

На правах рукописи



МОРОЗОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
ДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ КУЛЬТУРЫ**

специальность 03.02.08 – экология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Барнаул 2011

Работа выполнена на кафедре общей химии и экспертизы товаров Бийского технологического института (филиал) ГОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»

Научный руководитель – доктор химических наук, профессор
Верещагин Александр Леонидович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Терехина Татьяна Александровна

кандидат биологических наук, с.н.с.
Егоркина Галина Ивановна

Ведущая организация – ГНУ НИИ садоводства Сибири
имени М.А. Лисавенко
СО Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится «26» мая 2011 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.005.10 при ГОУ ВПО «Алтайский государственный университет» по адресу: 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61; тел. (3852) 66-75-84; факс (3852) 36-30-77

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Алтайский государственный университет», автореферат выставлен на сайте www.asu.ru

Автореферат диссертации разослан « 21 » апреля 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических
наук,
доцент



Н.В. Елсова

Актуальность темы. В условиях научно-технического прогресса деятельность человека преобразует природные биогеоценозы. На смену им приходят посевы и посадки культурных растений. Так формируются агроценозы, количество которых на Земле постоянно увеличивается. На устойчивость и продуктивность агроценоза оказывают влияние различные абиотические и биотические факторы. Человек с помощью сельскохозяйственных технологий и препаратов стремится таким образом регулировать воздействие этих факторов, чтобы добиться максимального выхода конечной продукции. В связи с этим возрастает интерес к природным веществам, способным поддерживать стабильность агроценозов и повышать урожайность сельскохозяйственных растений.

Одним из таких веществ является хитозан – не токсичный для животных и человека биополимер, оказывающий положительное влияние на растения за счет ростостимулирующих, иммуномодулирующих, бактерицидных и фунгицидных свойств (Гамзазаде и др., 1999). Обладая флокулирующими свойствами, хитозан улучшает структурные характеристики почвы, препятствует вымыванию ценных компонентов и вносимых в почву удобрений (Sojka et al., 2003), снижая негативное воздействие сельскохозяйственных химикатов на окружающую среду.

Для производства хитозана можно использовать различное хитинсодержащее сырье. Аквациоресурсы Алтайского края богаты рачком *Artemia species*, цисты которого широко используются в рыбном хозяйстве. При этом пустые оболочки цист – хорионы – до настоящего времени не нашли практического применения. Содержание хитина в них достигает 34,5 % от сухого веса оболочки (Tajik et al., 2008).

Таким образом, эколого-биологическая оценка действия хитозановых препаратов на сельскохозяйственные культуры позволит определить возможность их практического применения в растениеводстве и предложить схему рационального использования отходов вылова цист *Artemia species*, снизить химическую нагрузку на окружающую среду, уменьшить стоимость производства сельскохозяйственной продукции.

Цели и задачи исследования. Цель исследования – провести эколого-биологическую оценку действия хитозановых препаратов на сельскохозяйственные культуры.

В задачи исследования входило:

- 1) Разработка схемы получения хитозанового препарата для растениеводства на основе отходов вылова цист *Artemia species*.
- 2) Определение факторов, влияющих на биологическую активность хитозановых препаратов.

3) Изучение влияния хитозановых препаратов на прорастание семян льна-долгунца и гороха в лабораторных условиях.

4) Оценка влияния хитозановых препаратов на урожайность картофеля в полевых условиях.

5) Исследование влияния хитозановых препаратов на укоренение черенков винограда и облепихи.

Научная новизна. Впервые предложено использовать пустые оболочки цист *Artemia species* для получения хитозановых препаратов. Подобраны режимы очистки исходного сырья. На стадии дезацетилирования хитина было применено ультразвуковое облучение.

Установлена ростостимулирующая и ризогенная активность разработанного хитозанового препарата в отношении семян льна-долгунца, гороха, картофеля, черенков облепихи и винограда. Подобраны оптимальные значения показателя рН раствора хитозанового препарата.

Практическая значимость. Разработанный метод может быть положен в основу промышленного производства хитозанового препарата для растениеводства. Способ не требует значительных производственных затрат. При полной или частичной замене пестицидов и химических протравителей данным препаратом снижается химическая нагрузка на окружающую среду.

