 3.3.), существовало опасение, что свободные формы гербицидов будут превосходить по активности подавления сорняков депонированные формы. Поэтому первоочередным стало сравнительное исследование подавления сорных растений депонированными и свободными формами гербицидов. Гербицидная активность разработанных форм МЕТ и ТРИБ исследована в лабораторных культурах сорных растений различных видов: щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*), горчица полевая (*Sinapis arvensis*), щетинник-лисий хвост (*Setaria macrocheata*), гулявник Лезеля (*Sisymbrium loeselii*), нивяник (*Leucanthemum maximum*), овсюг обыкновенный (*Avena Fatula* L), эльсгольция реснитчатая (*Elsholtzia ciliata*).

Полученные результаты показали, что депонированные формы обоих гербицидов обладают выраженной гербицидной активностью по отношению ко всем исследованным

сорным растениям, и их действие сопоставимо с гербицидной активностью МЕТ и ТРИБ в свободной форме, а в ряде случаев превосходило таковую (рисунок 4.1).

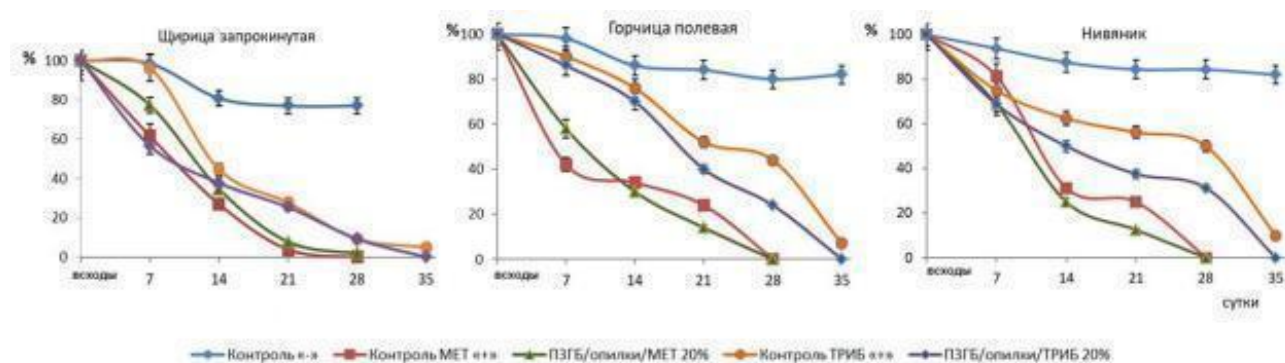


Рисунок 4.1 - Динамика гибели сорных растений: щирица запрокинутая, горчица полевая, нивяник; отрицательный контроль (интактные растения без внесения препаратов), положительный контроль (свободные метрибузин и трибенурон-метил; депонированные гербициды (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ и П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ)

Так, в эксперименте со щирицей, горчицей и нивяником показано, что оба гербицида подавляли все три сорняка; их гербицидная активность зафиксирована в срок на 7-е сутки; выявлено более выраженное гербицидное действие метрибузина по отношению к трем сорнякам по сравнению с трибенурон-метилом. Массовая гибель сорняков под действием МЕТ отмечена раньше в отличие от ТРИБ (на 14 сутки); численность щирицы, горчицы и нивяника под действием свободного и депонированного МЕТ не превышала 25–30 % от исходных количеств, а на 28-е сутки все растения погибли.

Влияние ТРИБ, независимо от его формы, по отношению к горчице и нивянику было несколько слабее действия МЕТ – массовая гибель обоих сорняков наступила позднее. Количество обоих сорных растений сократилось до 50–60 % в сроки 21 сутки, а еще через неделю (28 сутки) полной гибели сорняков, в отличие от вариантов с МЕТ, не отмечено. Остаточное количество сорняков оставалось на достаточно высоком уровне – минимально 25–35 %, максимально порядка 40–50 %. Помимо этого, зафиксирована достоверная разница гербицидной активности ТРИБ в зависимости от формы доставки. Более эффективной оказалась депонированная форма ТРИБ; при ее применении к 35 суткам все сорные растения погибли. В эти же сроки под действием свободного ТРИБ остаточное количество растений горчицы и нивяника оставалось на уровне 5-10 % от исходного (Volova et al., 2020a).

Эффективность гербицидного действия исследованных форм препаратов и выявленные различия между МЕТ и ТРИБ и форм их доставки наглядно иллюстрируют результаты фотодокументирования посевов сорных растений (рисунок 4.2-4.3). На фото видно, что под

действием МЕТ сорных растений к концу наблюдения не отмечено, в то время, как при применении ТРИБ погибли не все представители горчицы и нивяника, их остаточное количество различалось под действием свободного и депонированного ТРИБ.

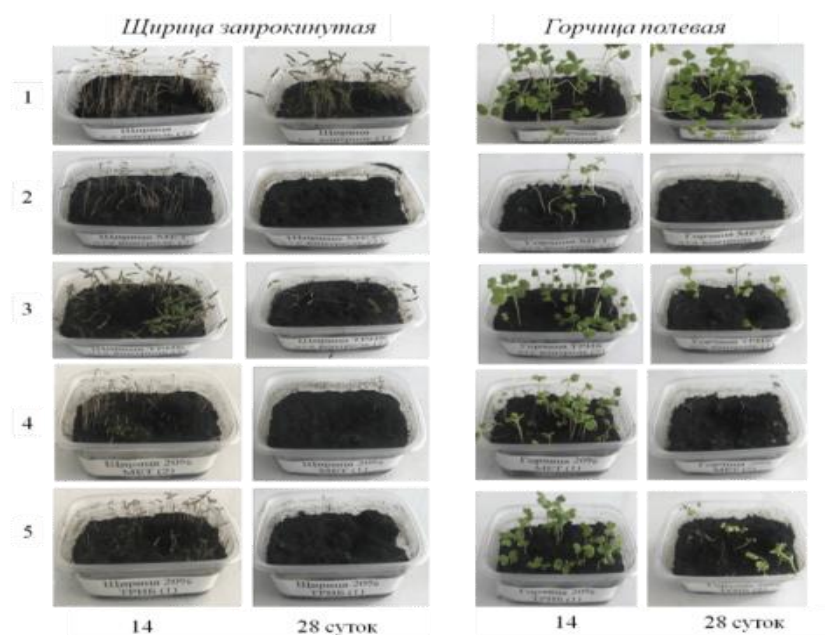


Рисунок 4.2 - Фото лабораторных культур сорных растений щирица запрокинутая и горчица полевая при различных способах доставки метрибузина и трибенурон-метила: 1 – отрицательный контроль; свободные гербициды: 2 – метрибузин и 3 – трибенурон-метил; экспериментальные формы: 4 – П(ЗГБ)/опилки/МЕТ и 5 – П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ (Volova et al., 2020a)

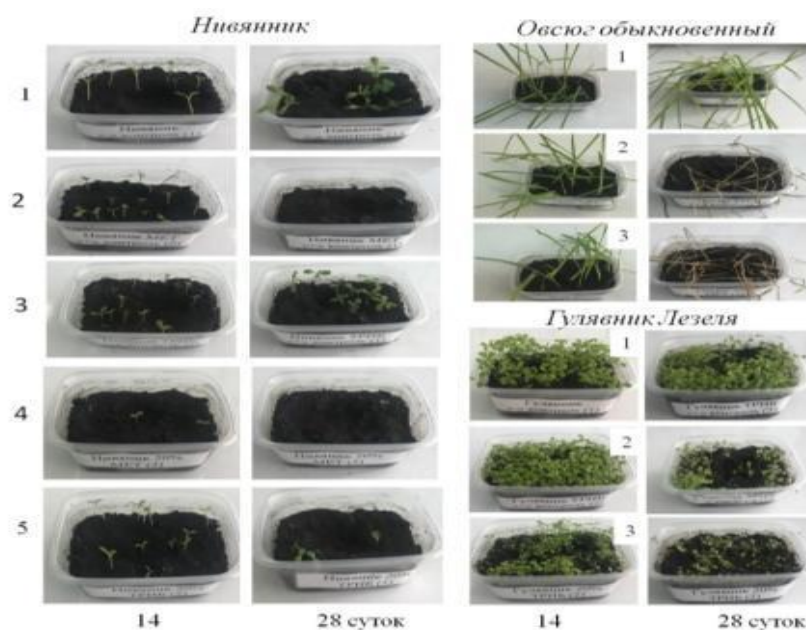


Рисунок 4.3 - Фото лабораторных культур сорных растений под действием различных форм гербицидов. Нивяник: 1 – негативный контроль; положительный контроль: 2 – метрибузин и 3 – трибенурон-метил; депонированные гербициды: 4 – П(ЗГБ)/опилки/МЕТ и 5 –

П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ. Овсяг: 1 – негативный контроль, 2 – положительный контроль (метрибузин), 3 – П(ЗГБ)/опилки/МЕТ. Гулявник Лезеля: 1 – негативный контроль, 2 – положительный контроль (трибенурон-метил), 3 – П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ (Volova et al., 2020a)

Результаты исследования гербицидного действия ТРИБ в свободной и депонированной формах в посевах эльсгольции и гулявника представлены на рисунке 4.4.

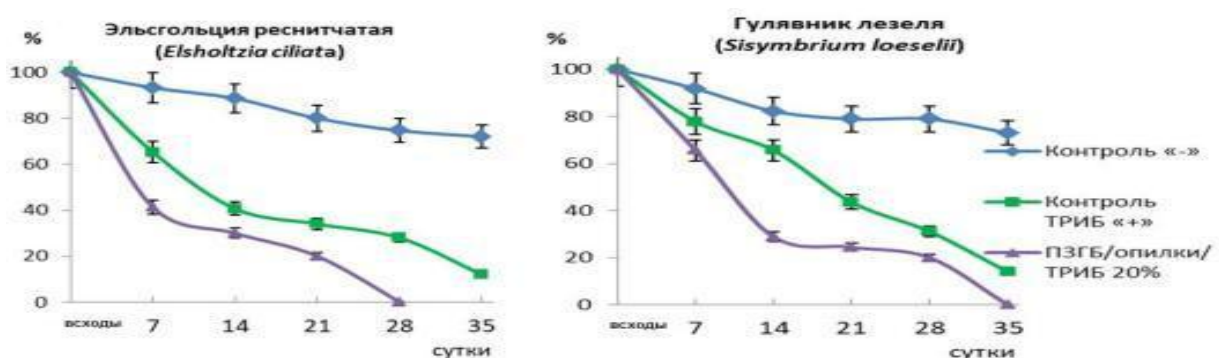


Рисунок 4.4 - Динамика гибели сорняков Эльсгольции реснитчатой и Гулявника Лезеля при действии двух форм трибенурон-метила: свободного (контроль «+») и депонированного (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ); контроль «-» – интактные растения без препаратов

Оказалось, что действие этих двух гербицидов в обеих формах сопоставимо по отношению к двум сорнякам. Гербицидный эффект депонированного ТРИБ проявился уже в сроки 7 суток; через 14 суток от посева отмечена массовая гибель эльсгольции и гулявника (численность погибших растений была близка к 50 %). В сроки 21 суток остаточное количество сорняков в варианте со свободной формой ТРИБ было на уровне 35–38 %; при использовании депонированного гербицида – порядка 20 %, то есть депонированный ТРИБ был несколько более активным по сравнению с его свободной формой. В сроки 28 суток все растения эльсгольции погибли при использовании депонированного ТРИБ; в случае свободной формы гербицида порядка 20 % сорняков оставались жизнеспособными. Действие ТРИБ по отношению к гулявнику было чуть слабее: на 28 сутки в случае свободной формы гербицида не погибло порядка 35 % растений; при использовании депонированного ТРИБ – порядка 18 %; полная гибель растений отмечена на 35 сутки. При свободной форме гербицида количество обоих сорняков в сроки 35 суток оставалось на уровне до 10 %.

В следующем варианте эффективность действия двух форм метрибузина исследована в культурах овсяга и щетинника (рисунок 4.5). Метрибузин активно подавлял оба сорняка, в особенности овсяг, количество которого было близко к нулевому уже на 21 сутки. В случае щетинника полная гибель растений наступила на 7 суток позднее. В обоих вариантах действие

депонированного МЕТ было эффективнее его свободной формы. Таким образом, депонирование МЕТ и ТРИБ не только не снижало гербицидную активность этих препаратов, но в ряде случаев повышало эффективность.

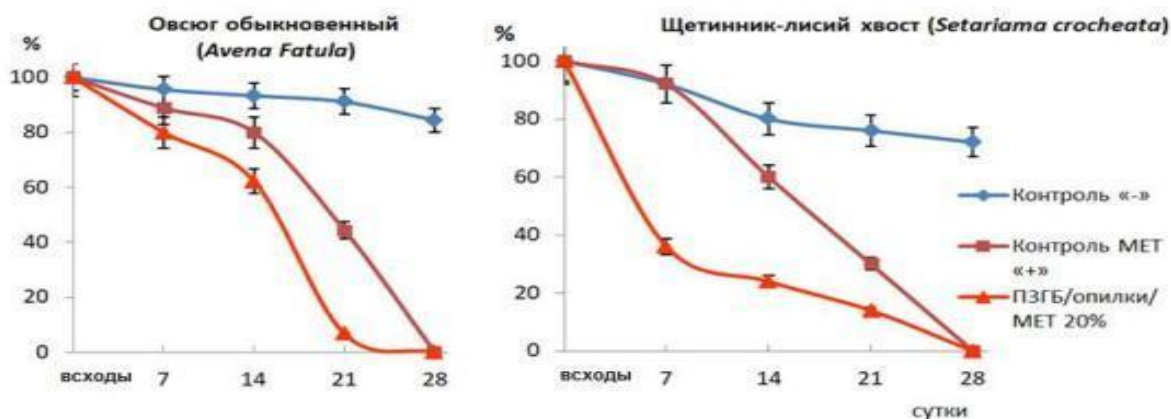


Рисунок 4.5 - Динамика гибели сорняков овсяга обыкновенного и щетинника - лисий хвост при действии двух форм метрибузина: свободного (контроль «+») и депонированного (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ); контроль «-» – интактные растения без препаратов

Анализ полученных результатов суммирован в таблице 4.1, в которой представлена динамика биологической эффективности, оцениваемой относительно численности сорняков в отрицательном контроле для двух экспериментальных депонированных форм: метрибузина (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ) и трибенурона-метила (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ) в сравнении с действием их свободных форм.

Таблица 4.1 - Биологическая эффективность депонированных форм метрибузина (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ) и трибенурон-метила (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ) в сравнении с действием свободных форм

Образец	Биологическая эффективность $S_{испр}$, %			
	Сутки	14	21	28
Щирица запрокинутая (<i>Amaranthus retroflexus</i>)				
Контроль МЕТ «+»		66,7	95,0	100,0
Контроль ТРИБ «+»		44,8	64,0	88,0
ПЗГБ/опилки/МЕТ 20 %		57,1	90,0	97,5
ПЗГБ/опилки/ТРИБ 20 %		53,3	67,0	92,0
Горчица полевая (<i>Sinapis arvensis</i>)				
Контроль МЕТ «+»		60,5	71,4	100,0
Контроль ТРИБ «+»		11,6	38,1	45,0
ПЗГБ/опилки/МЕТ 20 %		65,1	83,3	100,0
ПЗГБ/опилки/ТРИБ 20 %		18,6	52,4	70,0
Нивяник (<i>Leucanthemum maximum</i>)				
Контроль МЕТ «+»		64,3	70,4	100,0

Контроль ТРИБ «+»	28,6	33,3	40,7
ПЗГБ/опилки/МЕТ 20 %	71,4	85,2	100,0
ПЗГБ/опилки/ТРИБ 20 %	42,9	55,6	63,0
Щетинник-лисий хвост (<i>Setaria macrocheata</i>)			
Контроль МЕТ «+»	25,0	60,5	100,0
ПЗГБ/опилки/МЕТ 20 %	70,0	81,6	100,0
Овсяг обыкновенный (<i>Avena Fatula L</i>)			
Контроль МЕТ «+»	14,3	51,2	100,0
ПЗГБ/опилки/МЕТ 20 %	33,3	92,7	100,0
Гулявник Лезеля (<i>Sisymbrium loeselii</i>)			
Контроль ТРИБ «+»	20,3	44,8	60,6
ПЗГБ/опилки/ТРИБ 20 %	64,9	69,0	74,6
Эльсгольция реснитчатая (<i>Elsholtzia ciliata</i>)			
Контроль ТРИБ «+»	54,1	57,5	62,5
ПЗГБ/опилки/ТРИБ 20 %	66,2	75,0	100,0

Установлено, что биологическая эффективность депонированного метрибузина составляет на 28 сутки 100 % в посевах 5-ти исследованных сорняков (щирца, горчица, нивяник, овсяг, щетинник). Это сопоставимо с действием МЕТ в свободной форме по отношению ко всем перечисленным сорнякам. Биологическая эффективность депонированного трибенурон-метила в целом была несколько ниже депонированного МЕТ и составила в сроки 28 суток 100 % только по отношению к эльсгольции; немного ниже (97,1 и 74,6 %), соответственно, для щирцы и гулявника; 63 % для нивяника и 70 % для горчицы. Гербицидная активность свободной формы ТРИБ уступала депонированной; ее биологическая эффективность составила на 28 сутки 88,0 % только для щирцы; 62,5 для эльсгольции; 60,6 для гулявника и чуть более 40 % для горчицы и нивяника. Несколько сниженную гербицидную активность ТРИБ, составившую в ряде случаев 100 % на 35 сутки, то есть несколько позднее, чем МЕТ, можно связать с известными данными о том, что этот гербицид активно метаболизируется в тканях высших растений до нетоксичных для растений форм. Поэтому весьма важным является показанная возможность усиления его действия в результате депонирования (Volova et al., 2020a).

В целом, эксперименты показали, что депонирование исследованных гербицидов не только не снижает их активности по отношению к исследуемым видам сорных растений, но также усиливает их действие. Полученные положительные результаты позволили перейти к более сложным экспериментам – исследованию гербицидного эффекта разработанных форм гербицидов в лабораторных посевах зерновых культур, зараженных сорняками.

4.2 Сравнительное исследование эффективности действия свободных и депонированных форм гербицидов в лабораторных посевах зерновых культур, зараженных сорняками

Серия экспериментов включала посеvy яровой пшеницы сорт «Новосибирская 15» и ячменя сорт «Биом», зараженных сорняками, семена которых вносили в почву одновременно с посевами культурного растения. На рисунке 4.6 показаны фото посевов пшеницы, выращиваемой в лабораторных условиях в полевой почве при внесении в почву свободной и депонированной форм трибенурон-метила. На рисунке 4.7 показано, что на 14 сутки количество сорняков резко сократилось в положительном контроле и в экспериментальной группе. В сроки 21 сутки под действием депонированной формы ТРИБ количество сорняков не превышало 10 % от исходной величины. Этот показатель в группе положительного контроля (свободная форма гербицида) был выше (порядка 30 %). Далее (28–35 сутки) в экспериментальной группе отмечена массовая гибель сорного растения; при использовании свободной формы ТРИБ результат несколько уступал; в конце наблюдения (на 42 сутки) остаточное количество сорняков оставалось на уровне 20 % (Петровская, 2021б).

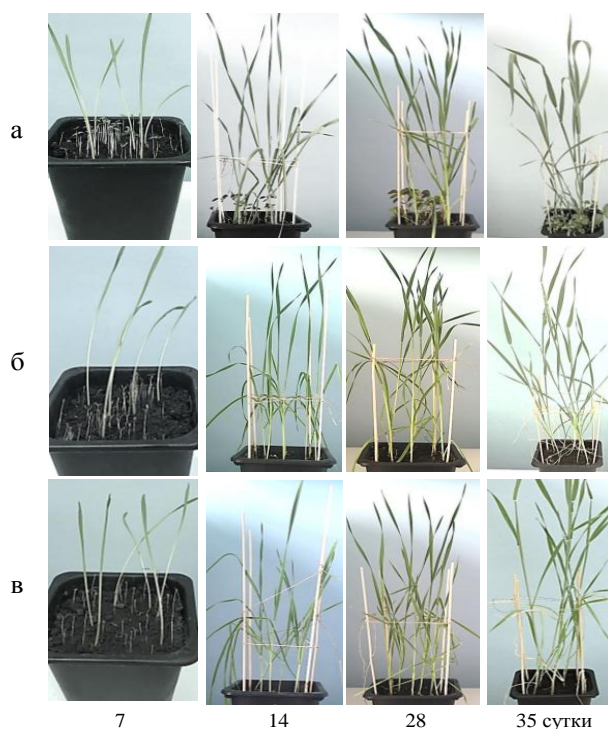


Рисунок 4.6 - Фото лабораторных посевов пшеницы яровой, зараженной щирицей: а – отрицательный контроль; б – положительный контроль (свободный трибенурон-метил); в – экспериментальная форма трибенурон-метила (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ)

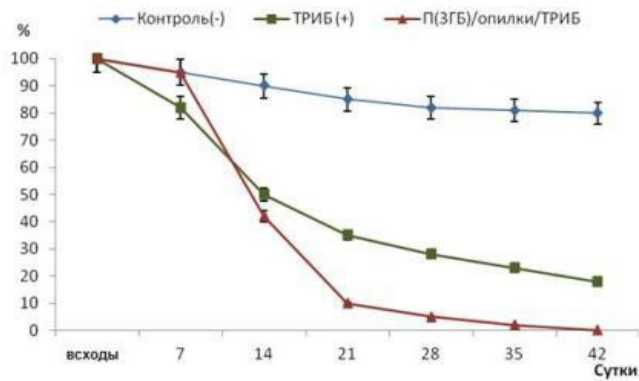


Рисунок 4.7 - Динамика гибели сорняка щирица запрокинутая в лабораторных посевах яровой пшеницы под действием свободной формы трибенурон-метила (ТРИБ+) и экспериментальной формы (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ) (Петровская, 2021б)

Биологическая эффективность свободной и экспериментальной форм ТРИБ, оцениваемая по остаточному количеству сорных растений в этих группах относительно отрицательного контроля составила на 42 сутки эксперимента, соответственно, 80,3 и 99,5 %, то есть подавление сорняков было несколько более активным при использовании депонированной формы ТРИБ по сравнению с применением его в свободной форме (таблица 4.2).

Показатели роста и развития лабораторных посевов пшеницы представлены в таблице 4.3. 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 микросистемы 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. Однако с учетом исследования посевов в стабилизированном режиме в климатических камерах, включая два злака (пшеница и ячмень), варианты опытов (3–5) и количество повторностей в каждом варианте (не менее трех), в отдельных экспериментах было задействовано по 60–90 и более контейнеров, что не позволило применять емкости большего объема.

В начальные сроки наблюдения (от всходов до начала фазы кушения) 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 и показателям стеблестоя, при использовании депонированной формы П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ составили, соответственно, 156,0 г/м² и 67,2 см, а в положительном контроле несколько ниже – 147,4 г/м² и 62,1 см. Таким образом, депонирование ТРИБ в разработанную разрушаемую и смесовую основу не снижало его гербицидной активности, более того, экспериментальная форма трибенурон-метила по отношению к сорняку щирце запрокинутой оказалась эффективнее свободной формы этого гербицида.