Положения, выносимые на защиту.

1. Биологическая активность хитозановых препаратов обусловлена молекулярной массой входящего в их состав хитозана и рН раствора.

2. Хитозановые препараты повышают ризогенную активность при прорастании семян льна-долгунца и гороха, при укоренении черенков винограда и облепихи, а также урожайность картофеля.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на межрегиональных, всероссийских и международных конференциях: «Технологии и оборудование химической, биологической и пищевой промышленности» (Бийск, май 2008); «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (Барнаул, 2008); «Производные хитозана и стимуляторы роста в сельском хозяйстве» (Бийск, 2008); «Полимеры, композиционные материалы и наполнители для них («Полимер 2008»)» (Бийск, май 2008); «Биология – от молекулы до биосферы» (Харьков, 18-21 ноября 2008); «Природные и интеллектуальные ресурсы Сибири (СИБРЕСУРС-14-2008)» (Омск, 6-8 октября 2008 г); «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Ставрополь, 13-17 октября 2008); «Аграрная наука - сельскому хозяйству» (Барнаул, 5-6 февраля 2009); «Инновационные технологии: производство, экономика, образование» (Бийск, 24 сентября 2009); «Виноградарство в Западной Сибири» (Бийск, 12 сентя-

бря 2009); «Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениеводстве и экономике» (Томск, 2010); «Производные хитозана и стимуляторы роста в сельском хозяйстве» (Бийск, 23 марта 2010); «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» РосХит–2010 (Нижний Новгород, 29 июня – 2 июля 2010); «Аграрная наука сельскохозяйственному производству Монголии, Сибири и Казахстана» (Улаанбаатор, 6-7 июля 2010); «Современное состояние почвенного покрова, сохранение и воспроизводство плодородия почв» (Алматы, 15-16 сентября 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них три в журналах, включенных в список ВАК, получен патент 2406715 Российской Федерации МПК⁶ C05F7/00 «Способ получения средства для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур и средство».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, выводов, библиографического списка литературы (189 ссылок, в том числе 88 иностранных), содержит 37 таблиц, 18 рисунков.

ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

В главе 1 описываются негативные последствия применения минеральных удобрений и пестицидов. Дается представление о хитозане как о безопасной альтернативе химических средств защиты растений. Рассмотрены механизмы защитного и ростостимулирующего действия хитозана, его способности повышать устойчивость растений к стрессам и улучшать качество почвы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения хитозановых препаратов использовали цисты и хорионы (пустые оболочки) цист рачка *Artemia species*, собранные в озерах Алтайского края в 2007 году. Хорионы цист *Artemia species* могут содержать до 16,4 % водорастворимых солей, среди которых преобладают хлориды и сульфаты. В данной работе рассматривается два метода

обессоливания исходного сырья. В первом случае обессоливание проводили трехкратной декантацией водной суспензии. Во втором случае на стадии обессоливания было изучено 17 режимов ультразвукового облучения, отличающихся акустической мощностью и временем воздействия. Наиболее эффективным (глубина обессоливания 94 %) является обессоливание с ультразвуковым облучением при акустической мощности 150 Вт в течение пяти минут. Цисты и хорионы заливали 40 %-ным раствором КОН при модуле 1:10 и настаивали в течение 7 суток. Препарат на основе цист назван «Артемия», препарат на основе хорионов цист назван «Хорион». В базовые хитозановые препараты вводили хелаты цинка («Хорион + Zn^{2+} ») и меди («Хорион + Zn^{2+} + Cu^{2+} »), часть препаратов на стадии дезацетилирования хитина облучали ультразвуком акустической мощностью 200 Вт при интенсивности колебаний 24,1 Вт/см² («Хорион 12» в течение 12 минут, «Хорион 21» в течение 21 минуты). При этом молекулярная масса входящего в состав препаратов хитозана снижалась с 2,45±0,15 кДа для необлученного препарата до 1,75±0,13 кДа и 1,38±0,15 кДа для облученных препаратов соответственно. Перед использованием все препараты разводили водой в соотношении 1:100, 1:1000 и 1:10000 и подкисляли до нужного значения pH ортофосфорной кислотой. В качестве фона использовали раствор ортофосфата калия, полученный разведением 40 %-ного КОН с последующим подкислением ортофосфорной кислотой.

Влияние полученных препаратов на сельскохозяйственные культуры оценивали в лабораторных и полевых условиях. В качестве объектов исследования были взяты:

1. Лен-долгунец (*Linum usitatissimum L.*) сорт Томский 16.
2. Горох (*Pisum sativum L.*) сорт Новосибирец.
3. Картофель (*Solanum tuberosum L.*) сорт Орхидея.
4. Виноград (*Vitis vinifera L.*) сорта Любава, Катыр, Память Домбковской, Мускат Самарский, Мускат Катунский, Мускат Коричневый, Киргизский Ранний, Московский Белый, Краса Никополья и сортообразец Бийская Роза.
5. Облепиха (*Hippophaë rhamnoides L.*) сорт Чуйская.

По данным таблицы 1, видно, что на различных культурах опробовано 84 варианта хитозановых препаратов, в качестве фона использовался 21 вариант раствора ортофосфата калия, в качестве контроля во всех опытах выступала вода.

Таблица 1

Схема эксперимента по определению биологической активности хитозановых препаратов

Препарат	Разведение	Объекты исследования						
		pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
Фон K ₃ PO ₄	1:100	л	л	л	л	л	л	л
	1:1000	л	л	л, в	л, в	л, в	л, в	л
	1:10000	л	л	л	л	л	л	л
Артемия	1:100	л, г	л, г	л, г	л, г	л, г	л, г	—
	1:1000	л, г	л, г	л, г, в	л, г, в	в, к	в	—
	1:10000	л	л	л	—	—	—	—
Хорион	1:100	л, г	л, г	л, г	л, г	л, г	л, г	л, г
	1:1000	л, г	л, г	л, г, в	л, г, в, о	л, г, в, к	л, г, в	л, г
	1:10000	л, г	л, г	л, г	л, г	л	—	—
Хорион + Zn ²⁺	1:100	л	л	л	л	л	л	л
	1:1000	л	л	л	л	л	л	л
	1:10000	л	л	л	л	л	л	л
Хорион + Zn ²⁺ + Cu ²⁺	1:100	л	л	л	л	л	л	л
	1:1000	л	л	л	л	л	л	л
	1:10000	л	л	л	л	л	л	л
Хорион 12	1:1000	—	—	в	в	в	в	—
Хорион 21	1:1000	—	—	в	в	в	в	—
Контроль, вода		л, г, в, к, о						

Определение энергии прорастания семян проводили согласно ГОСТ12038-84. Семена льна-долгунца проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной растворами хитозановых препаратов. Семена гороха проращивали, завернув в рулоны фильтровальной бумаги, концы рулонов помещались в стаканы с растворами хитозановых препаратов. Во второй серии опытов семена льна-долгунца сначала проращивали в растворах ортофосфата калия, затем раствор заменяли соответствующим раствором хитозанового препарата. Повторность опыта пятикратная. В каждом варианте опыта было по 100 семян льна-долгунца или по 50 семян гороха.

Влияние хитозановых препаратов на ризогенез черенков винограда различных сортов оценивалось в лабораторных условиях. Черенки поме-

щали в растворы хитозановых препаратов, ортофосфата калия и воду длительность экспериментов составляла 40–55 суток, в ходе опыта определяли выход саженцев и их биометрические показатели. Часть черенков на начальном этапе укоренения подвергали ультразвуковому облучению акустической мощностью 50 Вт, при интенсивности 6,7 Вт/см² в течение трех и шести минут. В каждом варианте опыта было пять черенков, повторность опыта трехкратная.

Полевые испытания на культуре картофеля проводили в черте города Бийска в 2008 году. Площадь опытной делянки 25 м². Почва – лугово-чернозёмная среднемошная среднегумусная супесчаная. Опыт проводили в трехкратной повторности с рендомизированным размещением делянок, в каждом варианте опыта было 10 растений. Перед посадкой клубни картофеля замачивали в течение 2 часов в растворах препаратов «Артемия» и «Хорион». В фазу появления первых всходов и в фазу бутонизации проводили опрыскивание листовой поверхности растений соответствующими препаратами. Уборку урожая проводили сплошным методом со всей делянки. С вариантов опыта отбирали образцы растений, в которых определяли содержание сухих веществ, крахмала, аскорбиновой кислоты и нитратного азота по общепринятым стандартным методикам.