Таблица 4.2 - Биологическая эффективность $S_{испр}$ (%) свободной и депонированной форм трибенурон-метила в лабораторных посевах яровой пшеницы

Форма гербицида	Сроки эксперимента, сутки			
	14	21	28	42
Контроль ТРИБ «+»	36,4	58,3	69,9	80,3
П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	40,3	89,6	97,3	99,5

Таблица 4.3 - Показатели надземной биомассы пшеницы в лабораторных посевах при различных способах доставки гербицида трибенурон-метила

Варианты опыта	Высота растения, см	Воздушно-сухая биомасса надземной части, г/м ²
Всходы (7 суток)		
Контроль «-»	22,4±0,1	22,6±1,8
Контроль ТРИБ «+»	21,7±0,2	20,5±2,0
П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	22,25±1,7	21,9±1,4
Появление 2-3 листа (14 суток)		
Контроль «-»	27,7±2,7	40,1±3,9
Контроль ТРИБ «+»	28,7±2,5	42,8±5,4
П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	27,7±2,6	43,1±4,6
Кущение (28 суток)		
Контроль «-»	39,3±4,0	78,5±3,9
Контроль ТРИБ «+»	40,6±6,2	80,8±5,5
П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	41,8±5,1	83,5±7,4
Выход в трубку (42 суток)		
Контроль «-»	51,6±4,6	123,5±10,4
Контроль ТРИБ «+»	62,1±4,9	147,4±9,8
П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	67,2±4,8	156,0±10,4

Условия следующего эксперимента, в котором исследовали депонированную форму гербицида метрибузина, были более жесткими. В качестве сорняка был взят овсюг, биомасса которого сопоставима с биомассой пшеницы, при этом количество семян сорняка превосходило количество семян пшеницы при засеве более, чем в три раза (соотношение овсюг:пшеница по количеству семян составило 20:6). Фото лабораторных посевов яровой пшеницы, зараженных овсюгом, представлено на рисунке 4.8; динамика гибели сорняка овсюга обыкновенного в

лабораторных посевах яровой пшеницы под действием свободной формы метрибузина (Контроль MET+) и экспериментальной формы (П(ЗГБ)/опилки/MET) – на рисунке 4.9, из которого следует, что, несмотря на жесткие условия эксперимента, MET в обеих формах подавлял развитие овсяга, при этом – более активно – при использовании депонированной формы. Резкая гибель сорняка зафиксирована в сроки 28 суток, когда погибло свыше 50 % под действием свободного MET и более 80 % – в случае применения депонированного гербицида. Далее в течение длительного срока (до 84 суток) количество сорняков не изменилось при использовании свободного MET. Напротив, при использовании депонированной формы гербицида количество растений сорняка не превышало 10 %, а к 70 суткам – практически все растения погибли.



Рисунок 4.8 - Фото лабораторных посевов пшеницы яровой, зараженной сорняком овсяг обыкновенный: а – отрицательный контроль (растения без гербицида); б – положительный контроль (свободный метрибузин); в – экспериментальная форма метрибузина, депонированного в разрушаемую основу (П(ЗГБ)/опилки/MET)

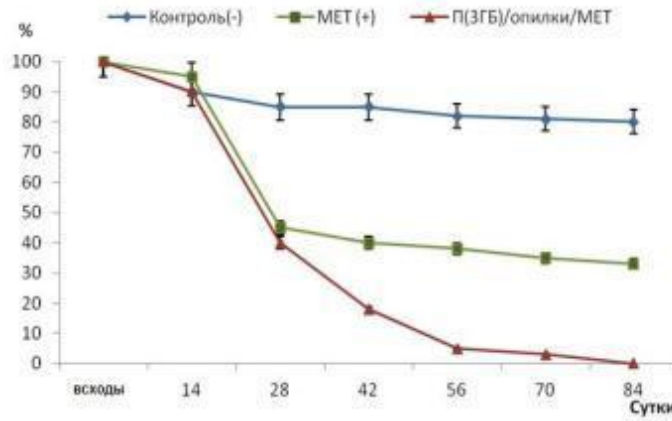


Рисунок 4.9 - Динамика гибели сорняка овсюг обыкновенный в лабораторных посевах яровой пшеницы под действием свободной формы метрибузина (Контроль МЕТ+) и экспериментальной формы (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ)

Результаты определения биологической эффективности двух форм МЕТ представлены в таблице 4.4, из которой следует, что биологическая эффективность депонированного МЕТ составляет 100 % по отношению к злостному сорняку – овсюг; при его свободной форме результат был значительно слабее (64,7 %). Таким образом, в случае депонирования МЕТ его пролонгированная форма обеспечивает постепенный и продленный выход метрибузина, значительно повышая эффективность этого гербицида.

Таблица 4.4 – Биологическая эффективность $S_{испр}$ (%) свободной и депонированной форм метрибузина в лабораторных посевах яровой пшеницы

Форма гербицида	Сроки эксперимента, сутки				
	14	21	28	42	84
Контроль МЕТ «+»	7,4	47,1	52,9	58,8	64,7
П(ЗГБ)/опилки/МЕТ	8,6	52,9	82,4	94,1	100,0

Эффективность свободных и депонированных форм метрибузина и трибенурон-метила исследована в лабораторных посевах ячменя, зараженных одновременно двумя сорными растениями (щирца запрокинутая и горчица полевая). Условия проведения эксперимента и сравнительная оценка действия двух различных гербицидов и формы их доставки растениям соответствовали описанным выше. Длительность эксперимента составила 35 суток; фото зараженных сорняками посевов ячменя и результаты динамики гибели сорняков представлены на рисунке 4.10-4.11. Как следует из рисунка 4.11, действие обеих форм МЕТ было сопоставимо ранее выполненным экспериментам (раздел 4.1) и более сильным по сравнению с ТРИБ. Гибель обоих сорных растений (щирцы и горчицы) под действием свободного и депонированного МЕТ имела место уже на 7-е сутки; массовая гибель (половина и более растений погибли)

зафиксирована на 14-е сутки; на 21 и 25-е сутки, соответственно, отмечена гибель всех растений под действием обеих форм МЕТ, то есть в эти сроки обе формы МЕТ проявили 100% биологическую эффективность по отношению к двум исследованным сорнякам. Действие ТРИБ несколько уступало метрибузину: на 14-е сутки количество сорных растений щиряцы запрокинутой и горчицы полевой превышало показатели с обеими формами МЕТ; при этом депонированная форма ТРИБ была эффективней свободного гербицида; тем не менее, в сроки 28-30 суток все сорные растения погибли, что подтверждает высокую гербицидную активность депонированных гербицидов.

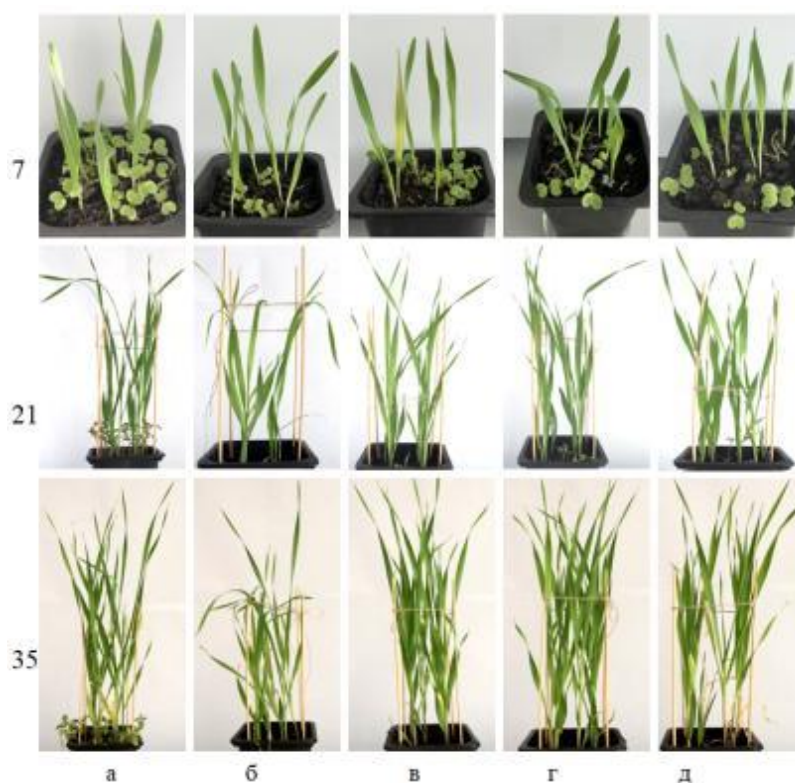


Рисунок 4.10 - Фото лабораторных посевов ячменя, зараженных сорными растениями щиряца запрокинутая и горчица полевая при использовании различных форм метрибузина и трибенурон-метила: а – отрицательный контроль; б – положительный контроль (свободный метрибузин); в – экспериментальная форма метрибузина (П(ЗГБ)/опилки/МЕТ); г – положительный контроль (свободный трибенурон-метил); д – экспериментальная форма трибенурон-метила (П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ)

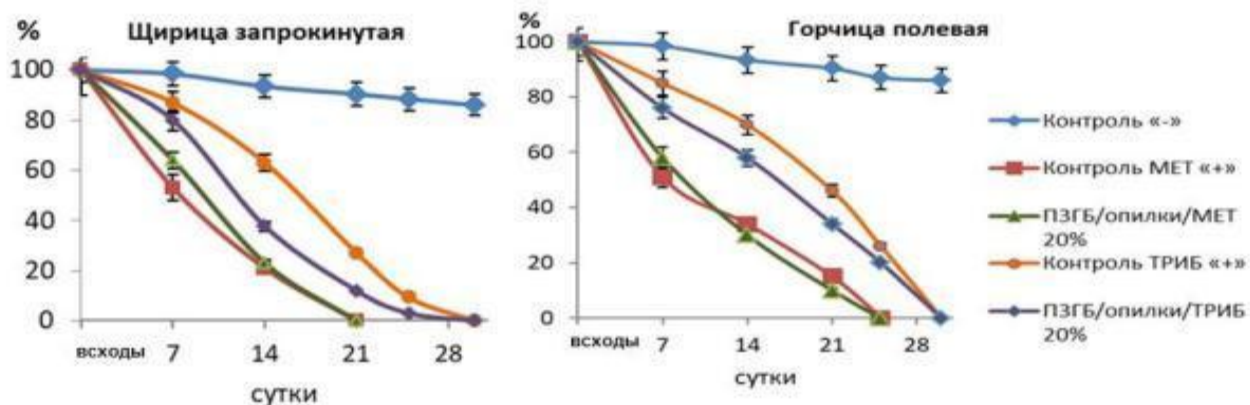


Рисунок 4.11 - Динамика гибели сорных растений щирица запрокинутая и горчица полевая в лабораторных посевах ячменя под действием свободных и депонированных форм метрибузина П(ЗГБ)/опилки/MET и трибенурон-метила П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ; отрицательный контроль – интактные растения, выращиваемые без гербицидов

Таким образом, выполненные исследования свидетельствуют о том, что разработанные пионерные формы гербицидов за счет депонирования в основу из разрушаемого поли-3-гидроксипутирата эффективны при довсходовом грунтовом применении в культурах зерновых, зараженных сорняками различных видов.

4.3 Исследование функциональной активности фотосинтетического аппарата высших растений и нарушений в синтезе хлорофилл-белковых комплексов под воздействием гербицидов

Для выявления механизма повреждающего действия гербицидов использована флуоресценция хлорофилла, которая позволяет оценивать потенциальную продуктивность и структурную организацию фотосинтетического аппарата растений, проводить раннюю диагностику повреждения листовой; оценивать устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды, выявлять ранние нарушения синтеза хлорофилл-белковых комплексов. Использовали метод индукции флуоресценции хлорофилла и флуориметрию с амплитудно-импульсной модуляцией (РАМ), которые являются наиболее показательными и часто используемыми в экотоксикологических исследованиях. Метод индукции флуоресценции хлорофилла благодаря скорости, информативности и высокой чувствительности широко применяется в мировой практике для определения фотосинтетической активности растений как показателя их физиологического состояния.

В серии экспериментов с различными видами сорных растений, выращиваемых в почвенной лабораторной культуре при внесении в почву метрибузина и трибенурон-метила в

свободной и депонированной формах (П(ЗГБ)/древесные опилки/гербицид), позволило получить картину реакции фотосинтетического аппарата растений на действие свободных и депонированных форм гербицидов. Влияние форм МЕТ исследовано в посевах горчицы (*Sinapis arvensis*), щирицы (*Amaranthus retroflexus*), нивяника (*Leucanthemum maximum*), овсяга обыкновенного (*Avena fatua*) и щетинника Лисий хвост (*Setaria*). Свободный и депонированный ТРИБ исследован в культурах горчицы полевой (*Sinapis arvensis*), щирицы запрокинутой (*Amaranthus retroflexus*), нивяника (*Leucanthemum vulgare*), эльсгольции (*Elsholtzia*), гулявника (*Sisymbrium*). Длительность экспериментов составила максимально до 35 суток; реперные точки – 14 и 21 для растений, погибших в течение 28 суток; 14, 21 и 28 суток – для растений, погибших в более поздние сроки (35 суток).

Результаты исследования параметров флуоресценции хлорофилла у сорняков различных видов при использовании свободного и депонированного метрибузина относительно отрицательного контроля представлены на рисунке 4.12. Результаты свидетельствуют о сильном ингибирующем действии обеих форм МЕТ (свободного и депонированного) на фотосинтетический аппарат всех исследуемых сорняков. На 14 сутки значения исследуемых параметров флуоресценции ($Y(II)_{max}$ и ETR_{max}) упали у различных видов от 2-х до 8-ми раз по отношению к отрицательному контролю. Далее оба показателя продолжали снижаться, их значения на 21 сутки были практически на нулевом уровне (Volova et al., 2020a). Такое резкое ингибирование фотосинтетической активности растений метрибузином можно объяснить известными данными о негативном действии этого триазинового гербицида на реакции фотосинтеза (Preisler et al., 2019).

Показано, что применение метрибузина, независимо от формы его доставки растениям, останавливает ключевые процессы фотохимии у исследуемых сорных растений, и это ярко иллюстрируется динамикой показателей фотосинтетической активности – $Y(II)_{max}$, ETR_{max} и $Y(NPQ)_{max}$. В целом, впервые показано, что применение МЕТ, как в свободной форме, так и в депонированном виде, оказывает сильное ингибирующее действие на фотосинтетический аппарат сорняков, то есть депонирование МЕТ в разработанную разрушаемую основу П(ЗГБ)/филлер, не снижает его выраженного гербицидного эффекта.

Результаты исследования трибенурон-метила по фотосинтетической активности сорных растений дали более сложную и неоднозначную картину. Как известно, гербициды на основе сульфонилмочевины, содержащие ТРИБ в качестве активного вещества, не оказывают прямого действия на систему фотосинтеза, но влияют на функционирование фермента ацетолататсинтаза (ALS). В чувствительных к таким гербицидам сорных растениях блокируется действие фермента ALS и ингибируется стадия синтеза аминокислот с разветвленной цепью (BCAA) (это лейцин, валин и изолейцин). Негативное действие

сульфонилмочевин, ингибирующих ALS, сопровождается хлорозом, некрозом и задержкой роста растений. Несмотря на то, что производные сульфониломочевины напрямую не ингибируют процесс фотосинтеза, их активность может ухудшать эффективность фотосинтетического аппарата (Preisler et al., 2019).

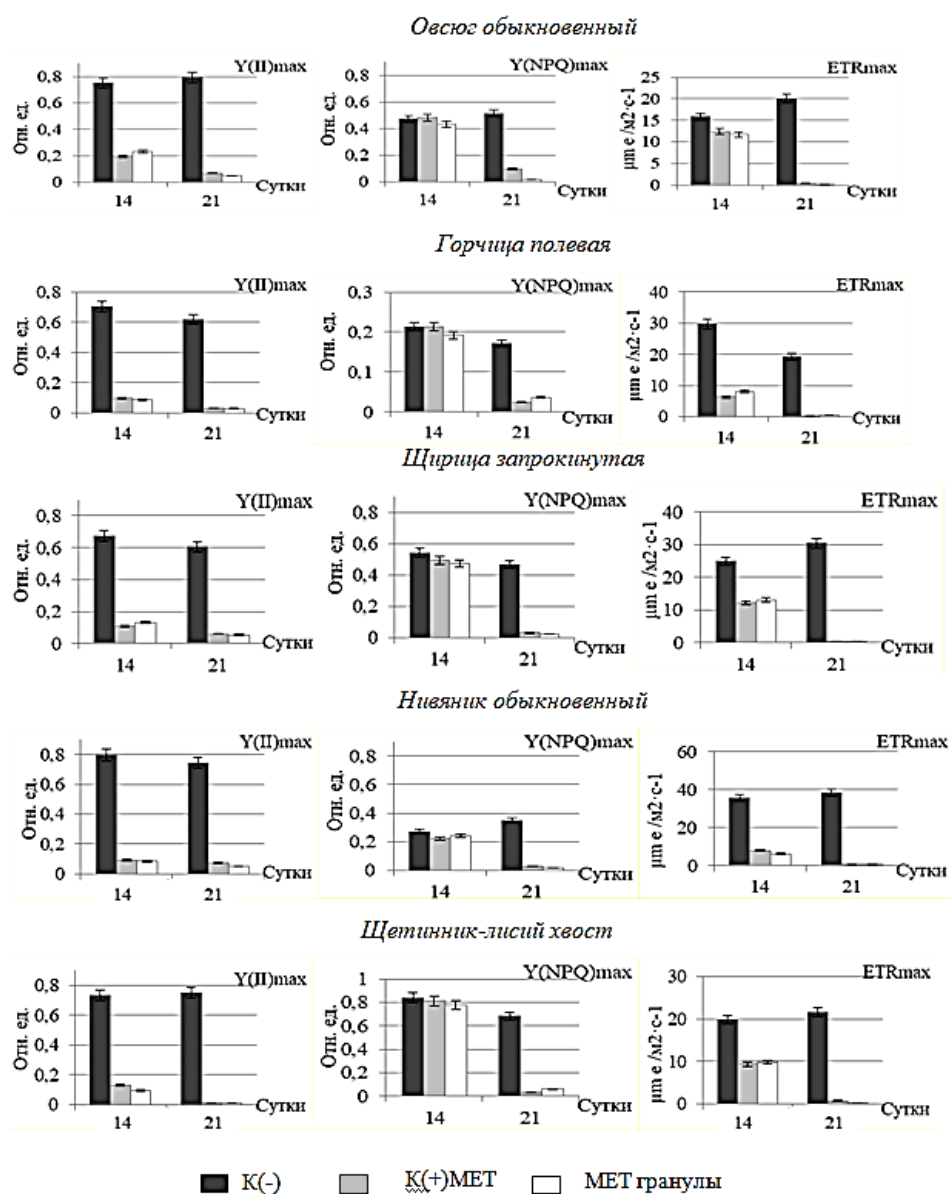


Рисунок 4.12 - Изменение показателей флуоресценции хлорофилла у сорных растений различных видов под воздействием различных форм метрибузина: (K+) – положительный контроль (свободный MET); (MET гранулы) – экспериментальная форма депонированного гербицида П(ЗГБ)/опилки/MET; (K-) - отрицательный контроль (интактные растения)

Результаты измерения параметров флуоресценции хлорофилла в растениях горчица полевая, щирица запрокинутая, нивяник обыкновенный, эльсгольция реснитчатая и гулявник Лезеля под действием свободной и депонированной форм трибенурон-метила представлены на

рисунке 4.13. Результаты, в отличие от полученных при обработке сорных растений метрибузином, показывают различные ответные реакции фотосинтетического аппарата исследуемых растений на действие трибенурон-метила. Различия заключаются в количестве параметров флуоресценции, на которые гербицид оказал влияние, силе ответного гербицидного стресса, а также разнонаправленном воздействии на исследуемые величины у растений.

В опытах с горчицей полевой и щирицей запрокинутой зафиксировано значительное ингибирующее влияние гербицида на фотосинтез и уменьшение значений $Y(II)_{max}$ и ETR_{max} . При этом фотоактивность растений горчицы полевой оказалась наименее устойчивой к воздействию трибенурон-метила из всех исследованных сорных растений, следующим был гулявник. У горчицы показатели $Y(II)_{max}$ и $Y(NPQ)_{max}$ в отличие от ETR_{max} значительно снижались уже на 14 сутки эксперимента при применении свободной формы ТРИБ. В тоже время величины $Y(II)_{max}$, $Y(NPQ)_{max}$ и ETR_{max} в опытах с щирицей запрокинутой мало изменялись на протяжении эксперимента, близкий результат получен для нивяника. Снижения параметра $Y(II)_{max}$ позволяет говорить о сильном разрушении фотосинтетического аппарата у щирицы и, в особенности, у горчицы (Volova et al., 2020a). Наблюдаемое снижение параметров фотосинтеза $Y(II)$ и ETR может быть также напрямую связано с окислительным стрессом по причине высокой концентрации перекиси водорода, являющейся сильным ингибитором фотосинтеза, а также необратимой инактивацией реакционных центров, поскольку максимальный фотохимический выход $Y(II)$ является показателем целостности ФС2 (Foyer and Noctor, 2011).

В опытах с нивяником обыкновенным негативное гербицидное влияние выразилось в значительном снижении скорости ETR_{max} и некотором увеличении $Y(NPQ)_{max}$ относительно интактных растений. В этом случае гербицидный эффект ТРИБ не затронул показатель $Y(II)_{max}$, значения которого оставались в течение эксперимента на уровне контроля (Volova et al., 2020a).

Иной эффект воздействия ТРИБ наблюдали в опытах с гулявником Лезеля и эльсгольцией реснитчатой, связанный не с уменьшением, а с увеличением показателя ETR_{max} после обработки растений обеими формами этого гербицида, причем увеличение зафиксировано на всем протяжении эксперимента, а в некоторых точках превышало отрицательный контроль в несколько раз. Показатель $Y(II)_{max}$ у обоих растений под действием свободного и депонированного ТРИБ практически не изменялся на протяжении эксперимента. При этом динамика изменений остальных показателей флуоресценции у данных растений была различной. Показатель $Y(NPQ)_{max}$ существенно не изменялся у эльсгольции реснитчатой, но увеличивался на 50 % у гулявника Лезеля. Полученные результаты свидетельствуют об усилении эффективности работы фотосинтетического аппарата растений в данном случае.