Влияние хитозановых препаратов на ризогенез черенков облепихи изучали на базе ЗАО крестьянское хозяйство «Флора». Опыт проводили в трехкратной повторности, количество черенков в каждом варианте – 1000. Срезанные в июле 2008 года черенки на одну треть длины помещали в раствор хитозанового препарата «Хорион» на 5 часов, контрольные черенки выдерживали в воде. Укоренение проводили в песчаной почве в пленочной теплице с туманообразующей установкой по общепринятой методике (Стрельцов, Тучина, 2008). В апреле 2009 года саженцы пересаживали, подсчитывали количество укоренившихся растений и измеряли их биометрические показатели. Объем выборки в каждом варианте – 10 саженцев.

Статистическая обработка данных. Расчет относительной ошибки средней S_x , % и наименьшей существенной разности для 5 %-ного уровня значимости $НСР_{05}$ осуществляли по формулам, рекомендуемым Б.А. Доспеховым (1968).

Расчет доверительного интервала проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Профессиональный 2007, версия 12.0.4518.1014 (Microsoft Corporation, 2007).

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И УРОЖАЙНОСТЬ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Лен-долгунец. В данном исследовании использовали семена льна-долгунца, хранившиеся в течение пяти лет и изначально имеющие низкие посевные качества. Зависимость энергии прорастания семян льна-долгунца от pH и степени разведения хитозановых препаратов представлена в таблице 2. Жирным шрифтом выделены результаты, достоверно превышающие контрольное значение. Положительное влияние препарата «Артемия» и раствора ортофосфата калия наблюдается только при степени разведения 1:100, при дальнейшем разведении не зависимо от pH раствора энергия прорастания остается на уровне контроля или ниже.

Таблица 2

Зависимость энергии прорастания (определяемой через 72 часа) семян льна-долгунца от pH и степени разведения хитозановых препаратов

Препарат	Разведение	Энергия прорастания, %						
		pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
Хорион	1:100	9	52	66	63	54	58	69
	1:1000	68	52	54	54	58	53	62
	1:10000	62	44	40	52	44	-	-
Эталон, Артемия	1:100	45	57	69	62	61	65	-
	1:1000	50	50	58	51	-	-	-
	1:10000	49	45	48	-	-	-	-
Фон, K ₃ PO ₄	1:100	53	61	72	66	65	53	61
	1:1000	58	44	50	53	57	55	42
	1:10000	44	44	51	51	45	54	53
Контроль		54						
Относительная ошибка средней $S_x = 3,4\%$; $НСР_{0,5} = 5$								

Максимальная энергия прорастания для хитозановых препаратов на 28 % выше контрольное значение и достигается для препарата «Артемия» при разведении 1:100 и pH=5, а для препарата «Хорион» при разведении 1:100 и pH=9. Для оценки степени влияния каждого фактора (вида препарата, степени разведения и pH раствора) проводили анализ с использованием пакета программ SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc., 2003). Максимальный разброс значений наблюдается при применении препарата «Хорион», наибольшее влияние на энергию прорастания семян оказывает степень разведения.

Наиболее развитыми оказались проростки, обработанные растворами препаратов «Артемия» и «Хорион» с рН=6, 8 и 9, максимальная длина корней достигала 55 мм (27 мм в контроле). Длина корней у проростков семян, обработанных растворами ортофосфата калия, ниже контрольного значения.

Таким образом, применение ортофосфата калия позволяет добиться высокой энергии прорастания семян, а хитозановые препараты способствуют развитию проростков. Как видно по данным таблицы 3, последовательная обработка ортофосфатом калия и хитозановым препаратом дает наилучший результат при рН=5 и рН=6. Если обрабатывать семена первые сутки ортофосфатом калия и последующие сутки препаратом «Хорион», удастся добиться и высокой энергии прорастания (на 35 % выше, чем у контроля) и высокой степени развития растений.

Таблица 3

Влияние K_3PO_4 и хитозановых препаратов при последовательной обработке на энергию прорастания (определяемую через 72 часа) семян льна-долгунца

рН	Энергия прорастания, %		
	1,2 сутки K_3PO_4 , 3 сутки Хорион	1 сутки K_3PO_4 , 2,3 сутки Хорион	1 сутки K_3PO_4 , 2,3 сутки Артемия
9	57	58	55
8	61	57	56
7	59	61	53
6	66	62	64
5	63	73	69
4	44	51	45
3	57	40	27
Максимальная длина корней, мм	При рН=5 корни до 20 мм	При рН=5 корни до 50 мм	При рН=5 корни до 40 мм
Контроль	54		
Относительная ошибка средней $S_x = 3,4\%$; $HCP_{0,5} = 5$			

Низкая всхожесть, задержка роста и низкие урожаи многих растений часто объясняется дефицитом микроэлементов. В связи с этим была проведена оценка влияния введения хелатов цинка и меди в препарат «Хорион» на прорастание семян льна-долгунца. Лен является культурой, предрасположенной к дефициту цинка. Симптомы дефицита меди часто проявляются в известковых и выщелоченных песчаных почвах, на почвах с высоким содержанием органических веществ или глины (Булыгин и др., 2007).

Как видно по данным таблицы 4 применение препарат «Хорион + Zn²⁺», позволяет добиться существенного повышения энергии прорастания семян при степени разведения 1:100 в широком диапазоне рН рабочего раствора. Наибольшей биологической активностью обладают нейтральный и кислый растворы. В данной работе в качестве хелатирующего реагента использовали динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Комплексоны ЭДТА с металлами наиболее устойчивы в слабокислой и кислой среде. Внесение хелата цинка, оказывает ингибирующее действие на рост корней. Длина корней проросших семян увеличивается по мере разбавления препарата и увеличения рН раствора.

Таблица 4

Влияние препарата «Хорион + Zn²⁺», обогащенного хелатом цинка, на прорастание семян льна-долгунца

Разведение	Энергия прорастания (через 72 часа), %						
	рН=3	рН=4	рН=5	рН=6	рН=7	рН=8	рН=9
1:100	72	65	75	69	76	67	65
1:1000	43	42	54	51	51	54	55
1:10000	34	39	52	48	42	43	47
Контроль	54						
Относительная ошибка средней $S_x = 2,7\%$ НСР _{0,5} = 4							
Разведение	Длина корней, мм						
	рН=3	рН=4	рН=5	рН=6	рН=7	рН=8	рН=9
1:100	4	3	8	3	7	15	5
1:1000	3	5	18	22	12	14	18
1:10000	5	10	17	30	37	50	53
Контроль	27						
Относительная ошибка средней $S_x = 4,3\%$; НСР _{0,5} = 2,8							

Обработка семян льна-долгунца препаратом «Хорион + Zn²⁺ + Cu²⁺» с добавлением хелатов цинка и меди (данные в автореферате не представлены) приводит к снижению энергии прорастания ниже контрольного значения в среднем на 20 % при степенях разведения 1:100 и 1:10000. При степени разведения 1:1000 и рН = 5, 7 и 9 энергия прорастания выше контрольного значения, однако ниже значения полученного без добавления комплексонов меди.

Таким образом, установлено, что при проращивании семян льна-долгунца наибольшей ростостимулирующей активностью обладает препарат «Хорион» при степени разведения 1:100 и рН=6: энергия прорастания повышается на 17 %, а длина корней в два раза. Внесение в препарат

«Хорион» хелата цинка при степени разведения 1:100 позволяет повысить энергию прорастания семян льна-долгунца на 20–39 % в широком диапазоне рН, однако приводит к уменьшению длины корней. Внесение хелата меди приводит к снижению энергии прорастания в среднем на 20 %, при этом длина корней проросших семян увеличивается.