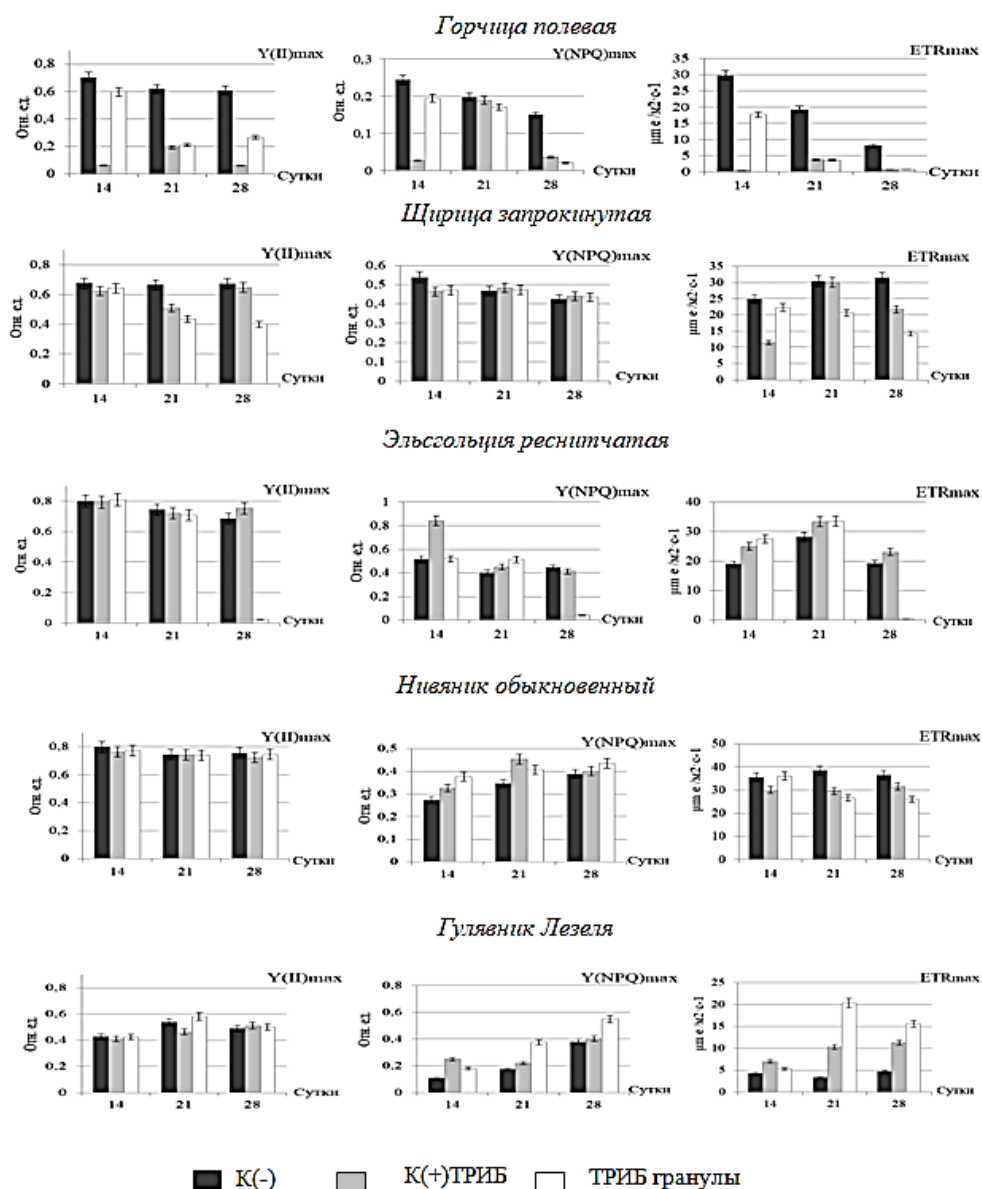


Рисунок 4.13 - Изменение показателей флуоресценции хлорофилла у сорных растений различных видов под воздействием различных форм трибенурон-метила: (K+) – положительный контроль (свободный ТРИБ); (ТРИБ гранулы) – экспериментальная форма депонированного гербицида П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ; (K-) – отрицательный контроль (интактные растения)

Наряду с показателями флуоресценции хлорофилла, важным индикатором фотосинтетической активности растений служит состояние хлорофилл-белковых комплексов. Важнейшая роль в фотосинтезе принадлежит комплексу зеленых пигментов различного строения – это хлорофиллы а, b, с и др, с помощью которых растения улавливают энергию солнечного света и превращают ее в энергию химических связей органических соединений. Помимо хлорофилла, участие в процессе фотосинтеза принимают каротиноиды, поглощая

определенные участки солнечного спектра, передают энергию этих лучей на молекулы хлорофилла. Имеются данные, что каротиноиды выполняют защитную функцию, предохраняя различные органические вещества, в первую очередь молекулы хлорофилла, от разрушения на свету в процессе фотоокисления. Каротиноиды обычно участвуют в защите от окислительного повреждения путем детоксикации кислородных синглетов, образующихся в результате фотосинтеза или ферментативного превращения других АФК в кислородные синглеты (Boussiba, 2000).

В ходе исследования механизма повреждающего действия на фотосинтетическую активность растений свободных и депонированных гербицидов исследовано изменение содержания хлорофилла а, b и каротиноидов в хлорофилл-белковых комплексах исследованных сорных растений. В результате анализа результатов, полученных в экспериментах с метрибузином и трибенурон-метилом, не установлено существенных различий между полученными данными изменения количества пигментов у растений различных видов при их обработке свободными или депонированными гербицидами.

В качестве примера на рисунках 4.14 и 4.15 представлена типичная динамика изменения количества пигментов (хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов) при использовании двух форм МЕТ или ТРИБ, соответственно, в культуре сорняка овсюг обыкновенный и щирица запрокинутая.

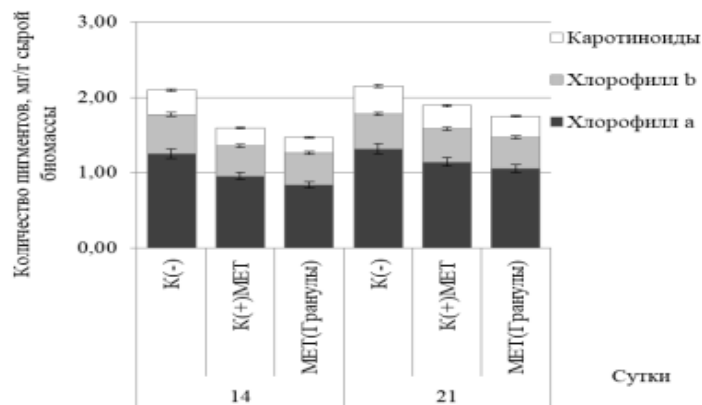


Рисунок 4.14 - Динамика количества пигментов (хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов) у овсюга обыкновенного при обработке различными формами метрибузина: MET+ – свободная форма гербицида; MET гранулы –депонированный гербицид П(ЗГБ)/опилки/MET; K(-) – интактные растения

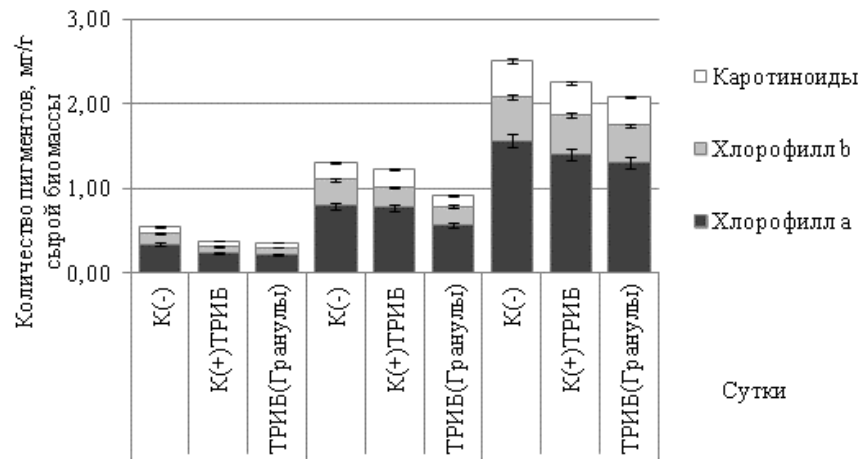


Рисунок 4.15 - Динамика количества пигментов (хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов) у щирицы запрокинутой при обработке различными формами трибенурон-метила: ТРИБ+ – свободная форма гербицида; ТРИБ Гранулы –депонированный гербицид П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ; контроль –интактные растения

Полученные результаты показали в целом близкое снижение содержания всех пигментов в растениях при их обработке, как свободными, так и депонированными формами метрибузина и трибенурон-метила. Так, снижение количества хлорофилла а, b и каротиноидов у растений овсюга на 14 сутки, обработанных метрибузином, составило соответственно для свободной формы 23, 23 и 27 %, для депонированной 32, 19 и 36 %. В эти же сроки в щирице, обработанной ТРИБ, снижение количества пигментов (хлорофилл а, b и каротиноиды) составило для свободной формы, соответственно, 32 %, 38 % и 25 %, для депонированной 35, 38 и 25 % (Volova et al., 2020a).

Таким образом, действие свободных и депонированных форм МЕТ и ТРИБ по отношению к сорным растениям различных видов проявляется в однонаправленном и близком в количественном выражении снижении содержания хлорофилла а и b, а также каротиноидов. Снижение содержания пигментов фотосинтеза в растениях под действием гербицидов авторы объясняют повреждением в системе синтеза хлорофилла, а также увеличением разложения пигментов, в том числе в результате естественного старения растений.

Выполненные исследования свидетельствуют об информативности исследований фотосинтетической активности растений с использованием параметров флуоресценции хлорофилла. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм повреждающего действия гербицидов включает снижение основных параметров флуоресценции ($Y(II)_{max}$, $Y(NPQ)_{max}$ и ETR_{max}) и количества фотопигментов. Сопоставление свободной и депонированной форм МЕТ не выявило различий качественных и количественных изменений параметров флуоресценции у сорных растений разных видов. В отличие от

свободной формы, действие депонированного ТРИБ, несколько запаздывающее в начале эксперимента, характеризуется более длительным и выраженным действием, нарастающим с длительностью экспериментов. Следовательно, депонирование гербицидов в разрушаемую основу с использованием П(ЗГБ) и природного материала (березовых опилок в качестве наполнителя) не снижает, а в ряде случаев при пролонгировании усиливает гербицидный эффект.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

Биологическая эффективность разработанных депонированных форм МЕТ и ТРИБ исследована в посевах повсеместно распространенных и засоряющих сельскохозяйственные культуры сорных растений, а также в лабораторных посевах яровой пшеницы «Новосибирская 15» и ячменя «Биом», зараженных сорняками. Установлена высокая гербицидная активность депонированных МЕТ и ТРИБ, сопоставимая с действием свободных форм гербицидов, а в ряде случаев – превосходящих их. Биологическая эффективность депонированного метрибузина сопоставима с его свободной формой и составила 100 % (полная гибель всех сорняков) на 21 суточных растениях. Биологическая эффективность депонированного ТРИБ несколько ниже депонированного МЕТ и составила в сроки 28 суток 100 % только по отношению к эльсгольдии; 97,1 и 74,6 %, соответственно, для щирицы и гулявника; 63–70 % для нивяника и горчицы. Показано, что гербицидная активность свободной формы ТРИБ уступает депонированной; это проявлялось на более поздних сроках наступления массовой гибели сорняков, что можно связать с известными данными о том, что этот гербицид активно метаболизируется в тканях высших растений до нетоксичных для них продуктов. Поэтому весьма важным является показанная возможность усиления его действия в результате депонирования.

Оценка фотосинтетической активности растений с использованием параметров флуоресценции ($Y(II)_{\max}$, ETR_{\max} , $Y(NPQ)_{\max}$) на серии сорных растений различных видов показала, что на повреждения фотосинтетического аппарата и содержание хлорофилл-белковых комплексов влияет тип гербицида и форма его доставки, а также вид растений. Результаты свидетельствуют о мощном ингибирующем действии обеих форм МЕТ (свободного и депонированного) на фотосинтетический аппарат всех исследуемых сорняков, вызывая снижение параметров флуоресценции, характеризующих ключевые реакции фотосинтеза ($Y(II)_{\max}$ и ETR_{\max}) от 8–10 раз и более по сравнению с отрицательным контролем; ингибирование реакций транспорта электронов фотосистемы-2 (ФС2) блокировало фотохимическое использование растениями поглощенной энергии света и замедляло все

процессы фотосинтеза, вплоть до полной их остановки. При исследовании влияния свободной и депонированных форм ТРИБ в отличие от МЕТ получена неоднозначная картина ответа и динамики показателей фотосинтетической активности у сорных растений различных видов. Показано, что свободная форма ТРИБ вызывает наиболее выраженное ингибирование параметров флуоресценции у большинства растений на ранних стадиях эксперимента, но в дальнейшем, как правило, снижается в отличие от депонированного гербицида, действие которого возрастает во времени, достигая более сильного эффекта, чем свободный ТРИБ. Депонированный ТРИБ в отличие от свободного характеризуется пролонгированным эффектом в связи с его постепенным высвобождением из полимерной основы, что обусловлено достаточно медленной деградацией П(ЗГБ). В целом, детектируемые параметры флуоресценции хлорофилла показали их безусловную полезность в качестве индикатора повреждающего фотосинтетическую деятельность растений эффекта под действием различных гербицидов.

ГЛАВА 5 Исследование эффективности применения депонированных гербицидных препаратов в полевых условиях

Положительные результаты оценки биологической эффективности разработанных депонированных гербицидов, выполненные в лабораторных опытах, позволили начать исследования в полевых условиях. Необходимость и важность полевых экспериментов заключается в том, что они позволяют выявить эффективность применения новых препаратов и/или технологических приемов возделывания сельскохозяйственных культур в конкретных почвенно-климатических условиях. В агрохимических полевых опытах изучается влияние видов, форм, доз исследуемых препаратов на рост, развитие, урожайность сельскохозяйственных культур и качество получаемой продукции.

Цель полевых опытов – исследование эффективности действия разработанных депонированных гербицидных препаратов в овощных и зерновых культурах.

5.1 Характеристика условий выращивания культур в полевых условиях

Микрополевые опыты проведены в окрестностях г. Красноярска на лугово-черноземной мощной тяжелосуглинистой почве. Агрохимическое обследование почвенного участка и диагностика почвы проведены в мае 2019 года перед началом посевных работ стандартными методами. Почва характеризуется нейтральной реакцией почвенного раствора, низкой гидролитической кислотностью, очень высоким содержанием гумуса, превышающим 10 % (таблица 5.1). Высокая емкость катионного обмена (72 ммоль/100 г) обусловлена очень высоким содержанием гумуса и тяжелосуглинистым гранулометрическим составом почвы. Высокая степень насыщенности почвы основаниями (99 %) свидетельствует об отсутствии нуждаемости в известковании. В составе поглощенных оснований доминирует кальций. Соотношение Са:Mg в 0-20 см слое почвы составляет 6,3, что является типичной величиной для почв данного генетического типа. Агрохимическая характеристика свидетельствует о повышенной обеспеченности почвы нитратным азотом и средней - аммонийным. Почва отличается повышенной обеспеченностью подвижным фосфором и обменным калием. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциальном и эффективном плодородии лугово-черноземных почв опытного участка.

Таблица 5.1 - Химическая характеристика почвы (0-20 см) опытного участка (Volova et al., 2021)

№ п/п	Показатель:	Значение:
1	pH _{водн}	7,2
2	Гумус, %	10,7
3	Гидролитическая кислотность, ммоль/100 г	0,75
4	Сумма поглощенных оснований, ммоль/100 г	71,0
5	Емкость катионного обмена, ммоль/100 г	71,8
6	Степень насыщенности почвы основаниями, %	99,0
7	Азот нитратный, мг/кг	16,0
8	Азот аммонийный, мг/кг	10,1
9	Подвижный фосфор, мг/кг	239,0
10	Обменный калий, мг/кг	110,7
11	Кальций обменный, ммоль/100 г	27,2
12	Магний обменный, ммоль/100 г	4,3

В период вегетации выращиваемых культур определяли влажность 0-20 см слоя почвы термовесовым методом; температурный режим почвы исследовали в слоях почвы 0-10 и 10-20 см в период с мая по сентябрь на 5-ти пробных площадях, выделенных в пределах опытного участка (интервал измерения температуры и влажности почвы - 12-20 дней). Для сравнительной характеристики температурного режима прилегающего слоя атмосферы использовали данные метеостанции «Красноярское опытное поле». Вегетационный сезон 2019 года характеризовался как теплый с недостаточным увлажнением. С мая по сентябрь количество выпавших осадков составило 46-85 % от нормы. Средние температуры воздуха в мае и июне превышали среднемноголетние данные на 1-2 °С (таблица 5.2). Особенно теплым был август в первой декаде месяца, когда среднесуточная температура воздуха достигала 23 °С. В июле при средней температуре воздуха, близкой к норме выпало всего 38 мм осадков, что ниже нормы на 53 %.

Таблица 5.2 - Показатели режимов температуры и осадков за вегетационный сезон 2019 года (данные метеостанции «Красноярское опытное поле») (Volova et al., 2021)

Месяцы	Температура воздуха, °С				Осадки		Средне-многолетние показатели t воздуха, °С	Средне-многолетний уровень осадков, мм
	Декады			сред-няя за месяц	сумма за месяц, мм	% к норме		
	I	II	III					
Май	9,2	7,3	13,5	10,1	20	45,5	8,9	44
Июнь	15,7	18,9	19,6	18,1	51	85,0	15,9	60
Июль	20,1	19,2	17,3	17,3	38	46,9	18,4	81
Август	22,5	16,3	16,2	18,2	58	77,3	15,1	75
Сентябрь	11,8	10,4	10,0	10,3	62	131,9	9,1	47

Благоприятным для роста и развития растений оказался июнь и август. При среднесуточной температуре воздуха 18 °С количество осадков составило 77-85 % от нормы. Важно отметить, что осадки носили ливневый характер. К началу посевного периода температура 0-20 см слоя достигла устойчивого перехода через +5° С и составляла в среднем по опытному участку +6 °С. В этот период почва холоднее воздуха на 4 °С. Амплитуда сезонной динамики температуры 0-20 см слоя почвы зависела от температуры приземных слоёв атмосферы. От мая к июню температура почвы на глубине 20 см постепенно повышалась от +5-6 до +19-20 °С. В июльский период поверхность почвы прогрелась до +25-26° С; к концу августа отмечено резкое снижение температуры почвы до + 12-13 °С и отставание на 9 °С от температуры воздуха (Volova et al., 2021).

Результаты измерения влагообеспеченности почвы выполнены по показателю продуктивной влаги. Влажность лугово-черноземной почвы и запасы продуктивной влаги представлены в таблица 5.3.

Таблица 5.3 - Влажность (W) и запасы продуктивной влаги (ЗПВ) в лугово-черноземной почве 0-20 см опытного участка в вегетационном сезоне 2019 года

Срок определения	W, %	ЗПВ, мм
23 мая	33,3	42,6
4 июня	22,0	20,0
17 июня	25,2	26,4
2 июля	24,4	24,8
17 июля	20,3	16,6
9 августа	19,8	15,6
19 августа	25,3	26,6
4 сентября	28,5	33,0

Учет запасов продуктивной влаги, накопленной в 0-20 см слое к началу вегетационного периода, свидетельствует о хорошей влагообеспеченности почвы (43 мм).

Исследование микрофлоры почвы опытного участка показало, что общая численность копиотрофных бактерий была высокой и составила 57,7±8,6 млн КОЕ/г (таблица 5.4). Численность прототрофных и олиготрофных бактерий составляла 5,7±1,3 и 14,1±3,8 млн КОЕ/г, соответственно. Низкие коэффициенты минерализации (0,10) и олиготрофности (0,24) указывают на высокое содержание органического вещества в почве. Также выявлена невысокая численность азотфиксирующих бактерий – 3,6±0,5 млн КОЕ/г, что свидетельствует о наличии доступных форм азота в почве.

Таблица 5.4 - Микробиологические показатели почвы опытного участка

Численность микроорганизмов, КОЕ в 1 г почвы				
Копиотрофы	Прототрофы	Олиготрофы	Азотфиксаторы	Микромицеты
$(57,7 \pm 8,6) \times 10^6$	$(5,7 \pm 1,3) \times 10^6$	$(14,1 \pm 3,8) \times 10^6$	$(3,6 \pm 0,5) \times 10^6$	$(35,6 \pm 5,0) \times 10^3$
Коэффициент минерализации 0,10				
Коэффициент олиготрофности 0,24				

Анализ таксономического состава микрофлоры (рисунок 5.1) показал, что в почве доминировали грамотрицательные палочки, представители *Pseudomonas vancouverensis* 79 %, на втором месте – грамположительные спорообразующие палочки *Bacillus pumilus* 9,6 %. Количество почвенных микромицетов составляло $35,6 \pm 5,0$ тыс. КОЕ/г почвы. Доминировали типичные представители почвенных микромицетов: *Penicillium* 39,5 %, *Cladosporium* 13,6 % и *Trichoderma* 11,1 %. Среди фитопатогенных грибов были обнаружены представители родов *Fusarium* 9,9 %, *Pythium* 3,7 % и *Verticillium* 6,2 %. На данном участке коэффициенты минерализации и олиготрофности меньше единицы, в то же время численность азотфиксаторов низкая, что указывает на незавершенность процессов минерализации и высокое содержание доступных форм азота. В целом, следует отметить низкую зараженность почвы природными фитопатогенами.

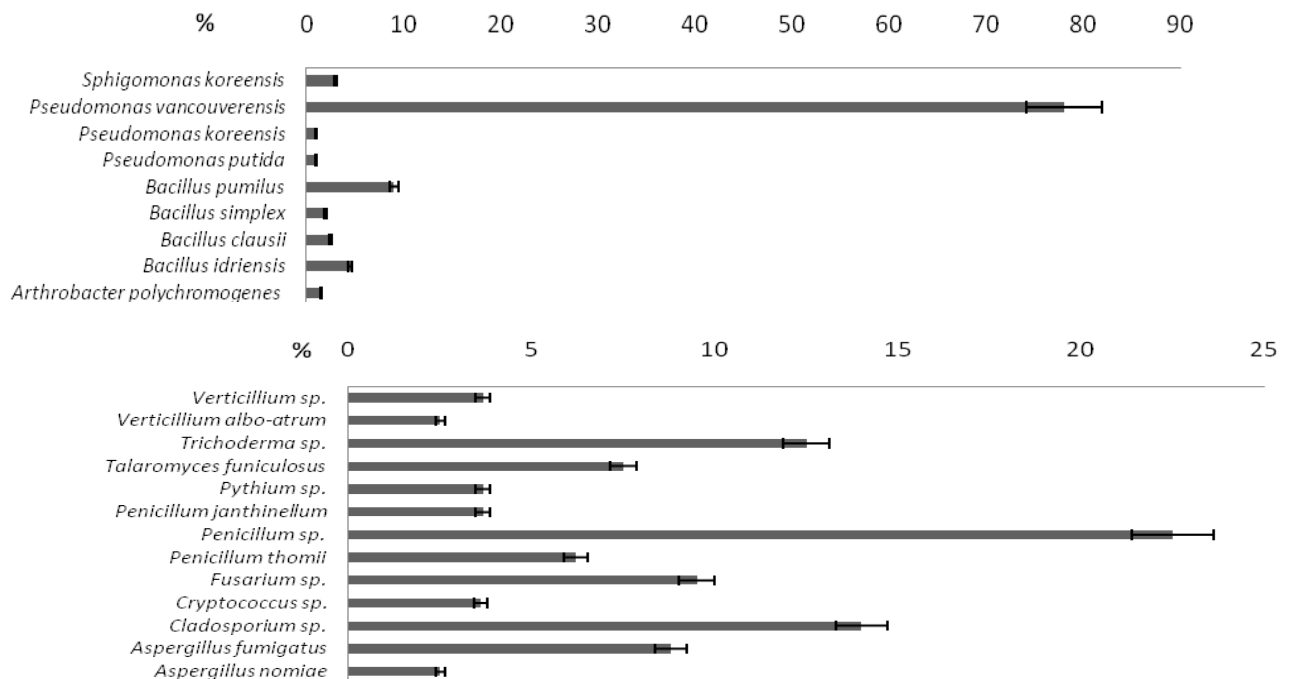


Рисунок 5.1 - Таксономический состав бактериальной составляющей и микромицетов почвы опытного участка

5.2 Исследование эффективности применения депонированных гербицидов в зерновых культурах в полевых условиях

Необходимость наращивания объемов растениеводства, в первую очередь - производства зерновых культур, диктуется ростом населения, для которого зерно является одним из главных источников продуктов питания, а также расширением потребительской базы животноводства и птицеводства, где зерно - один из основных компонентов кормов. Пшеница – одна из наиболее распространенных и важных зерновых культур, продукцию которой широко используют. Несмотря на значительное сокращение в последнее время её посевных площадей, она остается основной зерновой культурой. Это обусловлено, во-первых, высокой технологичностью и продуктивностью, а также её востребованностью. Важность зерновой культуры ячменя обусловлена тем, что эта ценная культура многопланового и широкого использования. Зерно ячменя идет на продовольственные, технические и кормовые цели.

Полевые испытания проведены в вегетационном сезоне 2019 года на двух зерновых культурах - яровой пшенице сорта «Новосибирская 15» и яровом ячмене сорта «Биом». Посев произведен 23 мая. Исследованы гербициды (метрибузин и трибенурон-метил) в двух формах – экспериментальные депонированные в виде гранул (внесены в почву одновременно с посевом зерна) и в группах положительного контроля - свободные метрибузин и трибенурон-метил (использованы в виде растворов для опрыскивания посевов). Отрицательным контролем служили интактные растения (выращиваемые без применения гербицидов).

Перед посевными работами в лабораторных условиях исследована всхожесть посевного материала, которая составила для пшеницы 86 %; для ячменя 85 %. Фитосанитарный анализ посевного материала показал низкий уровень зараженности зерновок фитопатогенами. Доля семян пшеницы, зараженных грибами *Alternaria*, составила 6,2 %; у ячменя 12,0 %. Инфицированность зерновок грибами рода *Bipolaris* была ниже, 2,8 и 3,5 % соответственно. Тем не менее, с применением традиционной технологии за сутки до посева зерно обоих видов было протравлено раствором фунгицида тебуконазола.

В фазе полных всходов определена полевая всхожесть. Фаза начала всходов на пшенице по всем вариантам опыта зафиксирована 26 мая, полные всходы 28 мая; полевая всхожесть была высокой (на уровне 90 ± 2 шт./м²). В посевах ячменя полная полевая всхожесть зафиксирована 28 мая, составившая 86 ± 2 шт./м². На 10 день после появления всходов пшеницы отмечено образование 3-го листа. Начало кущения яровой пшеницы приходилось на 12 июня; спустя 26 суток все растения перешли в фазу полного кущения. С 20 июня отмечался выход в трубку растений яровой пшеницы, характеризующийся началом роста стебля и формированием генеративных органов растений. Через 8 дней от начала выхода в трубку

зафиксировано появление флагового листа у растений. Фаза колошения пшеницы, характеризующаяся появлением соцветия из влагалищного верхнего листа, полностью наступила 7 июля. В этой фазе отмечался усиленный рост листьев, стеблей и формирование колоса. Влажная и теплая погода определила формирование хорошо развитых цветков в колосе. Через 3 дня после полного колошения отмечено начало цветения. Созревание яровой пшеницы в фазе восковой спелости отмечено 25 августа. Через 3 дня семена растений приобрели полную спелость и готовность к уборке.

Фаза начала всходов в посевах ячменя по всем вариантам опыта зафиксирована 26 мая, полные всходы 28 мая; с 10 июня - начало фазы кущения и фазы развития ярового ячменя в целом совпадали с пшеницей, но характеризовались более ранним (на 2 дня) их наступлением. Начало появления всходов ярового ячменя отмечено ранее, чем у пшеницы и пришлось на 7 день от посева. Особенностью ячменя является совпадение фенологических фаз колошения и цветения. Наблюдения за развитием ярового ячменя показали схожие даты наступления фенологических фаз роста и развития растений по вариантам опыта. Полная спелость ячменя по вариантам опыта наступила 20 августа. Таким образом, наступление фенологических фаз культур не зависело от формы применения гербицидов; растения вступали в фазы роста и развития в одни и те же сроки. В фазе полного кущения (14 июня) посевов пшеницы и ячменя в группах положительного контроля произведена обработка растений опрыскиванием свободными гербицидными препаратами.

Появление сорняков на опытных участках зафиксировано в сроки на 31 мая (8 суток после посадки зерновых культур). Следует отметить весьма высокую зараженность опытного участка сорными растениями, среди которых присутствовали лебеда (*Atriplex*), желтушник (*Erysimum*), одуванчик (*Taraxacum*), жерушник (*Rorippa*), осот (*Sonchus*), звездчатка средняя (*Stellaria media*), пырей (*Elytrigia*). Степень засоренности опытного участка - очень сильная, соответствующая 5 балам по шкале Фисюнова (Самсонова и др., 2006). В течение вегетационного периода общая численность сорняков менялась. Это зависело не только от действия гербицидных препаратов, но также от сроков вегетационного периода сорняков. Максимальное количество всех сорных растений в зерновых культурах отмечено к концу июня - началу июля. Доминирующим видом на протяжении всего эксперимента в посевах пшеницы и ячменя была звездчатка средняя (*Stellaria media*), численность которой в ходе наблюдения в зависимости от типа гербицида и формы применения составляла от 20 до 80 шт./м² (Петровская и др., 2022).

Депонированные формы обоих гербицидов обладали выраженной гербицидной активностью. Динамика снижения общей засоренности посевов пшеницы сорными растениями представлена на рисунке 5.3; фото - рисунок 5.2.

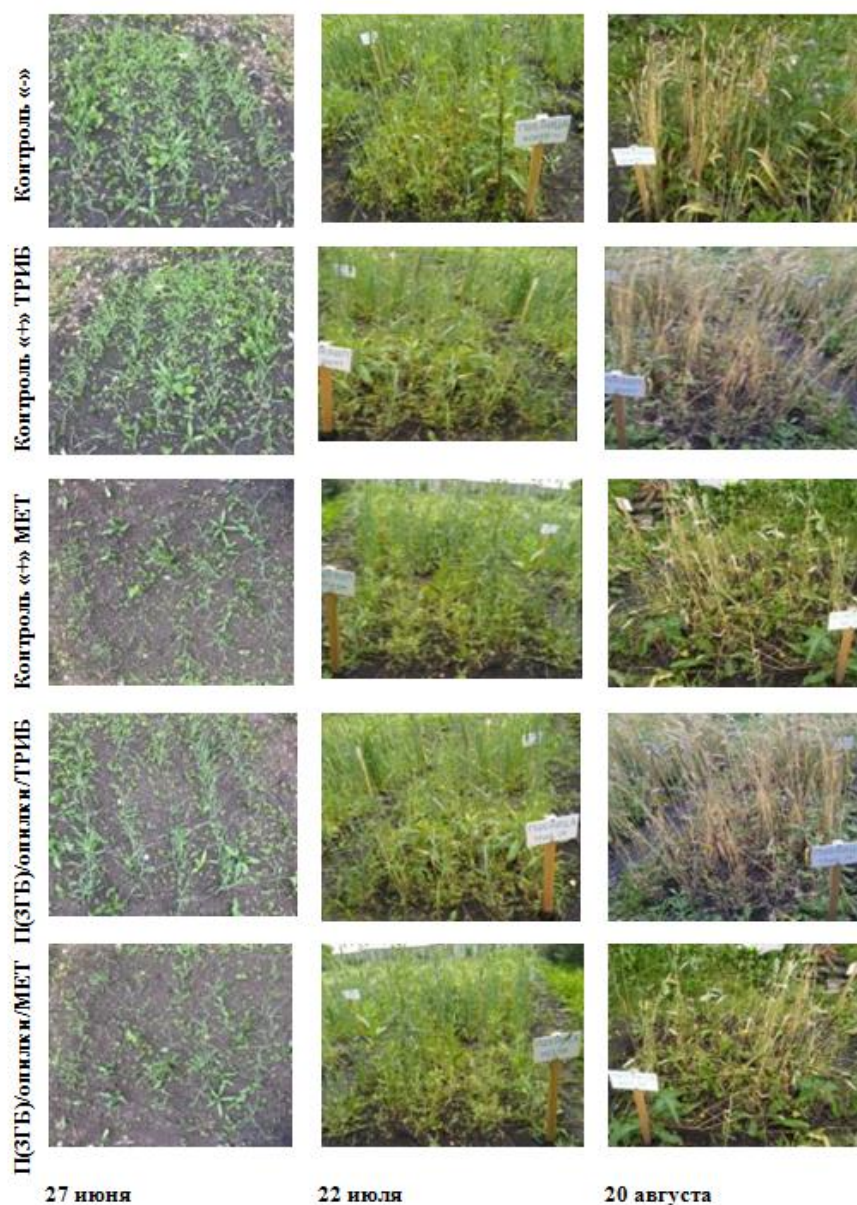


Рисунок 5.2 - Фото посевов яровой пшеницы сорта «Новосибирская 15» с различной формой применения гербицидов в динамике вегетационного сезона 2019 г.

Сорный ценоз в посевах пшеницы был следующим: лебеда – 4,59 %, звездчатка средняя – 45,97 %, одуванчик – 21,84 %, осот – 4,59 %, желтушник – 22,99 %. В условиях открытого грунта динамика гибели сорных растений отличалась от лабораторных условий. В сложных и меняющихся условиях полевого сезона на динамику гибели сорняков под действием гербицидов в значительной мере влияют распространенность сорняков и характер их развития, который, в свою очередь, зависел от погодных условий, прежде всего, от интенсивности осадков и температуры среды. Как известно, семена сорняков могут сохраняться в земле до 1,5-2,0 лет и прорасти при формировании благоприятных условий для них. Это может приводить к развитию сорняков во второй и третьей так называемых «волнах». Количество всходов

сорных растений во всех группах эксперимента было сопоставимым (около 300 шт./м²). Учет сорных растений по группам опыта показал более выраженное их подавление в экспериментальных группах. Уже на первом сроке учета гибели сорняков виден эффект применения гербицидов и разница биологических эффектов свободных и депонированных форм МЕТ и ТРИБ. Численность сорных растений в положительном контроле изменилась после обработки гербицидами незначительно, составив 267 и 260 шт./м² соответственно, то есть гибель сорняков не превышала 15-18 %. При использовании депонированных гербицидов в эти сроки подавление сорняков было более результативным: гибель сорняков составила 50 % в случае ТРИБ и несколько ниже (37 %) при внесении гранул МЕТ (их остаточное количество составило, соответственно, 168 и 220 шт./м²) (Петровская и др., 2022).

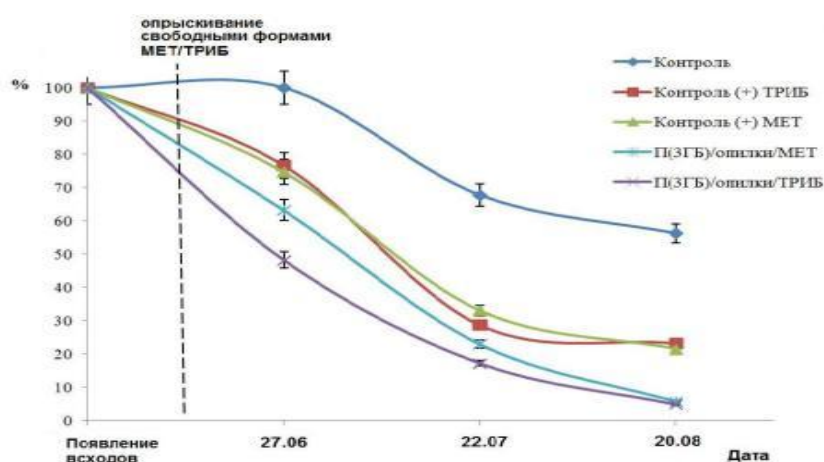


Рисунок 5.3 - Динамика гибели сорных растений в посевах яровой пшеницы «Новосибирская 15» при использовании свободных и депонированных гербицидов (Петровская и др., 2022)

В последующие сроки количество сорняков в группах положительного контроля мало изменялось; в экспериментальных группах продолжало сокращаться в результате пролонгированного действия депонированных форм. В конце наблюдения (20 августа) количество сорняков в экспериментальных группах было ниже 10 %. Анализ полученных результатов позволил вычислить биологическую эффективность исследованных гербицидных препаратов, оцениваемую относительно численности сорняков в отрицательном контроле по формуле Аббота. Биологическая эффективность депонированных гербицидов составила 80 %. Эффективность гербицидного действия препаратов и выявленные различия между МЕТ и ТРИБ, а также формой их доставки иллюстрируют результаты фотодокументирования посевов пшеницы (рисунок 5.2). На фотографиях можно увидеть, что на протяжении всего вегетационного периода на делянках отрицательного контроля выросшие сорные растения (в частности осот) занимали первый ярус, затеняя культурные растения, в то время как на

делянках с применением различных составов гербицидов, сорняков, вышедших в первый ярус, не обнаружено.

Результаты применения гербицидных препаратов в посевах ячменя в общем виде были аналогичны полученным в посевах пшеницы (Рисунки 5.4 – 5.5) Отмечена очень сильная степень засоренности опытного участка, соответствующая 5 балам по шкале Фисюнова (Самсонова и др., 2006). Появление сорняков на опытных участках зафиксировано в сроки на 31 мая (8 сутки после посадки зерновых культур). Состав сорных растений в посевах ярового ячменя был следующим: лебеда – 12 %, желтушник – 19 %, звездчатка средняя – 12 %, одуванчик – 32 %, осот – 4 %. Гербицидное действие депонированных ТРИБ и МЕТ также было более выраженным по сравнению с опрыскиванием посевов свободными формами препаратов (Петровская и др., 2022).

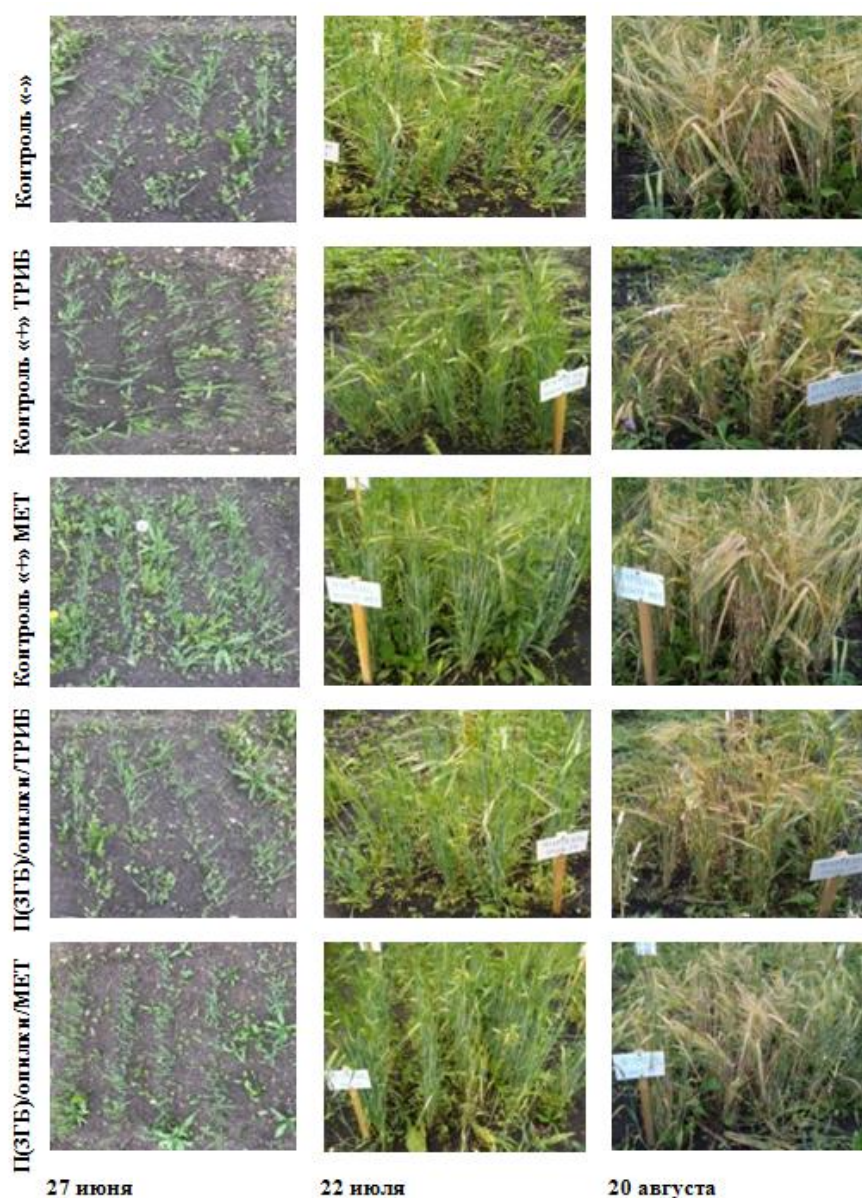


Рисунок 5.4 - Фото посевов ярового ячменя «Биом» с различной формой применения гербицидов в динамике вегетационного сезона 2019 г.

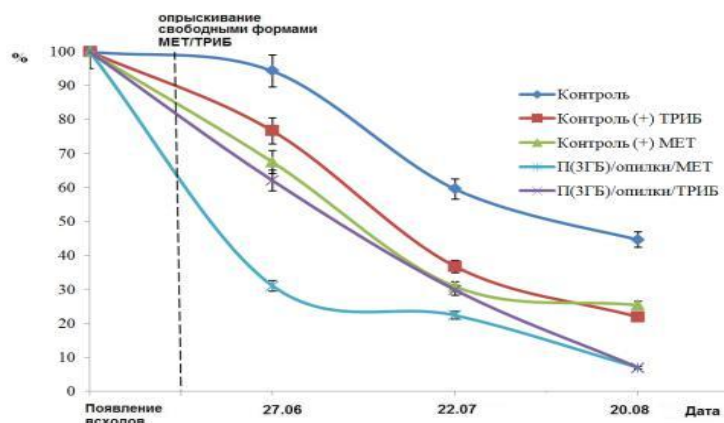


Рисунок 5.5 - Динамика гибели сорных растений в посевах ячменя «Биом» при использовании свободных и депонированных гербицидов (Петровская и др., 2022)

Количество всходов сорных растений во всех группах эксперимента было сопоставимы (около 400 шт./м²). Так, в июне, где количество сорных растений достигло максимальной численности 403 шт./м², применение свободных форм препаратов ТРИБ и МЕТ снизило их количество в эти сроки до 309 и 272 шт./м², соответственно. В то же время, применение депонированных ТРИБ и МЕТ снизило численность сорных растений до 250 и 125 шт./м², то есть гибель сорняков составила 40 и 70 % соответственно. Как и в эксперименте с пшеницей можно отметить высокое ингибирующее действие депонированных МЕТ и ТРИБ, остаточное количество сорняков перед уборкой составило 28 шт./м² (Петровская и др., 2022).

Биологическая эффективность депонированных гербицидных препаратов ТРИБ и МЕТ в посевах ячменя составила около 85 %. Это значительно превышает показатели, полученные при традиционном опрыскивании посевов ячменя растворами свободных гербицидов ТРИБ и МЕТ, соответственно, 51 и 43 %.

Отличия засоренности посевов зерновых культур в полевых условиях оказывали влияние на структуру урожая (таблицы 5.5-5.6). Достаточное количество влаги и оптимальная температура воздуха способствовали формированию хорошо развитых растений.

Высота растений и масса соломы также были самыми высокими в случае применения депонированных гербицидов. Количество общих и продуктивных стеблей самыми высокими также были в экспериментальной группе с применением депонированного метрибузина. Количественно эти параметры оценивались на уровне массы соломы, равной 1499-1695 г/м² и длины растений 112-114 см. Лучшие фитометрические показатели характерны для экспериментальных групп, в которых зафиксировано максимальное количество растений (367 шт./м²) с максимальным количеством стеблей, в т.ч. продуктивных (1042 и 1008 шт./м² соответственно) (таблица 5.5).

Таблица 5.5 - Структура урожая яровой пшеницы «Новосибирская 15» в полевых условиях при различных формах и способах применения гербицидов

Показатель	Контроль «-»	Контроль «+» (опрыскивание)		Эксперимент (гранулы)	
		Трибенурон	Метрибузин	П(ЗГБ)опилки/ТРИБ	П(ЗГБ)/опилки/МЕТ
Число растений, шт./м ²	343,0±17,0	340,0 ± 17,0	345,0± 17,0	348,0 ± 17,0	367,0 ±19,0
Высота растений перед уборкой, см	106,9 ± 5,0	99,3 ± 4,9	114,1± 6,0	114,1 ± 6,0	112,4 ± 5,0
Число стеблей, шт./м ² :					
-общих	97,0±50,0	986,0±49,0	994,0± 50,0	973,0 ± 48,0	1042,0 ± 50,0
-продуктив.	978,0±59,0	972,0±52,0	994,0± 50,0	939,0 ± 46,0	1008,0 ± 49,0
Длина колоса, см	6,8 ±0,4	7,1 ±0,4	7,3 ±0,4	7,0 ±0,4	7,1 ±0,4
Число колосков в колосе	13,2 ±0,8	13,2 ±0,8	13,4 ±0,8	13,5 ±0,8	13,6 ±0,8
Масса соломы, г/м ²	1145,0±57,3	915,0 ±45,8	1499,0 ±74,9	1695,0 ±84,7	1538,0 ± 76,9

Количество колосков в колосе по вариантам опыта было близким. Длина колоса была сопоставима в вариантах с применением гербицидов и несколько превосходила отрицательный контроль. Форма доставки гербицидов также влияла на структуру урожая ярового ячменя (таблица 5.6). Учет структуры урожая показал, что применение пестицидов способствовало увеличению урожайности, включая массу соломы. Высота растений была достоверно выше в группах применения обеих форм гербицидов; при достоверно самой высокой в группах с депонированными гербицидами. Также отмечено снижение количества растений, общего количества стеблей и продуктивных стеблей в экспериментальных вариантах с применением депонированных препаратов трибенурон-метила и метрибузина по сравнению с положительным и отрицательным контролями. Снижение общего количества растений на этих вариантах способствовало формированию растений с максимальной высотой (86-87 см) и длиной колоса (7 см). Количество колосков в колосе было близко к 20 шт.

Улучшение элементов структуры урожая в экспериментальных группах растений с применением депонированных гербицидов способствовало повышению урожайности обеих зерновых культур по сравнению с отрицательным и положительным контролями (таблица 5.7). Результаты полевых опытов показали, что урожайность пшеницы и ячменя при отсутствии средств защиты от сорняков была самой низкой, 31,5 и 49,2 ц/га соответственно. В группах положительного контроля урожайность пшеницы была выше, 34,5 и 35,1 ц/га, соответственно, в случае опрыскивания посевов ТРИБ и МЕТ; урожайность ячменя, соответственно, 50,7 и 51,7

ц/га. Самые высокие показатели урожая зерновых получены в экспериментальных группах, в которых подавление сорняков было наиболее активным. В случае применения депонированных ТРИБ и МЕГ урожайность пшеницы достигла 36,6 и 42,3 ц/га; ячменя, соответственно, 53,8 и 53,6 ц/га.

Таблица 5.6 - Структура урожая ярового ячменя «Биом» в полевых условиях при различных формах и способах применения гербицидов

Показатель	Контроль «-»	Контроль «+» (опрыскивание)		Эксперимент (гранулы)	
		ТРИБ	МЕГ	П(ЗГБ)опилк и/ТРИБ	П(ЗГБ)/опилки/МЕГ
Число растений, шт./м ²	298,0±15,0	292,0±15,0	293,0±15,0	287,0±13,0	286,0±14,0
Высота растений перед уборкой, см	80,8±4,0	83,0±4,3	84,3±4,2	87,4±4,4	85,9±4,3
Число стеблей, шт./м ² :					
-общих	2086,0±104,0	1840,0±92,0	1875,0±94,0	1682,0±101,0	1451,0±87,0
-продуктивных	1430,0±71,0	1372,0±67,0	1319,0±66,0	961,0±58,0	959,0±48,0
Длина колоса, см	6,3±0,3	6,6±0,3	6,6±0,3	6,9±0,3	6,9±0,3
Число колосков в колосе, шт.	18,0±1,0	19,4 ±1,0	19,1 ±1,0	19,8 ±1,0	19,9 ±1,0
Масса соломы, г/м ²	1868,0 ±93,4	1935,0±94,2	2133,0±99,8	1972,0 ±97,2	2004,0±98,0

Таблица 5.7 - Урожайность зерновых культур в полевых условиях при различных формах и способах применения гербицидов (Петровская и др., 2022)

Вариант	Урожайность, ц/га	
	Пшеница «Новосибирская 15»	Ячмень «Биом»
Контроль «-»	31,5±1,2	49,2±0,8
Контроль «+» (Трибенурон)	34,5±0,5	50,7±0,3
Контроль «+» (Метрибузин)	35,1±0,5	51,7±0,6
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон	36,6±0,5	53,8±0,3
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин	42,3±0,6	53,6±0,4

Важным показателем при исследовании новых препаратов является качество урожая, оцениваемое через химический состав продукции. Связано это с тем, что технологические приемы возделывания культур влияют не только на продуктивность растений, но также могут изменять качество.

В случае зерновых культур важным показателем хлебопекарных свойств муки, полученной из зерна, является клейковина. Клейковина зерна – комплекс белковых веществ

зерна, способных при набухании в воде образовывать связную эластичную массу. В клейковине определяют количество и качество. Количество сырой клейковины – отношение массы отмытой сырой клейковины к массе стандартной пробы размолотого зерна при его влажности не более 18%, выраженное в процентах. Качество клейковины – совокупность реологических свойств (растяжимость, упругость, эластичность), обуславливающая величину деформации сжатия 4-граммового шарика клейковины, выраженное в единицах прибора ИДК. Снятие показаний с индикаторного табло прибора осуществляют с точностью до 0,1 ед. ИДК. Показано, что количество сырой клейковины в зерне яровой пшеницы сорта «Новосибирская 15» довольно высокое и изменялось по вариантам опыта (таблица 5.8).

Таблица 5.8 - Содержание сырой клейковины в зерне пшеницы «Новосибирская 15» и ее качество при различных формах и способах доставки гербицидов растениям

Вариант	Количество клейковины, %	Показатель ИДК, ед.	Группа качества
Контроль «-»	28,2 ±1,4	66,1	I, хорошая
Контроль «+»(Трибенурон)	33,2 ±2,0	73,1	I, хорошая
Контроль «+» (Метрибузин)	36,2 ±1,8	68,5	I, хорошая
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон	37,9 ±1,9	72,0	I, хорошая
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин	40,6 ±2,0	71,8	I, хорошая

В соответствии с ГОСТ 9353-2016 «Пшеница. Технические условия», зерно пшеницы делится на 4 класса, относящихся к категории продовольственного зерна, и 5 класс – фуражное зерно. К 1 классу относится зерно с содержанием сырой клейковины не менее 32 %, ко второму классу – не менее 28 %, к 3 классу - не менее 23 %, к 4 – не менее 18 %, для 5 класса нет ограничений по данному показателю. При этом учитывается и качество клейковины: для 1 и 2 класса – I группа, для 3 и 4 – II группа.

Таким образом, зерно пшеницы с контрольного варианта без применения средств защиты растений с содержанием сырой клейковины 28,2 % относится ко 2-му классу, «пшеница продовольственная». На всех других вариантах с применением гербицидов, независимо от формы, количество сырой клейковины было выше и составляло 33,2 - 36,3 % в положительном контроле и еще выше (37,9 - 40,6 %) в экспериментальных группах. Полученное зерно относится к 1-му классу – «пшеница продовольственная».

Следующий показатель качества зерна - натура (насыпная плотность), характеризует отношение массы зерна к объему, который занимает зерно после свободной, равномерной и стабильной засыпки в мерку (измерительный контейнер). Натура зерна выражается в граммах на один дециметр кубический (литр) (таблица 5.9).

Таблица 5.9 - Натура зерна пшеницы «Новосибирская 15» и содержание белка при различных формах и способах доставки гербицидов растениям

Вариант	Зерно пшеницы	
	натура зерна, г/л	содержание белка, %
Контроль «-»	718	16,1
Контроль «+» (Трибенурон)	758	15,9
Контроль «+» (Метрибузин)	726	16,8
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон	818	17,5
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин	823	17,4

Показатели натуры зерна пшеницы «Новосибирская 15» по вариантам эксперимента варьировали от 718 г/л (контроль «-») до 758-726 г/л (положительный контроль) и 818-823 г/л в экспериментальных группах. Согласно ГОСТ 9353-2016 «Пшеница. Технические условия», пшеница продовольственная 1 и 2 класса должна иметь натуру не менее 750 г/л, 3 класса – не менее 730 г/л, 4 класса – не менее 710 г/л. У пшеницы фуражной (5 класс) показатель не регламентируется. Следовательно, зерно пшеницы, полученное на вариантах Контроль «+», а также на вариантах с применением депонированных гербицидов, соответствует параметрам продовольственного зерна 1 класса по показателю натуры. На участках Контроль «-», Контроль «+» (свободный метрибузин) натура зерна соответствовала 4 продовольственному классу.

В зерне продовольственной пшеницы 1 класса в пересчете на сухое вещество массовая доля белка должна быть не менее 14,5 %, 2 класса – не менее 13,5 %, 3 класса – не менее 12,0 %, 4 класса – не менее 10,0 %, в зерне фуражной пшеницы 5 класса данный показатель не имеет ограничений. В сложившихся почвенно-климатических условиях вегетационного периода отчетного года на всех экспериментальных делянках посевов пшеницы сформировалось зерно с высоким содержанием белка, соответствующего по данному показателю зерну 1 класса. Проведенные мероприятия по защите растений содействовали повышению формирования белка в зерне пшеницы. Максимальные значения - 17,5 % и 17,4 % получены на делянках с использованием депонированных гербицидов.

Показатели натуры зерна и содержание белка в зерне ячменя, в силу биологических особенностей культуры, отличаются от показателей зерна пшеницы. В соответствии с ГОСТ 28672-2019 «Ячмень. Технические условия», зерно ячменя, в зависимости от его качества, подразделяют на 3 класса. Требования к натуре зерна следующие: зерно 1 класса – не менее 630 г/л, 2 класса – не менее 570 г/л, зерно 3 класса по данному показателю не имеет ограничений. По содержанию белка зерно ячменя на продовольственные и фуражные цели не регламентируется. Натура зерна на варианте Контроль «-» была самой низкой (579 г/л), что соответствует зерну 2 класса. Применение гербицидов в посевах ячменя обеспечило повышение

качества зерна, соответствующего 1-му классу. Самый высокий показатель зафиксирован в вариантах с применением депонированных ТРИБ и МЕТ, соответственно, 634-642 г/л (таблица 5.10). В зерне ячменя в контрольных делянках содержание белка в пересчете на сухое вещество составило 13,4 %. Это минимальный показатель в экспериментах с ячменем. Применение гербицидов способствовало повышению формирования белкового компонента. Сравнивая варианты образцов зерна ячменя, полученных с применением свободных и депонированных гербицидов, отметим, что различия между ними незначительные. При этом самые высокие показатели также характерны для зерна, полученного с применением депонированных гербицидов (14,0 - 14,2 %).

Таблица 5.10 - Натура зерна ячменя «Биом» и содержание белка при различных формах и способах доставки гербицидов растениям

Вариант	Показатель:	
	натура зерна, г/л	содержание белка, %
Контроль «-»	579	13,4
Контроль «+» (Трибенурон)	591	13,9
Контроль «+» (Метрибузин)	603	14,0
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон	634	14,1
Эксперимент (гранулы) П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин	642	14,2

Таким образом, применение депонированных гербицидов по сравнению с традиционным опрыскиванием посевов зерновых свободными препаратами более активно подавляло развитие сорняков, обеспечивая получение более высоких урожаев и качества зерна пшеницы и ячменя.

5.3 Исследование эффективности применения депонированных гербицидов в овощных культурах в полевых условиях

Исходя из климато-погодных условий исследуемой земледельческой зоны с резко-континентальным климатом (Красноярский край, Южная Сибирь, Россия) и выращивания овощей в открытом грунте, выбраны средне и скороспелые сорта овощей: скороспелый ультраранний сорт томатов «Загадка» и среднеспелый столовый сорт свёклы «Цилиндра». Схема проведения исследований включала для каждой овощной культуры следующие варианты применения двух гербицидов метрибузина (МЕТ) и трибенурон-метила (ТРИБ): экспериментальная группа – внесение депонированных гербицидов в почву при посадке; Контроль «+» положительный (опрыскивание растений водными растворами МЕТ и ТРИБ в

аналогичной концентрации. Контроль «-» отрицательный (выращивание растений без применения гербицидов).

Следует отметить весьма высокую зараженность опытного участка сорными растениями, соответствующую 5 баллам по шкале степени зараженности Фисюнова. Среди сорных растений присутствовали лебеда (*Atriplex*), щирица запрокинутая (*Amaranthus retroflexus*), желтушник (*Erysimum*), одуванчик (*Taraxacum*), жерушник (*Rorippa*), осот (*Sonchus*), звездчатка средняя (*Stellaria media*), пырей (*Elytrigia*). В течение вегетационного периода общая численность сорняков изменялась. Максимум количества сорняков в овощных культурах отмечен к концу июня и далее их остаточное количество изменялось по-разному, в зависимости от формы применения гербицида и способа доставки. Динамика гибели сорных растений в течение вегетационного сезона 2019 года зависела от формы и способа применения гербицидов (рисунок 5.6) (Volova et al., 2021).

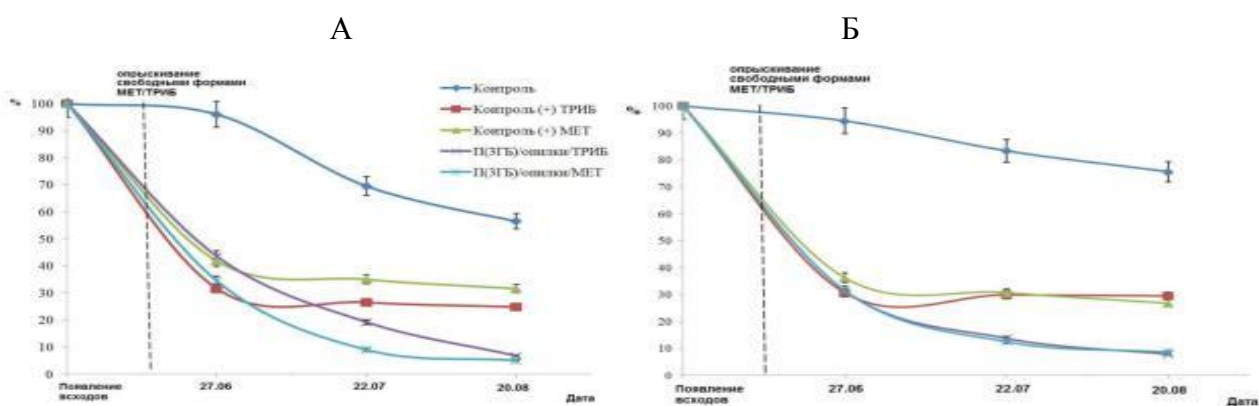


Рисунок 5.6 - Динамика гибели сорных растений в овощных полевых культурах в зависимости от формы и способа применения гербицидов: А - свекла столовая «Цилиндра» и Б - томаты «Загадка»

Появление всходов сорных растений отмечено 31 мая, на 8 сутки после посева свеклы. Начальная численность сорняков в посадках свеклы столовой во всех группах наблюдения была сопоставима и составляла около 200 шт./м². Применение свободных форм МЕТ и ТРИБ сократило количество сорняков в среднем в эти сроки до 74 шт./м² при применении свободного МЕТ и 47 шт./м² в случае свободного ТРИБ, то есть гибель сорняков составила, соответственно, 60 и 70 %. (рисунок 5.6 А). В третьей декаде августа максимальное количество сорных растений было в отрицательном контроле в посадках свеклы, сократилось до 81 шт./м² в результате естественной физиологической гибели растений в конце вегетации. Существенно более низкое количество сорняков зафиксировано в варианте с применением депонированной формы МЕТ и ТРИБ (9-12 шт./м²). На фотографиях (рисунки 5.7 и 5.8) можно увидеть, что на протяжении

всего вегетационного периода на делянках отрицательного контроля выросшие сорные растения (в частности осот, щирца и лебеда) занимали первый ярус, затеняя культурные растения, в то время, как на делянках с применением гербицидов, сорняков, вышедших в первый ярус, не обнаружено (Volova et al., 2021).

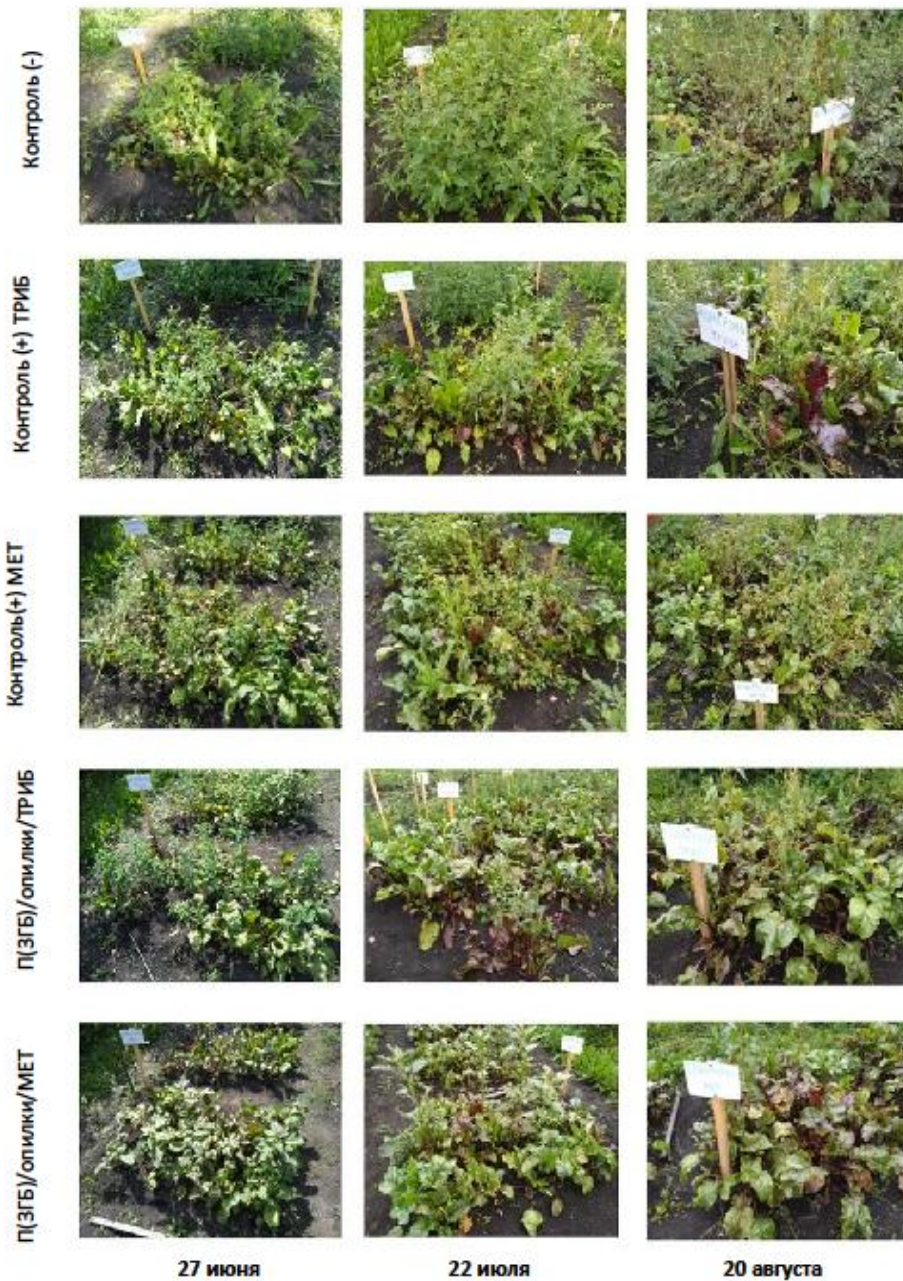


Рисунок 5.7 - Фото посадок свеклы столовой «Цилиндра» в ходе вегетационного сезона 2019 года при различных формах применения гербицидов (Volova et al., 2021)

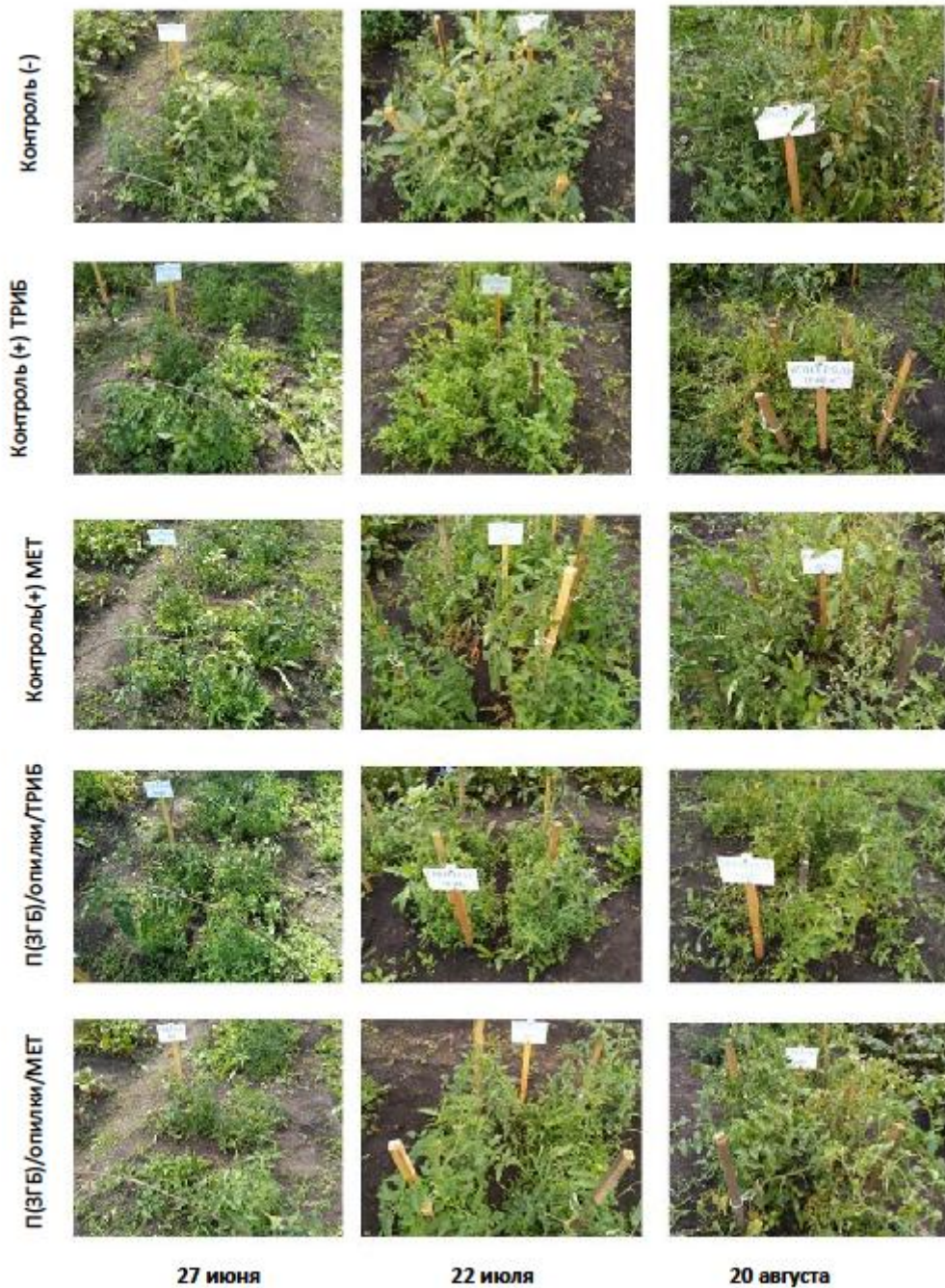


Рисунок 5.8 - Фото посадок томатов «Загадка» в ходе вегетационного сезона 2019 года при различных формах применения гербицидов (Volova et al., 2021)

Биологическую эффективность депонированных форм гербицидных препаратов оценивали по методике, описанной для яровой пшеницы и ярового ячменя. Установлено, что биологическая эффективность депонированного MET в посадках свеклы сорта «Цилиндра» перед уборкой (20 августа) составила 88,9 %, что намного превосходит биологическую эффективность свободных форм MET (биологическая эффективность 30 %) и ТРИБ (45,4 %).

Биологическая эффективность депонированного ТРИБ была сопоставима депонированному МЕТ и составила 85,7 %.

Динамика численности сорных растений в посадках томатов сорта «Загадка» представлена на рисунке 5.6 Б. Численность всхожих сорняков составила порядка 250 шт./м². Массовая гибель сорняков для экспериментальных вариантов и свободных форм зафиксирована в середине июня, где количество сорняков сократилось в среднем до 80 шт./м². Остаточное количество сорняков перед уборкой при внесении свободных форм МЕТ и ТРИБ составляло от 50 до 60 шт./м², то есть 30-40 %. Существенно низкое количество сорняков зафиксировано при внесении депонированных форм МЕТ и ТРИБ (20 шт./м²).

Установлено, что биологическая эффективность препаратов МЕТ и ТРИБ в свободной форме зафиксирована на уровне 60-70 %. Биологическая эффективность депонированных препаратов МЕТ и ТРИБ была намного выше и составила около 88 %.

На рисунках 5.7-5.8 видно, что на протяжении всего вегетационного периода на делянках отрицательного контроля выросшие сорные растения (в частности щирица запрокинутая) занимали первый ярус, затеня культурные растения. На делянках с применением гербицидов сорняки, вышедшие в первый ярус, обнаружены только в положительном контроле со свободными формами МЕТ и ТРИБ. В июле и августе в экспериментальных группах подавление сорняков было более эффективным, вызывая более значительное снижение количества сорняков и подавляя их развитие и рост. На фотографиях видно, что в июле на делянках отрицательного контроля выросшие сорные растения занимали второй ярус, затеня культурные растения, в то время, как на делянках с применением гербицидов количество сорняков, вышедших во второй ярус, было значительно меньше вследствие отставания в росте, а в вариантах с применением долговременных форм гербицидов - это были единичные случаи.

Различия в засоренности посадок отразились на урожайности исследуемых овощных культур. Наблюдение за развитием овощных культур дало следующую картину - цветение первой кисти ультрараннего сорта томатов «Загадка» отмечено во второй декаде июня во всех вариантах опыта. Сбор урожая и определение биометрических показателей проведены 20 августа 2019 г., это обусловлено «затягиванием» созревания плодов. Форма доставки гербицидов отразилась на росте и развитии культивируемых овощных культур и качестве урожая (таблицы 5.11 -5.12).

Высота растений томатов является сортовым признаком. В микрополевом опыте в открытом грунте сорт «Загадка» сформировал высоту растений от 61 до 80 см. Отсутствие обработки томатов гербицидами в условиях открытого грунта способствовало увеличению средней высоты растений по сравнению с вариантами, где применялись гербициды. Этот результат подтверждает возможность негативного влияния гербицидов на

сельскохозяйственные культуры. В отрицательном контроле количество плодов составило 8 шт./растение, средняя масса плода 43 г; при этом только 20 % плодов имели нестандартный размер (менее 4.0 см). Результаты применения МЕТ и в особенности ТРИБ в свободных формах были ниже показателей, полученных в варианте с интактными растениями, где количество плодов и их вес были значительно выше, а количество нестандартных плодов – ниже (таблица 5.12) (Volova et al., 2021).

Таблица 5.11 - Биометрические показатели овощных культур при различных формах и способах доставки гербицидов в полевых условиях

Вариант	Высота растений, см	Количество плодов шт./растение	Средняя масса плода, г	Нестандартные плоды, %
Томаты сорт «Загадка»				
Контроль «-»	80,1±0,2	8	43,4±2,1	20
Контроль «+» Трибенурон-метил (опрыскивание)	61,1±0,3	5	34,5±1,8	52
Контроль «+» Метрибузин (опрыскивание)	77,1±0,5	7	38,6±2,0	45
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон-метил (гранулы)	76,6±0,2	6	27,6±1,4	53
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин (гранулы)	77,4±0,4	11	77,4±3,1	10
Свекла столовая сорт «Цилиндра»				
Контроль «-»		28	94,9±2,4	0
Контроль «+» Трибенурон-метил (опрыскивание)		25	69,3±1,8	10
Контроль «+» Метрибузин (опрыскивание)		30	99,3±2,7	0
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон-метил (гранулы)		31	79,3±3,0	7
Эксперимент (ЗГБ)/опилки/Метрибузин (гранулы)		31	107,8±2,9	0

Самые высокие показатели урожайности томатов получены при использовании депонированной формы МЕТ, при которой количество сорных растений было самым низким. В этом варианте по сравнению с отрицательным и положительным контролями количество плодов на растении возросло на 3-4 шт., средняя масса плода - на 34-39 г при самом низком (10 шт.) количестве нестандартных плодов и получена максимальная урожайность томатов – 230 ц/га (таблица 5.12), значительно перекрывающая показатели всех остальных вариантов (Volova et al., 2021).

Таблица 5.12 - Урожайность овощных культур при различных формах доставки гербицидов

Вариант	Урожайность, ц/га	
	Томаты «Загадка»	Свекла столовая «Цилиндра»
Контроль «-»	139± 26	297± 16,3
Контроль «+» Трибенурон-метил (опрыскивание)	69± 5,4	300± 16,4
Контроль «+» Метрибузин (опрыскивание)	108± 6,3	295± 17,1
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон-метил (гранулы)	66± 5,2	250± 23,1
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин (гранулы)	230± 13,3	337± 26,1

Влияние формы доставки гербицидов МЕТ и ТРИБ зафиксировано также на столовой свекле (таблица 5.11). Установлено достоверное увеличение ($p=0,04$) количества корнеплодов относительно отрицательного контроля в случае применения депонированных форм МЕТ и ТРИБ (31 шт./м²) и свободной формы МЕТ (30 шт./м²). При применении свободной формы ТРИБ этот показатель был ниже (25 шт./м²), а количество нестандартных корнеплодов было более высоким (10 шт) при самой низкой величине средней массы (59,3 г). Самые высокие значения этого показателя получены при использовании МЕТ в свободной и депонированной формах, соответственно, 99,3 и 107,8 г. Максимальный урожай столовой свеклы (337 ц/га) получен в варианте с депонированным МЕТ. Применение гербицида ТРИБ на посадках свеклы снижало продуктивность культуры. При минимальном количестве корнеплодов и увеличении площади питания в этом варианте отмечена минимальная средняя масса корнеплодов (59 г), при этом 10 % корнеплодов имели нестандартный размер (менее 5 см в длину). Положительное действие депонированного метрибузина в виде гранул на продукционный потенциал овощных культур связан с его выраженным негативным действием на сорняки, в результате его постепенного выхода в почву и длительного функционирования в ней. Так, период полураспада гербицида трибенурон-метила составляет 6 дней, а стабильность МЕТ достигает в зависимости от типа почвы до 1-3 месяцев. Поэтому метрибузин можно применять не только по вегетирующим сорнякам, но и при довсходовом варианте (Volova et al., 2021).

Важным показателем, наряду с общей урожайностью овощных культур, служит их качество и пищевая ценность. Пищевая ценность овощей обуславливается содержанием в них углеводов, белков и других азотистых соединений, минеральных или зольных веществ и

витаминов. Понимание изменчивости количественного и качественного биохимического состава необходимо для выращивания и сохранения урожая овощей.

Нитратный азот в овощных культурах накапливается с различной интенсивностью, поэтому содержание солей азота в овощах может колебаться от 10 до 150 мг/кг. Отдельные сельскохозяйственные культуры даже при внесении большого количества азотсодержащих удобрений не накапливают нитраты в выращенном урожае; другие накапливают нитраты в больших количествах, что является негативным результатом. К таким сельскохозяйственным культурам относятся томаты. Анализ показал, что содержание нитратов в плодах томатов было в 2-3 раза меньше предельно допустимого уровня (ПДК) (таблица 5.13). Оказалось, что применение для борьбы с сорняками депонированной формы МЕТ способствует снижению нитратного азота в плодах томатов до 51 мг/кг (Volova et al., 2021)..

Таблица 5.13 - Содержание нитратов в плодах томатов и корнеплодах свеклы при различных способах доставки гербицидов

Вариант	Томаты сорт «Загадка»	Свекла столовая сорт «Цилиндра»
	Нитраты, мг/кг (ПДК = 150 мг/кг)	Нитраты, мг/кг (ПДК = 1400 мг/кг)
Контроль «-»	69,3±3,5	87,3±4,0
Контроль «+» Трибенурон-метил (опрыскивание)	80,0±4,2	61,0±3,4
Контроль «+» Метрибузин (опрыскивание)	83,0±4,7	100,3±4,9
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Трибенурон-метил (гранулы)	68,7±3,6	102,7±5,0
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/Метрибузин (гранулы)	51,0±2,8	52,7±3,1

Для столовой свеклы характерно накопление значительного количества нитратного азота в корнеплодах, часто превышающего ПДК. Это связано с особенностями метаболизма свеклы. Исследованиями установлено, что свекла, выращенная в условиях микрополевого опыта без внесения азотных удобрений, накапливала в корнеплодах незначительное количество нитратного азота (53–103 мг/кг), что ниже ПДК. Доказан статистически значимый эффект положительного действия депонированного МЕТ на снижение концентрации нитратного азота в корнеплодах свёклы на 35 мг/кг (до 52,7 мг/кг) по сравнению с отрицательным контролем и на 48 мг/кг по сравнению с положительным контролем. Близкие результаты, полученные на томатах и свёкле, подтверждают однотипный механизм влияния депонированного МЕТ на

накопление нитратов в овощной продукции. Возможно, метрибузин при внутрпочвенном внесении блокирует поступление нитратной формы азота в растения.

Важным показателем качества овощей является их химический состав, включая содержание сухих веществ, сахаров и витамина С. Результаты микрополевого опыта показали, что концентрация сухого вещества в томатах зависела от формы доставки гербицидов (таблица 5.14). Установлено достоверное повышение доли сухого вещества до 5,98 % в случае применения депонированной форм МЕТ по сравнению с интактными растениями и положительными контролями. Концентрация сахаров в плодах томатов также зависела от условий выращивания и формы внесения гербицидов и достоверно была выше при применении депонированных ТРИБ и МЕТ. Оказалось, что способ применения гербицидов еще более существенно влиял на накопление в томатах витамина С. Так, при использовании депонированных форм ТРИБ и МЕТ концентрация витамина С составила 13,03 и 14,40 мг/100 г, это выше в 1,6-1,7 раза относительно отрицательного и положительного контролей. Следовательно, метрибузин не только проявлял свое прямое гербицидное действие, его применение положительно влияло на качество томатов (Volova et al., 2021).

Таблица 5.14 - Химический состав плодов томатов и корнеплодов свеклы при различных способах доставки гербицидов

Вариант	Сухие вещества, %	Сахара, %	Витамин С, мг/100 г
Томаты сорт «Загадка»			
Контроль «-»	5,60	2,51	7,44
Контроль «+» ТРИБ	5,66	2,60	8,06
Контроль «+» МЕТ	5,57	2,53	8,29
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	5,55	2,76	14,40
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/МЕТ	5,98*	2,89	13,03
Свекла столовая сорт «Цилиндра»			
Контроль «-»	12,40	11,87	13,12
Контроль «+» ТРИБ	13,00	12,77	13,75
Контроль «+» МЕТ	13,40	12,52	12,94
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	14,60	12,66	16,75
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/МЕТ	12,50	12,13	17,24

Как следует из данных таблицы 5.14, массовая доля сухих веществ в корнеплодах свеклы столовой по вариантам опыта была близкой, порядка 12,5–14,6 %. Также близким было содержание в корнеплодах сахаров. Аналогично результатам, полученным на плодах томатов, для корнеплодов, растущих в условиях доставки депонированных форм гербицидов, характерно

повышение содержания витамина С, и это увеличение было в 1.4 раза по сравнению с контролями. Таким образом, вид гербицида и способ его применения на овощных культурах определяет не только продукционный потенциал культур, но и качество получаемой продукции.

Важным является потенциальная возможность накопления пестицидов в сельскохозяйственной продукции. Поэтому проведен хроматографический анализ содержания ТРИБ и МЕТ в овощах при различных способах доставки гербицидов (таблица 5.15). Установлено, что содержание метрибузина и трибенурон-метила в корнеплодах свеклы и плодах томатов, независимо от формы доставки (свободный или депонированный гербицид) присутствуют в количествах ниже 0,1 мкг/ кг, что соответствует нормативным данным.

Таблица 5.15 - Результаты хроматографического определения наличия пестицидов в корнеплодах свеклы и плодах томатов при различных формах доставки гербицидов

Вариант	Содержание гербицида в пробах (мкг/кг)	Соответствие нормативной документации
Свекла столовая сорт «Цилиндра»		
Контроль «+» ТРИБ	<0,1	соответствует
Контроль «+» МЕТ	<0,1	соответствует
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	<0,1	соответствует
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/МЕТ	<0,1	соответствует
Томаты сорт «Загадка»		
Контроль «+» ТРИБ	<0,1	соответствует
Контроль «+» МЕТ	<0,1	соответствует
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/ТРИБ	<0,1	соответствует
Эксперимент П(ЗГБ)/опилки/МЕТ	<0,1	соответствует

Таким образом, содержание метрибузина и трибенурон-метила в корнеплодах свеклы и плодах томатов, независимо от формы доставки (свободный или депонированный гербицид) определено в количествах, ниже 0,1 мкг/кг, что соответствует нормативным данным (Volova et al., 2021).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ

Показано, что биологическая эффективность экспериментальных форм МЕТ и ТРИБ в посевах зерновых и овощных культур составила от 80 % и выше, что существенно превышает показатели, полученные при опрыскивании свободными формами (30-60 %). Применение депонированных гербицидов по сравнению с опрыскиванием посевов зерновых свободными препаратами более активно подавляло развитие сорняков, обеспечивая получение более

высоких урожаев и качества зерна пшеницы и ячменя. При внесении депонированных ТРИБ и МЕТ получены самые высокие показатели урожая: урожайность пшеницы достигла 33,1 и 33,6 ц/га; ячменя, соответственно, 53,8 и 53,6 ц/га. Применение депонированного метрибузина оказывало выраженное подавление сорных растений в посадках овощных культур, ингибируя их фотосинтетическую активность. Снижение засоренности посадок сорняками способствовало повышению урожая и улучшению биометрических показателей овощных культур. Применение депонированной формы метрибузина обеспечило самые высокие урожаи томатов (230 ц/га) и свеклы столовой (337 ц/га), способствовало снижению концентрации нитратного азота в плодах томата и корнеплодах свеклы, а также наравне с депонированным трибенурон-метилом повышало концентрации витамина С в томатах и корнеплодах, соответственно, в 1,7 и 1,4 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена исследованию потенциала разрушаемого микробного полимера – поли-3-гидроксibuтирата для конструирования пролонгированных форм препаратов гербицидного действия и исследованию эффективности применения для подавления сорных растений. В связи с повсеместным применением средств защиты растений и огромными объемами используемых в растениеводстве препаратов, очевидно, что сегодня стоимость разрушаемых полигидроксиалканоатов для применения в этой области ограничивается высокой стоимостью. В связи с этим для снижения стоимости ПГА синтез необходимых партий полимеров выполнен с использованием в качестве углеродного субстрата глицерина, являющегося крупнотоннажным отходом производства биодизеля; кроме того, для депонирования пестицидов использовали полимер не в чистом виде, а в смеси с доступными природными материалами.

Синтез партий П(ЗГБ) реализован, исходя из необходимости повышения их доступности и удешевления. Реализовано культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на лабораторном и пилотном уровнях при использовании в качестве основного ростового субстрата глицерина. По результатам процесса культивирования сделан вывод о том, что продукционные показатели культуры сопоставимы с результатами, ранее полученными на сахарах. Урожай биомассы бактерий составлял от 70 до 150 г/л, соответственно, в лабораторном 15 л (Bio-Flo) и производственном 150 л (Bioengineering) ферментерах, имеющих различные массообменные характеристики; концентрация полимера в клетках – не ниже 75-80 %. Образцы полимера, синтезированного на глицерине, представляют собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, имеющий пониженные значения молекулярной массы и кристалличности (до 350 ± 50 кДа и 52 ± 2 %). Предварительные расчеты показали, что при использовании глицерина, в зависимости от степени его очистки, затраты на С-субстрат по сравнению с индивидуальными сахарами могут быть снижены: по сравнению с фруктозой на 41,6 – 55,0 %, по сравнению с глюкозой – на 8,4 – 29,4 %. Нарботаны партии поли-3-гидроксibuтирата П(ЗГБ) в количествах, необходимых для конструирования препаратов, изучены их физико-химические свойства с применением хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией, ЯМР-спектроскопией, ВЭЖХ, X-Ray, ДСК.

Отобраны и исследованы в качестве наполнителей природные материалы (торф, опилки и глина), сформированы смеси «полимер/наполнитель» в качестве основы для депонирования гербицидных препаратов. Для исследований выбрано два широко используемых гербицида, относящиеся к различным классам, обладающие различной химической структурой и

механизмом действия – метрибузин и трибенурон-метил. Впервые сконструированы долговременные формы этих гербицидов в двух вариантах - в виде гранул и таблетированных форм. Исследованы структура и свойства полученных трехкомпонентных гербицидных форм. Показано, что наполнение полимера природными материалами и гербицидами вызывает аморфизацию полимера, и это сопровождается снижением степени кристалличности. Анализ снятых ИК-спектров показал, что депонированные пестицидные препараты представляют собой физические смеси: в ИК-спектрах не обнаружено новых химических связей, что является показателем отсутствия химических реакций между полимером, гербицидами и материалами наполнителями и возможной инактивации гербицидов при депонировании.

Для исследования характеристик разработанных экспериментальных форм препаратов и определения их пригодности для длительного функционирования исследованы динамика разрушения и выход действующих веществ при экспонировании в лабораторных почвенных микросистемах с охарактеризованной почвой, включая структуру и динамику микробиоценоза как главного фактора биоразрушения полимерной основы. Показано влияние на этот процесс способа изготовления и геометрии депонированных препаратов. Все сконструированные варианты депонированных метрибузина и трибенурон-метила, независимо от типа используемого природного материала, представляют собой долговременные формы длительного функционирования в почве.

Исследование выхода действующих веществ в почву на фоне биоразрушения разработанных препаратов показало влияние на этот процесс геометрии формы (гранулы или таблетированная форма) и типа использованного пестицида. Довсходовое грунтовое применение депонированных пестицидов исключает загрязнение воздушной среды и негативное воздействие на полезную биоту, которые имеют место при традиционной обработке культивируемых растений опрыскиванием вегетативных органов растворами химических пестицидов. Показано, что депонирование гербицидов в основу «П(ЗГБ)/природный материал» обеспечивает длительное функционирование всех сконструированных типов форм гербицидов в почве (от полутора до трех месяцев) и позволяет пролонгировать действие гербицидов, включая стабилизацию биологической активности такого быстро инактивируемого гербицида, как трибенурон-метил. Исследовано влияние замедленного выхода гербицидов на структуру почвенного микробиоценоза и показано отсутствие негативного влияния на общий титр бактерий и грибов и соотношение основных эколого-трофических групп. С применением молекулярно-генетических методов идентифицированы общие и специфические деструкторы депонированных гербицидов.

Биологическая активность свободных и депонированных гербицидов исследована в лабораторных посевах повсеместно распространенных и засоряющих сельскохозяйственные

культуры сорных растений, а также в посевах яровой пшеницы и ячменя, зараженных сорняками. Установлена высокая гербицидная активность депонированных метрибузина и трибенурон-метила, сопоставимая со свободными формами и в ряде случаев – превосходящая их. Биологическая эффективность депонированного метрибузина сопоставима с его свободной формой и составила 100 % (полная гибель всех сорняков). Биологическая эффективность депонированного трибенурон-метила несколько ниже и проявляется по-разному на различных видах сорняков, при этом гербицидная активность свободной формы уступает депонированной. Это проявлялось на более поздних сроках наступления массовой гибели сорняков, что можно связать с известными данными о том, что этот гербицид активно метаболизируется в тканях высших растений до нетоксичных для них продуктов. Поэтому весьма важным является показанная возможность усиления действия этого гербицида в результате депонирования. Таким образом, депонирование гербицидов в разработанную разрушаемую основу П(ЗГБ)/природный материал не только не снижает активности по отношению ко многим сорным растениям, но также и усиливает их действие.

Для выявления повреждающих эффектов гербицидов с различным механизмом действия и в зависимости от формы доставки растениям исследовано влияние на фотосинтетическую активность сорных растений. Использована спектрофлуориметрия флуоресценции хлорофилла по результатам регистрации максимального квантового выхода фотосистемы 2 ($Y(II)_{max}$), скорости фотосинтетического транспорта электронов (ETR_{max}), выхода нефотохимического тушения флуоресценции ($Y(NPQ)_{max}$), а также содержания пигментов (хлорофилла *a* и *b*, и каротиноидов). Выявлено влияние на фотосинтетическую активность растений типа гербицида и формы доставки, а также видовых отличий сорных растений. Механизм действия метрибузина основан на ингибировании реакции Хилла (фотолиза воды) и фотосинтетического переноса электронов между первичным и вторичным акцепторами электронов фотосистемы II; трибенурон-метила - на ингибировании фермента ацетолактатсинтазы, вовлеченного в биосинтез разветвленных незаменимых аминокислот (валин, лейцин, изолейцин), что приводит к снижению их уровня в растительных тканях с последующим нарушением синтеза белка и нуклеиновых кислот. Результаты свидетельствуют о мощном ингибирующем действии обеих форм метрибузина на фотосинтетический аппарат всех исследуемых сорняков, которое вызывает снижение параметров флуоресценции, характеризующих ключевые реакции фотосинтеза ($Y(II)_{max}$ и ETR_{max}) от 8–10 раз по сравнению с отрицательным контролем. Ингибирование реакций транспорта электронов фотосистемы-2 (ФС2) блокировало фотохимическое использование растениями поглощенной энергии света и замедляло все процессы фотосинтеза, вплоть до полной их остановки. При исследовании влияния свободной и депонированных форм трибенурон-метила показано, что его свободная форма вызывает более

выраженное ингибирование параметров флуоресценции у растений на ранних стадиях эксперимента, но в дальнейшем, как правило, снижается в отличие от депонированного гербицида, действие которого возрастает во времени, достигая более сильного эффекта, чем свободный гербицид. Выраженность подавления фотосинтетической активности сорняков депонированным трибенурон-метилом в значительной мере зависит от видовой специфики сорняков в отличие от универсального действия метрибузина.

Эффективность экспериментальных форм метрибузина и трибенурон-метила исследована в микрополевых условиях в посевах яровой пшеницы, ярового ячменя и на двух овощных культурах (томаты и столовая свекла). Подтверждены лабораторные результаты эффективности применения долговременных форм гербицидных препаратов для подавления сорных растений при довсходовом грунтовым применении. Депонированные гербициды, подавляя развитие сорных растений, положительно влияют на общую урожайность овощных и зерновых культур, улучшая структуру урожая и качество продукции.

В результате выполненных исследований показано, что конструирование депонированных форм гербицидов с использованием разрушаемого П(ЗГБ), наполненного доступными природными материалами, обеспечивают адресную и пролонгированную доставку препаратов растениям без негативного влияния на полезную биоту и окружающую среду в целом, в отличие от традиционного опрыскивания растений растворами гербицидов в течение вегетации. Применение депонированных гербицидов призвано снизить нормы внесения и риск неконтролируемого распространения ксенобиотиков в биосфере.

ВЫВОДЫ

1. В культуре бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 реализован биотехнологический синтез поли-3-гидроксibuтирата на глицерине в качестве единственного источника углерода в лабораторном ($V=30$ л) и пилотном ($V=150$ л) ферментерах при концентрации полимера в клетках $75\pm 5\%$ и урожае биомассы бактерий от 70 до 150 г/л в зависимости от массообменных характеристик. В условиях пилотного производства синтезированы партии полимера при продукционных ($P_x=2,4\pm 0,1$ и $P_{(ПЗГБ)}=2,0\pm 0,2$ г/(л·ч)) и субстратных показателях ($Y_x=0,32\pm 0,02$ кг/кг и $Y_{(ПЗГБ)}=0,28\pm 0,02$ кг/кг), сопоставимых с сахарами при сокращении удельных трат на углеродный субстрат.

2. С использованием охарактеризованных физико-механических смесей П(ЗГБ)/природный материал (торф, глина или березовые опилки) сконструированы гербицидные препараты с различным механизмом действия (метрибузин, трибенурон-метил) в виде гранул и таблетированных форм длительного действия с периодом полураспада в почве 60 и 80 суток соответственно, на разрушаемость которых оказывает влияние состав смесевой основы, способ изготовления и геометрия формы.

3. Депонированные гербициды по мере разрушения полимерной основы обеспечивают постепенный выход и накопление действующих веществ в почве в течение вегетации, не оказывая негативного влияния на структуру почвенного микробиоценоза, соотношение основных эколого-трофических групп бактериальной и грибной компонент; среди первичных деструкторов П(ЗГБ) идентифицированы бактерии: *Pseudomonas sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus simplex*, *Pseudarthrobacter sp.*, *Streptomyces* и грибы: *Talaromyces purpureogenus*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces funiculosus*.

4. В лабораторных культурах сорных растений различных видов (*Amaranthus retroflexus*, *Sinapis arvensis*, *Leucanthemum maximum*, *Sisymbrium loeselii*, *Elsholtzia ciliata*, *Avena Fatula L.*, *Setaria macrocheata*) и посевах пшеницы и ячменя, зараженных сорняками, показано, что депонированный метрибузин обеспечивает 100%-ю гибель всех видов сорных растений, превосходя действие трибенурон-метила, который на 100% подавляет *E.ciliata* и *A.retroflexus* и 60-75 % остальных сорняков.

5. Исследование функциональной активности фотосинтетического аппарата сорных растений показало, что применение депонированных гербицидов вызывает длительной и нарастающей во времени ингибирующий эффект ключевых параметров флуоресценции хлорофилла (минимальный уровень флуоресценции, максимальный квантовый выход, скорость нециклического транспорта электронов), не уступающий действию свободных форм.

Пролонгированное подавление фотосинтетической активности сорняков трибенурон-метилом в значительной мере зависело от видовой специфики сорняков в отличие от универсального действия метрибузина, который снижал все исследуемые параметры флуоресценции в 8 –10 раз. Снижение содержания хлорофилла а, b и каротиноидов под действием депонированных форм сопоставимо с действием свободных гербицидов.

6. Эффективность применения депонированных гербицидов подтверждена в полевых условиях в посевах зерновых (яровые пшеница «Новосибирская 15» и ячмень «Биом») и на овощных культурах (томаты «Загадка» и столовая свекла «Цилиндра»). Депонированные гербициды, вносимые в почву одновременно с семенами, подавляют развитие сорных растений в течение вегетации, положительно влияя на общую урожайность культур, улучшая структуру урожая и качество продукции, превосходя действие коммерческих аналогов, используемых в виде опрыскивающих растворов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide / W.S. Abbott // *J. econ. Entomol.* – 1925. – Vol. 18. – №. 2. – P. 265-267.
2. Afreen, R. Challenges and perspectives of polyhydroxyalkanoate production from microalgae/cyanobacteria and bacteria as microbial factories: an assessment of hybrid biological system / R. Afreen, S.Tyagi, G. P. Singh, M. Singh // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2021. – Vol. 9. – P. 624885.
3. Agustien, A. Manufacture of a Slow Release Herbicide of Methyl-Metsulfuron using biopolymer of Poly (3-hydroxybutyrate) as Matrix / A. Agustien, A. Sari, A. Fitria, A. Djamaan // *Der Pharma Chem.* – 2016 – Vol.8. – №7. – P.105-111.
4. Akmal, D. Slow release herbicide of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid using a biopolymer as matrix of microcapsule / D. Akmal, N. Suharti, S. Yasin, U. Maria, P. D. Asiska // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2015 – Vol. 7, Is. 9. – P. 407-416.
5. Alvarez-Santullano, N. Genome-wide metabolic reconstruction of the synthesis of polyhydroxyalkanoates from sugars and fatty acids by *Burkholderia sensu lato* species / N. Alvarez-Santullano, P. Villegas, M. S. Mardones, R. E. Durán, R. Donoso, A. González, M. Seeger // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9. – №. 6. – P. 1290.
6. Angra, V. Trends in PHA Production by Microbially Diverse and Functionally Distinct Communities / V. Angra, R. Sehgal, R. Gupta // *Microbial Ecology.* – 2022. – P. 1-14.
7. Anunciado, M. B. Effect of environmental weathering on biodegradation of biodegradable plastic mulch films under ambient soil and composting conditions / M. B. Anunciado, D. G. Hayes, A. F. Astner, L. C. Wadsworth, C. D. Cowan-Banker, J. E. Gonzalez, J. M. DeBruyn // *Journal of Polymers and the Environment.* – 2021. – Vol. 29. – №. 9. – P. 2916-2931.
8. Arumugam, A. Statistical optimization and enhanced synthesis of polyhydroxyalkanoates from *Ceiba pendantra* oil as novel non-edible feedstock / A. Arumugam, P. Yogalaksha, M. Furhanashereen, V. Ponnusami // *Biomass Conversion and Biorefinery.* – 2020. – P. 1-10.
9. Ashitha A. Characteristics and Types of Slow/Controlled Release of Pesticides / A. Ashitha, M. Jyothis // In book: *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture* - 2019
10. Barde, L. Y., Adamu, H. Polyhydroxyalkanoates (PHAs), bioprocessing using waste oil / L. Y. Barde, H. Adamu // *GSC Advanced Research and Reviews.* – 2021. – Vol. 9. – №. 1. – P. 157-163.
11. Bensalah, H. Mechanical, thermal, and rheological properties of polypropylene hybrid composites based clay and graphite/ H. Bensalah, K. Gueraoui, H. Essabir, D. Rodrigue, R. Bouhfid, A. E. K. Qaiss // *Journal of Composite Materials.* – 2017. – Vol. 51. – №. 25. – P. 3563-3576.

12. Borrero-de Acuña, J. M. Fed-Batch mcl-Polyhydroxyalkanoates Production in *Pseudomonas putida* KT2440 and Δ phaZ Mutant on Biodiesel-Derived Crude Glycerol / J. M. Borrero-de Acuña, M. Rohde, C. Saldias, I. Poblete-Castro // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 642023.
13. Boussiba, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response/ S. Boussiba // *Physiologia plantarum*. – 2000. – Vol. 108. – №. 2. – C. 111-117.
14. Boyandin, A. N. Constructing slow-release formulations of ammonium nitrate fertilizer based on degradable poly (3-hydroxybutyrate) / A. N. Boyandin, E. A. Kazantseva, D. E. Varygina, T. G. Volova // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2017. – Vol. 65. – №. 32. – P. 6745-6752.
15. Brasovean I., Oroian V. Florian Integrated Control of Potato Diseases / I. Brasovean, V. Oroian // *Pro Environment 2*. – 2009. – P.230-234.
16. Cao, L. Biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) microcapsules for controlled release of trifluralin with improved photostability and herbicidal activity / L. Cao, Y. Liu, C. Xu, Z. Zhou, P. Zhao, S. Niu, Q. Huang // *Materials Science and Engineering: C* – 2019. – Vol. 102. – P. 134-141.
17. Carlozzi, P. Poly (3-hydroxybutyrate) bioproduction in a two-step sequential process using wastewater / P. Carlozzi, A. Giovannelli, M. L. Traversi, E. Touloupakis // *Journal of Water Process Engineering*. – 2021. – Vol. 39. – P. 101700.
18. Chan C.M. Understanding the effect of copolymer content on the processability and mechanical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)/wood composites/ C. M. Chan, L. J. Vandi, S. Pratt, P. Halley, Y. Ma, G. Q. Chen, B. Laycock // *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. – 2019. – Vol. 124. – C. 105437.
19. Chang, Y. C. Two-stage polyhydroxyalkanoates (PHA) production from cheese whey using *Acetobacter pasteurianus* C1 and *Bacillus* sp. CYR1 / Y. C. Chang, M. V. Reddy, K. Imura, R. Onodera, N. Kamada, Y. Sano // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8. – №. 11. – P. 157.
20. Chen, G. Effective and Sustained Control of Soil-Borne Plant Diseases by Biodegradable Polyhydroxybutyrate Mulch Films Embedded with Fungicide of Prothioconazole / G. Chen, L. Cao, C. Cao, P. Zhao, F. Li, B. Xu, Q. Huang // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №3. – P.762.
21. Chen, G. Q. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) / G. Q. Chen, X. R. Jiang, Y. Guo // *Synthetic and systems biotechnology*. – 2016. – Vol. 1. – №. 4. – P. 236-242.
22. Chhipa, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture / H. Chhipa // *Environmental chemistry letters* – 2017. – Vol. 15. – №. 1. – P. 15-22.

23. Chilali, A. Mechanical characterization and damage events of flax fabric-reinforced biopolymer composites / A. Chilali, M. Assarar, W. Zouari, H. Kebir, R. Ayad // *Polymers and Polymer Composites*. – 2020. – Vol. 28. – №. 8-9. – P. 631-644.
24. Chin, J. H. C. Characterization of polyhydroxyalkanoate production capacity, composition and weight synthesized by *Burkholderia cepacia* JC-1 from various carbon sources / J. H. C. Chin, M. R. Samian, Y. M. Normi // *Heliyon*. – 2022. – Vol. 8. – №. 3. – P. e09174.
25. Choonut, A. Study on mcl-PHA production by novel thermotolerant gram-positive isolate / A. Choonut, P. Prasertsan, S. Klomklao, K. Sangkharak // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2020. – Vol. 28. – №. 9. – P. 2410-2421.
26. Connick, W.J. Controlled release of the herbicides 2, 4 - D and dichlobenil from alginate gels / W.J. Connick // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1982. – Vol. 27. – №. 9. – P. 3341-3348.
27. Cooke, L.R. Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe / L.R. Cooke, H.T.A.M. Schepers, A. Hermansen, R.A. Bain, N.J. Bradshaw, F. Ritchie, D.S. Shaw, A. Evenhuis, G.J.T. Kessel, J.G.N. Wander, B. Andersson, J.G. Hansen, A. Hannukkala, R. Nærstad, B.J. Nielsen // *Potato research*. – 2011. – Vol. 54. – №. 2. – P. 183-222.
28. Corrêa, P. S., Teixeira, C. M. L. L. Polyhydroxyalkanoates and pigments coproduction by *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in crude glycerol / P. S. Corrêa, C. M. L. L. Teixeira // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – Vol. 33. – №. 3. – P. 1487-1500.
29. da Cruz Pradella, J.G. Economics and industrial aspects of PHA production / J.G. da Cruz Pradella // *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. – 2020. – P. 389-404.
30. Dalton, B. A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications / B. Dalton, P. Bhagabati, J. De Micco, R. B. Padamati, K. A. O'Connor, K. A // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12. – №. 3. – P. 319.
31. David, G. Using life cycle assessment to quantify the environmental benefit of upcycling vine shoots as fillers in biocomposite packaging materials / G. David, G. Croxatto Vega, J. Sohn, A. E. Nilsson, A. Hélias, N. Gontard, H. Angellier-Coussy // *The International Journal of Life Cycle Assessment*. – 2021. – Vol. 26. – №. 4. – P. 738-752.
32. Davoren, M. J., Schiestl, R. H. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research / M. J. Davoren, R. H. Schiestl // *Carcinogenesis*. – 2018. – Vol. 39. – №. 10. – P. 1207-1215.
33. de Meneses, L. *Pseudomonas chlororaphis* as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines / L. de Meneses, J. R. Pereira, C. Sevrin, C. Grandfils, A. Paiva, M. A. Reis, F. Freitas // *New Biotechnology*. – 2020. – Vol. 55. – P. 84-90.
34. De, A., Bose, R., Kumar, A., & Mozumdar, S. Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles. – New Delhi : Springer India, 2014. – P. 5-6.

35. del Carmen Galán-Jiménez, M. A sepiolite-based formulation for slow release of the herbicide mesotrione / M. del Carmen Galán-Jiménez, E. Morillo, F. Bonnemoy, C. Mallet, T. Undabeytia // *Applied Clay Science*. – 2020. – Vol. 189. – P. 105503.
36. Deng, X. Excellent sustained-release efficacy of herbicide quinclorac with cationic covalent organic frameworks / X. Deng, P. Zhao, X. Zhou, L. Bai // *Chemical Engineering Journal*. – 2021. – Vol. 405. – P. 126979.
37. Diyanat, M., Saeidian, H. The metribuzin herbicide in polycaprolactone nanocapsules shows less plant chromosome aberration than non-encapsulated metribuzin / M. Diyanat, H. Saeidian // *Environmental Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 17. – №. 4. – P. 1881-1888.
38. Dwivedi, R. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds / R. Dwivedi, R. Pandey, S. Kumar, D. Mehrotra // *Journal of oral biology and craniofacial research*. – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 389-392.
39. Edwards, C.A. The environmental impact of insecticides. In: Delucchi, V. (Ed.) *Integrated pest management, Protection Integàee Quo vadis? An International Perspective*. / C.A. Edwards // *Parasitis* 86. - Geneva, Switzerland. – 1987. – P. 309–329.
40. Endah, E. S. Harnessing molasses as a low-cost carbon source for production of poly-hydroxy butyrate (PHB) using *Burkholderia* sp. B73 bacteria / E. S. Endah, P. Lisdiyanti, S. Priatni, V. Saraswaty // *E-Journal Menara Perkebunan*. – 2021. – Vol. 89. – №. 2.
41. Ertan, F. Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the production of poly (3-hydroxybutyrate) using acid treated beet molasses / F. Ertan, B. Keskinler, A. Tanriseven // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2021. – Vol. 29. – №. 7. – P. 2111-2125.
42. Fernández-Pérez, M. Use of bentonite and activated carbon in controlled release formulations of carbofuran / M. Fernández-Pérez, M. Villafranca-Sánchez, F. Flores-Céspedes, F.J. Garrido-Herrera, S. J. Pérez-García // *Agric Food Chem* – 2005 – Vol. 53 – P. 6697–6703.
43. Fernandez-Urrusuno, R. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose / R. Fernandez-Urrusuno, J. M. Gines, E. Morillo // *Journal of microencapsulation*. – 2000. – Vol. 17. – №. 3. – P. 331-342.
44. Flores-Sánchez, A. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from vegetable oil under the co-expression of *fadE* and *phaJ* genes in *Cupriavidus necator* / A. Flores-Sánchez, A. Rathinasabapathy, M. del Rocío López-Cuellar, B. Vergara-Porras, F. Pérez-Guevara // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 164. – P. 1600-1607.
45. Foyer C. H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub/ C. H. Foyer, G. Noctor // *Plant physiology*. – 2011. – Vol. 155. – №. 1. – P. 2-18.
46. Geyer, R. Production, use, and fate of all plastics ever made/ R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law // *Science advances*. – 2017. – Vol. 3. – №. 7. – P. e1700782

47. Ghormade, V. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants / V. Ghormade, M. V. Deshpande, K. M. Paknikar // *Biotechnology advances*. – 2011. – Vol. 29. – №. 6. – P. 792-803.
48. Gigante, V. On the use of biobased waxes to tune thermal and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates–bran biocomposites / V. Gigante, P. Cinelli, M. C. Righetti, M. Sandroni, G. Polacco, M. Seggiani, A. Lazzeri // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – №. 11. – P. 2615.
49. Gómez-Gast, N. Biopackaging Potential Alternatives: Bioplastic Composites of Polyhydroxyalkanoates and Vegetal Fibers / N. Gómez-Gast, M. D. R. López Cuellar, B. Vergara-Porras, H. Vieyra // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – №. 6. – P. 1114.
50. Granetto, M. Natural clay and biopolymer-based nanopesticides to control the environmental spread of a soluble herbicide / M. Granetto, L. Serpella, S. Fogliatto, L. Re, C. Bianco, F. Vidotto, T. Tosco // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 806. – P. 151199.
51. Grigore, M. E. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review / M. E. Grigore, R. M. Grigorescu, L. Iancu, R. M. Ion, C. Zaharia, E. R. Andrei // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2019. – Vol. 30. – №. 9. – P. 695-712.
52. Grillo, R. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres / R. Grillo, N.F.S. de Melo, R. de Lima, R.W. Lourenço, A.H. Rosa, L.F. Fraceto // *J.Polym. Environ.* – 2010. – Vol 18. – №1. – P. 26-32.
53. Hussain, S. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions / S. Hussain, T. Siddique, M. Saleem, M. Arshad, A. Khalid // *Advances in agronomy*. – 2009. – Vol. 102. – P. 159-200.
54. Ippolito, A. Modeling global distribution of agricultural insecticides in surface waters / A. Ippolito, M. Kattwinkel, J. J. Rasmussen, R. B. Schäfer, R. Fornaroli, M. Liess // *Environmental Pollution*. – 2015. – Vol. 198. – P. 54-60.
55. Jabrail, F. H. Controlled Release Behaviors of Tribenuron Methyl Herbicide and Potassium Nitrate Fertilizer from Natural Polymer Blended Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Microspheres / F. H. Jabrail, W. M. Jamil, M. Z. Elsabee, K. C. Gupta // *American Journal of Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 16. – №5. – P. 162-181.
56. Jallow, M.F.A. Pesticide risk behaviors and factors influencing pesticide use among farmers in Kuwait / M.F.A. Jallow, D.G. Awadh, M.S. Albaho, V.Y. Devi, B.M. Thomas // *Science of the Total Environment*. – 2017. – Vol. 574. – P. 490-498.
57. Jo, S. Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by recombinant *Ralstonia eutropha* strains / S. Y. Jo, Y. J. Sohn, S. Y. Park, J. Son, J. I. Yoo, K. A. Baritugo, S. J. Park // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2021. – Vol. 38. – №. 7. – P. 1452-1459.

58. Kalaoglu-Altan, O. I. Silver nanoparticle-coated polyhydroxyalkanoate based electrospun fibers for wound dressing applications / O.I. Kalaoglu-Altan, H. Baskan, T. Meireman, P. Basnett, B. Azimi, A. Fusco, K. De Clerck // *Materials*. – 2021. – Vol. 14. – №. 17. – P. 4907.
59. Kalia, V. C. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications / V. C. Kalia, S. K. S. Patel, R. Shanmugam, J. K. Lee // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 326. – P. 124737.
60. Khan, A. K. An overview on feasible production of bioplastic polyhydroxyalkanoate (PHA) in transgenic plants / A. K. Khan, I. Anjum, C. Hano, B. H. Abbasi, S. Anjum // *Bioplastics for Sustainable Development*. – 2021. – P. 555-579.
61. Khan, H. Effective control against broadleaf weed species provided by biodegradable PBAT/PLA mulch film embedded with the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) / H. Khan, S. Kaur, T.C. Baldwin, I. Radecka, G. Jiang, I. Bretz, K. Duale, G. Adamus, M. Kowalczyk // *ACS sustainable chemistry & engineering*. – 2020. – Vol. 8. – №. 13. – P. 5360-5370.
62. Khan, H. Effective control against broadleaf weed species provided by biodegradable PBAT/PLA mulch film embedded with the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) / H. Khan, S. Kaur, T. C. Baldwin, I. Radecka, G. Jiang, I. Bretz, M. Kowalczyk // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* – 2020. – Vol. 8. – №. 13. – P. 5360-5370.
63. Kiselev, E. G., Baranovskiy, S. V. The Kinetics of Fungicide and Herbicide Release from Slow-Release Formulations Prepared from Degradable Poly-3-Hydroxybutyrate / E. G. Kiselev, S. V. Baranovskiy // *Journal of Siberian Federal University* – 2016. – Vol. 9 – P. 233.
64. Koller, M., Mukherjee, A. Polyhydroxyalkanoates—linking properties, applications, and end-of-life options / M. Koller, A. Mukherjee // *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. – 2020. – Vol. 34. – №. 3. – P. 115-129.
65. Kovalcik, A. Properties of scaffolds prepared by fused deposition modeling of poly (hydroxyalkanoates) / A. Kovalcik, L. Sangroniz, M. Kalina, K. Skopalova, P. Humpolíček, M. Omastova, N. Mundigler, A.J. Müller // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 161. – P. 364-376.
66. Kramer D.M. New flux parameters for the determination of QA redox state and excitation fluxes / D.M. Kramer, G. Johnson, O. Kiirats, G.E. Edwards // *Photosynthesis Res.* – 2004 – Vol. 79. – P. 209–218.
67. Kubsad, D. Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology // D. Kubsad, E.E. Nilsson, S.E. King, I. Sadler-Riggelman, D. Beck, M. K. Skinner // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – №. 1. – P. 1-17.

68. Kumar, J. Controlled release formulations of metribuzin: Release kinetics in water and soil / J. Kumar, K. Nisar, N. A. Shakil, S. Walia, R. Parsad // *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* – 2010. – Vol. 45, Is:4. – P. 330-335.
69. Kumar, P. Role of nanotechnology in slow release of herbicide and season long weed control: A review / P. Kumar // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2020. – Vol. 9. – №. 5. – P. 1882-1888
70. Kumar, V. Bioprocess for co-production of polyhydroxybutyrate and violacein using Himalayan bacterium *Iodobacter* sp. PCH194 / V. Kumar, S. Darnal, S. Kumar, S. Kumar, D. Singh // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 319. – P. 124235.
71. Kwiecien, I. Biodegradable PBAT/PLA blend with bioactive MCPA-PHBV conjugate suppresses weed growth / I. Kwiecien, G. Adamus, G. Jiang, I. Radecka, T.C. Baldwin, H.R. Khan, B. Johnston, V. Pennetta, D. Hill, I. Bretz, M. Kowalczyk // *Biomacromolecules*. – 2018. – Vol. 19. – №. 2. – P. 511-520.
72. Laycock, B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant // *Progress in polymer science*. – 2013. – Vol. 38. – №. 3-4. – P. 536-583.
73. Lee, S.J. Acute pesticide illnesses associated with off-target pesticide drift from agricultural applications: 11 States, 1998–2006 / S.J. Lee, L. Mehler, J. Beckman, B. Diebolt-Brown, J. Prado, M. Lackovic, J. Waltz, P. Mulay, A. Schwartz, Y. Mitchell, S. Moraga - McHaley, R. Gergely, G.M. Calvert // *Environmental health perspectives*. – 2011. – Vol. 119. – №. 8. – P. 1162-1169.
74. Li, S. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring / S. Li, Q. Wu, Q. Sun, S. Coffin, W. Gui, G. Zhu // *Aquatic Toxicology*. – 2019. – Vol. 211. – P. 116-123.
75. Li, Z.Z. Controlled release of avermectin from porous hollow silica nanoparticles: Influence of shell thickness on loading efficiency, UV-shielding property and release / Z. Z. Li, S. A. Xu, L.X. Wen, F. Liu, A. Q. Liu, Q. Wang, J. F. Chen // *Journal of Controlled Release* – 2006. – Vol. 111. – P. 81-88.
76. Liang, W. A biodegradable water-triggered chitosan/hydroxypropyl methylcellulose pesticide mulch film for sustained control of *Phytophthora sojae* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) / W. Liang, Y. Zhao, D. Xiao, J. Cheng, J. Zhao // *J. Clean. Prod.* – 2020. – Vol. 245. – P.118943.
77. Lichtenthaler, H. K. Reflectance spectra and images of green leaves with different tissue structure and chlorophyll content / H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, S. Lenk // *Israel Journal of Plant Sciences* – 2001 – Vol. 60 – P. 49-54.
78. Lobo, F. Poly(Hydroxybutyrate-Cohydroxyvalerate) Microspheres Loaded with Atrazine Herbicide: Screening of Conditions of Preparation, Physico-Chemical Characterization, and In Vitro

- Release Studies / F. Lobo, C. Aguirre, M. Silva, R. Grillo, N. de Melo, L. Oliveira, L. Morais, V. Campos, A. Rosa, L. Fraceto // *Polym. Bull.* – 2011 – Vol. 67 – P. 479–495.
79. Macedo, D. F. Controlled Release of TBH Herbicide Encapsulated on Ca-ALG Microparticles: Leaching and Phytointoxication Plants / Macedo, D. F., Dourado, S., Nunes, E. S., Marques, R. P., & Moreto, J. A. // *Planta Daninha.* – 2019. – Vol. 37.
80. Manfo, F.P.T. Bisphenol A differentially affects male reproductive function biomarkers in a reference population and agro pesticides users from Djutitsa, Cameroon / F.P.T. Manfo, C. Harthé, E.A. Nantia // *Toxicology and Industrial Health.* – 2019. – Vol. 35. – №. 4. – P. 324-335.
81. Melo da Costa, M. P. Sodium alginate/chitosan/glyphosate superabsorbent biofoam as a release system for herbicide / M. P. Melo da Costa, K. Rabelo, I.L.D.M. Ferreira, M.T.D.M. Cruz // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2022. – Vol. 139. – №. 11. – P. 51776.
82. Mendes, L. A. New Trends for Controlled-Release of TBH Herbicide in the Field by Using a Biodegradable Polymer Fashion / L. A. Mendes, R. P. Marques, S. A. Silva, N. B. Leite, K. Schwarz, J. A. Moreto // *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry.* – 2020. – P. 291-296.
83. Mineau, P., Whiteside, M. Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification / P. Mineau, M. Whiteside // *PloS one.* – 2013. – Vol. 8. – №2. – P.e57457.
84. Mujtaba, M. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions / M. Mujtaba, K. M. Khawar, M. C. Camara, L. B. Carvalho, L. F. Fraceto, R. E. Morsi, D. Wang // *International journal of biological macromolecules.* – 2020. – V. 154. – P. 683-697.
85. Munoz-Leoz, B. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity / B. Munoz-Leoz, E. Ruiz-Romera, I. Antigüedad, C. Garbisu // *Soil Biology and Biochemistry.* – 2011. – Vol. 43. – №. 10. – P. 2176-2183.
86. Murugan, P. Development and evaluation of controlled release fertilizer using P (3HB-co-3HHx) on oil palm plants (nursery stage) and soil microbes / Murugan, P., Ong, S. Y., Hashim, R., Kosugi, A., Arai, T., & Sudesh, K // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2020. – Vol.. 28. – P. 101710.
87. Musioł, M. (Bio) degradable polymeric materials for sustainable future—Part 3: Degradation studies of the PHA/wood flour-based composites and preliminary tests of antimicrobial activity / M. Musioł, S. Jurczyk, M. Sobota, M. Klim, W. Sikorska, M. Zięba, I. Radecka // *Materials.* – 2020. – Vol. 13. – №. 9. – P. 2200.
88. Nakamura, M. Comparison between the triglycerides standardization of routine methods used in Japan and the chromatographic acid reference measurement procedure used by the CDC Lipid Standardization Programme/ M. Nakamura, H. Iso, A. Kitamura, H. Imano, H. Noda, M. Kiyama, Y. Miyamoto // *Annals of clinical biochemistry.* – 2016. – Vol. 53. – №. 6. – P. 632-639.

89. Nekhlaoui, S. Fracture study of the composite using essential work of fracture method: PP–SEBS–g–MA/E1 clay/ S. Nekhlaoui, H. Essabir, M. O. Bensalah, O. Fassi-Fehri, A. Qaiss, Bouhfid R. // *Materials & Design*. – 2014. – Vol. 53. – P. 741-748.
90. Nishimoto, R. Global trends in the crop protection industry / R. Nishimoto // *J.Pestic.Sci.* – 2019. – P.D19-101.
91. Nörnberg, A. B. Alginate-cellulose biopolymeric beads as efficient vehicles for encapsulation and slow-release of herbicide / A. B. Nörnberg, V. R. Gehrke, H. P. Mota, E. R. Camargo, A. R. Fajardo // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2019. – Vol. 583. – P. 123970.
92. Núñez-Zofío, M. Application of organic amendments followed by soil plastic mulching reduces the incidence of *Phytophthora capsici* in pepper crops under temperate climate / M. Núñez-Zofío, S. Larregla, C. Garbisu // *J. Crop Prot.* – 2011. – Vol. 30. – №12. – P.1563-1572.
93. Oerke, E.C. Crop losses to pests / E.C. Oerke // *The Journal of Agricultural Science*. – 2005. – Vol. 144. – P. 31 - 43.
94. PAN (Pestizid Aktions-Netzwerk) Pesticides and health hazards Facts and figures. Pesticide Action Network, Germany, GLS Gemeinschaftsbank. – 2012.
95. Pan, L. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from food waste oil by *Pseudomonas alcaligenes* with simultaneous energy recovery from fermentation wastewater / L. Pan, J. Li, R. Wang, Y. Wang, Q. Lin, C. Li, Y. Wang // *Waste Management*. – 2021. – Vol. 131. – P. 268-276.
96. Pandian, S. R. K. Delivery of Ursolic Acid by Polyhydroxybutyrate Nanoparticles for Cancer Therapy: in silico and in vitro Studies / S. R. K. Pandian, S. Kunjiappan, P. Pavadai, V. Sundarapandian, V. Chandramohan, K. Sundar // *Drug Research*. – 2022. – V. 72. – №. 02. – P. 72-81.
97. Patel, S. Pesticides as the drivers of neuropsychotic diseases, cancers, and teratogenicity among agro-workers as well as general public / S. Patel, S. Sangeeta // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26. – №. 1. – P. 91-100.
98. Pazikowska-Sapota, G. The impact of pesticides used at the agricultural land of the Puck commune on the environment of the Puck Bay / G. Pazikowska-Sapota, K. Galer-Tatarowicz, G. Dembska, M. Wojtkiewicz, E. Duljas, S. Pietrzak, L. A. Dzierzbicka-Głowacka // *PeerJ*. – 2020. – Vol. 8. – P. e8789.
99. Pecorini, G. Additive Manufacturing of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Poly (D, L-lactide-co-glycolide) Biphasic Scaffolds for Bone Tissue Regeneration / G. Pecorini, S. Braccini, G. Parrini, F. Chiellini, D. Puppi // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23. – №. 7. – P. 3895.
100. Pendyala, R., Senthilkumar, R., & Azri, M. H. B. Microbial production of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) from rubber seed oil using *Cupriavidus necator* H16 / R. Pendyala, R.

- Senthilkumar, M. H. B. Azri // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – Vol. 398. – № 1. – P. 012008.
101. Pepperman A.B. Alginate controlled release formulations of metribuzin / A.B. Pepperman, J.C.W. Kuan, C. McCombs // J Control release – 1991 – Vol.. 17 – P. 105–112.
102. Popp, J. Pesticide productivity and food security. A review / J. Popp, K. Pető, J. Nagy // Agronomy for sustainable development. – 2013. – Vol. 33. – №. 1. – P. 243-255.
103. Pracella, M. Polyhydroxyalkanoate nanocomposites with cellulose nanocrystals as biodegradable coating and packaging materials / M. Pracella, C. Mura, G. Galli // ACS Applied Nano Materials. – 2021. – Vol. 4. – №. 1. – P. 260-270.
104. Pratt, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics from organic waste / S. Pratt, L. J. Vandi, D. Gapes, A. Werker, A. Oehmen, B. Laycock // Biorefinery. – Springer, Cham, 2019. – P. 615-638.
105. Preisler, A. C. Atrazine nanoencapsulation improves pre emergence herbicidal activity against *Bidens pilosa* without enhancing long term residual effect on *Glycine max* / A. C. Preisler, A. E. S. Pereira, E. V. R. Campos, G. Dalazen, L. F. Fraceto, H. C. Oliveira // Pest Manag Sci. – 2019. – Vol. 75. – P. 141-149.
106. Rakhimol, K. R. Controlled release of pesticides for sustainable agriculture / K. R. Rakhimol, S. Thomas, T. Volova, K. Jayachandran // – Springer International Publishing. – 2020.
107. Ramírez, C. A. O. Glycerol-assisted degradation of dibenzothiophene by *Paraburkholderia* sp. C3 is associated with polyhydroxyalkanoate granulation / C. A. O. Ramírez, T. Ching, B. Yoza, Q.X. Li // Chemosphere. – 2022. – Vol. 291. – P. 133054.
108. Rashidipour, M. Pectin/chitosan/tripolyphosphate nanoparticles: efficient carriers for reducing soil sorption, cytotoxicity, and mutagenicity of paraquat and enhancing its herbicide activity / M. Rashidipour, A. Maleki, S. Kordi, M. Birjandi, N. Pajouhi, E. Mohammadi, B. Davari // Journal of agricultural and food chemistry. – 2019. – Vol. 67. – №. 20. – P. 5736-5745.
109. Ratnaningrum, D. Screening of polyhydroxyalkanoates (PHA)-producing bacteria from soil bacteria strains / D. Ratnaningrum, V. Saraswaty, S. Priatni, P. Lisdiyanti, A. Purnomo, S. Pudjiraharti // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2019. – Vol. 277. – №. 1. – P. 012003.
110. Roy, A. Controlled pesticide release from biodegradable polymers / A. Roy, S. K. Singh, J. Bajpai, A. K. Bajpai // Central European Journal of Chemistry – 2014 – V. 12 Is. 4 – P. 453- 469.
111. Rychter, P. PLGA– PEG terpolymers as a carriers of bioactive agents, influence of PEG blocks content on degradation and release of herbicides into soil / Rychter P., Lewicka K., Pastusiak M., Domański M., Dobrzyński P. // Polymer Degradation and Stability – 2019. – V. 161. – P. 95 -107.
112. Saad, V. Low-quality animal by-product streams for the production of PHA-biopolymers: fats, fat/protein-emulsions and materials with high ash content as low-cost feedstocks / V. Saad, B.

- Gutschmann, T. Grimm, T. Widmer, P. Neubauer, S. L. Riedel // *Biotechnology Letters*. – 2021. – Vol. 43. – №. 3. – P. 579-587.
113. Salač, J. Slow release formulation of herbicide metazachlor based on high molecular weight poly(lactic acid) submicro and microparticles / J. Salač, T. Šopík, P. Stloukal, N. Janásová, M. Jursík, M. Koutný // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2019. – V. 16, Is. 10. – P. 6135–6144.
114. Sánchez-Bayo, F. Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems / F. Sánchez-Bayo // *Ecological impacts of toxic chemicals*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 63-87.
115. Sander, M. Biodegradation of polymeric mulch films in agricultural soils: concepts, knowledge gaps, and future research directions / M. Sander // *Environ. Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 53. – №5. – P.2304-2315.
116. Sangkharak, K. The production of polyhydroxyalkanoate from waste cooking oil and its application in biofuel production / K. Sangkharak, P. Khaithongkao, T. Chuaikhunupakarn, A. Choonut, P. Prasertsan // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021. – Vol. 11. – №. 5. – C. 1651-1664
117. Saratale, R. G. A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams / R. G. Saratale, S.-K. Cho, G. Dattatraya Saratale, A. A. Kadam, G. S. Ghodake, M. Kumar, H. A. Seung Shin // *Bioresource technology*. – 2021. – Vol. 325. – P. 124685.
118. Sasso E. L. et al. Occupational exposure of rural workers to pesticides in a vegetable-producing region in Brazil / Sasso, E. L., Cattaneo, R., Storck, T. R., Mayer, M. S., Sant'Anna, V., & Clasen, B // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – Vol. 28. – №. 20. – P. 25758-25769.
119. Savenkova L. PHB-based films as matrices for pesticides / L. Savenkova, Z. Gerberga, O. Muter, V. Nikolaeva, A. Dzene, V. Tupureina // *Proc.Biochem.* – 2002. – Vol. 37. – №7. – P.719-722.
120. Schmid, M. T. Pilot scale production and evaluation of mechanical and thermal properties of P (3HB) from *Bacillus megaterium* cultivated on desugarized sugar beet molasses / M. T. Schmid, E. Sykacek, K. O'Connor, M. Omann, N. Mundigler, M. Neureiter // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2022. – Vol. 139. – №. 3. – P. 51503.
121. Shahid, S. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy / S. Shahid, S. Razzaq, R. Farooq // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 166. – P. 297-321.
122. Shershneva, A.M Antifungal activity of P3HB microparticles containing tebuconazole / A.M. Shershneva, A.V. Murueva, N.O. Zhila, T.G. Volova // *Journal of Environmental Science and Health, Part B* – 2019 – P. 196-204.

123. Shetye, L. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in *Nostoc muscorum* from biodiesel industry waste: a sustainable model of bioplastic production / L. Shetye, V. D. Mendhulkar // *Journal of Applied Phycology*. – 2022. – Vol. 34. – №. 3. – P. 1377-1387.
124. Siebers, J. Investigation on downwind short-range transport of pesticides after application in agricultural crops / J. Siebers, R. Binner, K. P. Wittich // *Chemosphere*. – 2003. – Vol. 51. – №. 5. – P. 397-407.
125. Singh, A. Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture / A. Singh, N. Dhiman, A. K. Kar, D. Singh, M. P. Purohit, D. Ghosh, S. Patnaik // *Journal of hazardous materials*. – 2020. – Vol. 385. – P. 121525.
126. Singh, B., Mandal, K. Environmental impact of pesticides belonging to newer chemistry / B. Singh, K. Mandal // *Integrated pest management*. – 2013. – P. 152-190.
127. Smith, M.K. Sustainable composites from poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) bioplastic and agave natural fibre / M.K. Smith, D.M. Paleri, M. Abdelwahab, D.F. Mielewski, M. Misra, A.K. Mohanty // *Green Chemistry*. – 2020. – Vol. 22. – №. 12. – P. 3906-3916.
128. Sopena, F. Controlled release of the herbicide norflurazon into water from ethylcellulose formulations / F. Sopena, A. Cabrera, C. Maqueda, E. Morillo // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2005. – Vol. 53. – №. 9. – P. 3540-3547.
129. Sousa, G. F. Post-emergence herbicidal activity of nanoatrazine against susceptible weeds / G.F. Sousa, D. G. Gomes, E. V Campos, J. L. Oliveira, L. F. Fraceto, R. Stolf-Moreira, H. C. Oliveira // *Frontiers in Environmental Science*. – 2018. – Vol. 6. – P. 12.
130. Stanley, A. Characterization of polyhydroxyalkanoate produced by *Halomonas venusta* KT832796 / A. Stanley, P. S. Murthy, S. V. N. Vijayendra // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2020. – Vol. 28. – №. 3. – P. 973-983.
131. Suave, J. Biodegradable microspheres of poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ϵ -caprolactone) loaded with malathion pesticide: Preparation, characterization, and in vitro controlled release testing / J. Suave, E.C. Dall'Agnol, A.P.T. Pezzin, M.M. Meier, D.A.K. Silva // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2010. – Vol. 117. – №6. – P. 3419-3427.
132. Sudesh K., Abe H. Practical guide to microbial polyhydroxyalkanoates. – ISmithers, 2010.
133. Sun, C. Advances in targeted pesticides with environmentally responsive controlled release by nanotechnology / C. Sun, Y. Shen, B. Huang, Z. Zeng, K. Qian, F. Gao, B. Cui, H. Cui, F. Chen, X. Zhao, Y. Wang // *Nanomaterials* -2018. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 102.
134. Surendran, A. Can polyhydroxyalkanoates be produced efficiently from waste plant and animal oils? / A. Surendran, M. Lakshmanan, J. Y. Chee, A. M. Sulaiman, D. V. Thuoc, K. Sudesh // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 169.

135. Taban, A. A natural post-emergence herbicide based on essential oil encapsulation by cross-linked biopolymers: characterization and herbicidal activity / A. Taban, M. J. Saharkhiz, R. Naderi // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – Vol. 27. – №. 36. – P. 45844-45858.
136. Talan, A., Kaur, R., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2020). Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100496.
137. Tanikkul, P. Biosynthesis of medium chain length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) from palm oil / P. Tanikkul, G. L. Sullivan, S. Sarp, N. Pisutpaisal // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. – 2020. – Vol. 2. – P. 100045.
138. Tarrahi, R. Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture/ R. Tarrahi, Z. Fathi, M.Ö. Seydibeyoğlu, E. Doustkhah, A. Khataee // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – Vol. 146. – P. 596-619.
139. Thakur, N. Microbial biopesticides: current status and advancement for sustainable agriculture and environment / N. Thakur, S. Kaur, P. Tomar, S. Thakur, A. N. Yadav // *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. – Elsevier, 2020. – P. 243-282.
140. Tleuova, A.B. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture / A.B. Tleuova, E. Wielogorska, P. Talluria, F. Štěpánek, C.T. Elliott, D.O. Grigoriev // *Journal of Controlled Release*. – 2020. – V. 326. – P. 468-481.
141. Turco, R. In vivo and post-synthesis strategies to enhance the properties of PHB-based materials: A review/ R. Turco, G. Santagata, I. Corrado, C. Pezzella, M. Di Serio // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 8. – P. 619266.
142. Varghese, S. A. Novel biodegradable polymer films based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and *Ceiba pentandra* natural fibers for packaging applications/ S. A. Varghese, H. Pulikkalparambil, S. M. Rangappa, S. Siengchin, J. Parameswaranpillai // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2020. – Vol. 25. – P. 100538.
143. Volova T. Efficacy of embedded metribuzin and tribenuron-methyl herbicides in field-grown vegetable crops infested by weeds/ T. Volova, A. Demidenko, N. Kurachenko, S. Baranovsky, O. Petrovskaya, A. Shumilova, A. // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – T. 28. – №. 1. – C. 982-994.
144. Volova T.G. Efficacy of tebuconazole embedded in biodegradable poly-3-hydroxybutyrate to inhibit the development of *Fusarium moniliforme* in soil microecosystems Release kinetics and fungicidal activity of tebuconazole embedded in P3HB / T.G. Volova, S.V. Prudnikova, N.O. Zhila, O.N. Vinogradova, A.A. Shumilova, E.D. Nikolaeva, E.G. Kiseleva, E.I. Shishatskaya // *Pest Management Science* – 2017 – Vol.. 73 Is. 5 – P. 925-935.

145. Volova, T. Biological effects of the free and embedded metribuzin and tribenuron-methyl herbicides on various cultivated weed species/ T. Volova, S. Baranovsky, O. Petrovskaya, A. Shumilova, A. Sukovatyi //Journal of Environmental Science and Health, Part B. – 2020a. – Vol. 55. – №. 11. – P. 1009-1019.
146. Volova, T. G. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646/ T. G. Volova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, N. O. Zhila, A. N. Boyandin, D. A. Syrvacheva, I. V. Peterson //Bioresource technology. – 2013. – Vol. 146. – P. 215-222.
147. Volova, T. G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates/ T. G. Volova, E. I. Shishatskaya, N. O. Zhila, E. G. Kiselev, P. V. Mironov, A. D. Vasiliev, I. V. Peterson, A. J. Sinskey // Journal of Siberian Federal University. Biology – 2012. – Vol. 5. – №. 3. – P. 280-299.
148. Volova, T. G. Hydrogen-Oxidizing Producers of Polyhydroxyalkanoates: Synthesis, Properties, and Applications/ T. G. Volova, E. I. Shishatskaya, N. O. Zhila, E. G. Kiselev //The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. – CRC Press, 2020b. – P. 221-254.
149. Volova, T. G. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications. – Nova publishers, 2004.
150. Volova, T. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production / Volova, T., Demidenko, A., Kiselev, E., Baranovskiy, S., Shishatskaya, E., & Zhila, N. //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – №. 1. – P. 225-237.
151. Wang, J. H. Degradation and Stabilization of Poly (Butylene Adipate-co-Terephthalate)/Polyhydroxyalkanoate Biodegradable Mulch Films Under Different Aging Tests/ J. H. Wang, Y. Tian, B. Zhou //Journal of Polymers and the Environment. – 2022. – Vol. 30. – №. 4. – P. 1366-1379.
152. Wang, K. Techno-economic analysis on an industrial-scale production system of polyhydroxyalkanoates (PHA) from cheese by-products by halophiles / K. Wang, A. M. Hobby, Y. Chen, A. Chio, B. M. Jenkins, R. Zhang //Processes. – 2021. – Vol. 10. – №. 1. – P. 17.
153. Wilpiszewska, K. Carboxymethyl starch/montmorillonite composite microparticles: properties and controlled release of isoproturon/ K. Wilpiszewska, T. Spychaj, W. Paździoch //Carbohydrate polymers. – 2016. – Vol. 136. – P. 101-106.
154. Xu, S. Amphoteric superabsorbent polymer based on waste collagen as loading media and safer release systems for herbicide 2, 4 - D/ S. Xu, Y. Yin, Y. Wang, X. Li, Z. Hu, R. Wang //Journal of Applied Polymer Science. – 2020. – Vol. 137. – №. 12. – P. 48480.

155. Yadav, I. C. Pesticides classification and its impact on human and environment / I. C. Yadav, N. L. Devi // *Environmental science and engineering*. – 2017. – Vol. 6. – P. 140-158.
156. Yasim, A. T. A. T. Polyhydroxyalkanoates for Packaging Application/ A. T. A. T. Yasim, M. N. F. Norrrahim, S. M. Sapuan, R. A. Ilyas, M. A. Jenol, N. A. M. Razali, S. U. F. S. Najmuddin // *Bio - based Packaging: Material, Environmental and Economic Aspects*. – 2021. – P. 279-293.
157. Zandona, E. Whey utilization: Sustainable uses and environmental Approach/ E. Zandona, M. Blažić, A. Režek Jambrak // *Food Technology and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 59. – №. 2. – P. 147-161.
158. Zhao, X. H. Electrospinning nanofibers of microbial polyhydroxyalkanoates for applications in medical tissue engineering/ X. H. Zhao, Y. N. Niu, C. H. Mi, H. L. Gong, X. Y. Yang, J. S. Y. Cheng, D. X. Wei // *Journal of Polymer Science*. – 2021. – Vol. 59. – №. 18. – P. 1994-2013.
159. Zheng, Y. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction/ Y. Zheng, J. C. Chen, Y. M. Ma, G. Q. Chen // *Metabolic engineering*. – 2020. – Vol. 58. – P. 82-93.
160. Zhila, N. Herbicidal activity of slow-release herbicide formulations in wheat stands infested by weeds / N. Zhila, A. Murueva, A. Shershneva, E. Shishatskaya, T. Volova // *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. – 2017. – Vol. 52. – №. 10. – P. 729-735.
161. Zhu, F. Prep.offenoxanil micro-capsule/ F. Zhu, T.T. Duan, G.H. Liao, L.D. Cao, C. Cao, F.M. Li, C. Chen, Q.L. Huang // *Preparation of fenoxanil micro-capsule*. – 2018. – P. 213-219.
162. Zoteeva N.M., Kosareva O.S. Evaluation of resistance of potato varieties from the VIR collection to *Phytophthora infestans* in laboratory studies/ N.M. Zoteeva, O.S. Kosareva // *Bulletin of plant protection*– 2021. – Vol. 104. – №2. – P.113-119.(by Russian)
163. Агроэкология: Учеб. для студентов вузов по агроном. специальностям / В.А. Черников, Р.М. Алексахин, А.В. Голубев - Москва : Колос, 2000. – 534.
164. Анализ рынка пестицидов в РФ с 2016–2020 (Электронный ресурс) / Режим доступа: <https://businessstat.ru>
165. Дмитриев, Е.А. Математическая статистика в почвоведении // М.: Изд-во МГУ. 1995. – С. 319.
166. Иванцова, Е. А. Влияние пестицидов на микрофлору почвы и полезную биоту / Е. А. Иванцова // *Природные системы и ресурсы*. – 2013. – №. 1 (5). – С. 35-40.
167. Каплин В.Г. Основы экотоксикологии: Учебное пособие для вузов. – М.: КолосС, 2007. – С.232.
168. Киселев Е. Г. Масштабирование технологии синтеза биodeградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е. Г. Киселев, А. В. Демиденко, С.

В. Барановский, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - № 7 — С. 134-147.

169. Колесникова О.Д. Конструирование и исследование долговременных гербицидных препаратов на основе поли-3-гидроксibuтирата / природные материалы / О. Д. Петровская // "Перспектив Свободный – 2022": Материалы XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, электронное издание, Красноярск, 25–30 апреля 2022 года. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2022. – 3002 с.

170. Куликова Н. А., Лебедева Г. Ф Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. — 152 с.

171. Накаева, А. А. О вреде, причиняемом сорными растениями / А. А. Накаева, М. Сулиева, М. И. Лечиева // Рациональное природопользование - основа устойчивого развития : Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Грозный, 22–23 сентября 2020 года. – Грозный: Чеченский государственный педагогический университет, ИП Овчинников Михаил Артурович (Типография Алеф), 2020. – С. 42-47.

172. Нетрусов А., Котова И. Микробиология: теория и практика в 2 ч. Часть 2. Учебник для бакалавриата и магистратуры. – Litres, 2022.

173. Патент Encapsulation by interfacial polycondensation №4417916 МПК А01N43/48, опубли. 29.11.1983г.

174. Патент Encapsulation process and capsules produced thereby патент США №4285720, МПК А01N25/28, опубли. 25.08.1981г.

175. Патент Microencapsulated herbicidal composition adapted to controlled release of active principle RU №2108036, МПК А01N25/28, опубли. 10.04.1998г.

176. Патент Postemergence herbicide-containing herbicidal agent for ground application RU № 2261596, МПК А01N25/08, опубли. 10.10.2005г.

177. Патент RU №2407288, МПК А01N47/34, опубли. 10.12.2009г Водная дисперсия для защиты растений, наночастичная композиция для защиты растений, агрохимическая композиция и способ ее получения, способ борьбы с нежелательным ростом растений, и/или борьбы с нежелательным поражением насекомыми или клещами растений, и/или борьбы с фитопатогенными грибами (варианты)

178. Патент US4280833A Encapsulation by interfacial polycondensation, and aqueous herbicidal composition containing microcapsules produced thereby МПК А01N37/18, опубли. 28.07.1981г.

179. Перт, С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток/ С.Дж. Перт. - Москва: Мир, 1978. – 259 с

180. Петровская, О. Д. Исследование эффективности долговременных форм гербицидных препаратов в лабораторных посевах зерновых культур, зараженных сорняками / О. Д.

- Петровская // Биотехнология новых материалов - окружающая среда - качество жизни : Материалы IV Международной научной конференции, электронное издание, Красноярск, 10–13 октября 2021 года. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2021б. – С. 187-189.
181. Петровская, О. Д. Петровская, О. Д. Конструирование и исследование гербицидных препаратов пролонгированного действия на основе поли-3-гидроксибутирата / О. Д. Петровская // Новые полимерные композиционные материалы : Материалы XVI Международной научно-практической конференции, Нальчик, 07–11 октября 2020 года. – Нальчик: Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, 2020. – С. 372-375.
182. Петровская, О. Д. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве основы для конструирования гербицидных препаратов для защиты культивируемых растений/ О. Д. Петровская // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021», 20 апреля 2021а
183. Петровская, О.Д. Действие депонированных гербицидных препаратов на зерновые культуры / О. Д. Петровская, С. В. Барановский, А. В. Демиденко, Т. Г. Волова // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2022. – № 1. – С. 47-51.
184. Самсонова В. П., Благовещенский Ю. Н., Кондрашкина М. И. Учет и картографирование сорной растительности //М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и Ко» – 2006.
185. Серёгин, М.В., Скрябин, А.А. Учебная практика по растениеводству и кормопроизводству: учебное пособие – Пермь: ПГСХА. – 2009. – С. 113.
186. Справочник по пестицидам (токсиколого-гигиеническая характеристика). Выпуск 1. под редакцией академика РАМН В.Н. Ракитского. М.: Изд-во Агрорус, 2011.
187. Сухорученко, Г. И. Формирование ассортимента химических средств защиты растений от вредителей в XX веке/ Г. И. Сухорученко, Л. А. Буркова, Г. П. Иванова, Т. И. Васильева, О. В. Долженко, С. Г. Иванов //Вестник защиты растений. – 2020. – Т. 103. – №. 1. – С. 5-24.
188. Филиппов А. С., Немченко В. В. Технологии применения гербицидов на зерновых культурах в условиях минимализации обработки почвы. Куртамыш: ООО «Куртамышская типография», 2016.– С.100.