Горох. При обработке препаратом «Хорион» максимальная энергия прорастания достигается при разведении 1:1000 и рН=4 и рН=8 и составляет 94,0 % при 87,4 % у контрольных семян. При этом, как видно по данным таблицы 5, при рН=8 корни первого порядка имеют максимальную длину – 95 мм, что на 28 % выше контрольного значения. Было замечено, что при обработке семян растворами с рН=5 и рН=6 наблюдается развитие корней второго порядка длиной до 4 мм. При этом при степени разведения 1:100 энергия прорастания сохраняется на уровне контрольного значения.

Таблица 5

Влияние хитозановых препаратов на прорастание семян гороха

Препарат	Разведение	Длина корней первого порядка (мм) / Длина корней второго порядка (мм)						
		рН=3	рН=4	рН=5	рН=6	рН=7	рН=8	рН=9
Хорион	1:100	35/-	37/-	37/-	62/4	55/3	47/-	55/-
	1:1000	гниль	50/-	60/3	60/3	60/-	95/-	62/-
	1:1000	55/-	50/-	55/3	70/4	-	-	-
Эталон	1:100	35/-	33/-	20/-	30/-	50/-	40/-	-
Артемия	1:1000	20/-	20/-	45/-	30/-	-	-	-
Контроль		70/-						
Относительная ошибка средней $S_x = 4,7 \%$; $НСР_{0,5} = 6$								

Таким образом, при проращивании семян наибольшего эффекта удастся достичь при применении хитозановых препаратов в слабокислой среде, это объясняется химической природой хитозана. Так как хитозан относится к классу аминов, он легко образует соли с анионами. Многие из таких солей являются водорастворимыми, а значит доступными для растений. В кислой среде хитозан состоит из электронейтральных глюкозаминных звеньев и звеньев, в которых глюкозамин протонирован и ассоциирован с анионами соответствующей кислоты (Тютюрев, 2002).

Хитозан является осмотически активным веществом (Burgows et al., 2007), под влиянием хитозана проникновение воды через оболочку семян значительно повышается. Кроме того хитозан повышает активность многих ферментных систем растения (Зиновьева и др., 1999). В целом, обработка хитозановыми препаратами, в результате комплексного воз-

действия на отдельные процессы в семени повышают и их жизнеспособность, всхожесть и способствует развитию корневой системы.

Картофель. Из данных таблицы 6 следует, что применение препарата «Хорион» способствует существенному повышению урожайности по сравнению с контрольным значением, увеличению числа и массы клубней.

Таблица 6

Влияние хитозановых препаратов на урожайность картофеля сорта Орхидея

Показатели	Контроль	Артемия	Хорион	$S_x, \%$	$НСР_{0,5}$
Урожайность клубней, г/гнездо	755	600	2215	6,4	215
В процентах от контроля	-	79	293	-	-
Количество клубней в гнезде, шт.	12	8	21	5,5	3
Средняя масса клубня, г	125	200	222	5,1	37

Вегетационный период 2008 года был недостаточно увлажненным (количество осадков в июле составило 68 % от средней многолетней нормы). В данных обстоятельствах повышение урожайности картофеля при использовании препарата «Хорион» достигается за счет способности хитозана регулировать расходование растением влаги. Обработка хитозаном может способствовать накоплению абсцизовой кислоты в тканях листьев (Iriti, Faoro, 2008). Высокий уровень этой кислоты приводит к блокированию устьиц в эпидермисе растения, таким образом, сокращается испарение (Bittelli et al., 2001). Благодаря способности сохранять воду, растения имеют больше листьев, что также способствует большому накоплению питательных веществ. Максимальное начальное содержание сухих веществ составляет 29,7 % (20,6 % в контроле) наблюдается в картофеле, обработанном препаратом «Хорион».

Начальное содержание витамина С в картофеле, обработанном препаратом «Хорион», ниже контроля на 14 %. Однако при хранении в течение трех месяцев содержание витамина С для контрольного картофеля и картофеля, выращенного с применением препарата «Артемия» снижается на 20–30 %, а для картофеля, выращенного с применением препарата «Хорион», меняется незначительно.

При применении хитозановых препаратов спустя месяц после уборки урожая содержание нитратов в клубнях картофеля для препарата «Артемия» в 3 раза превышает ПДК, а для препарата «Хорион» – в 1,8 раз. Во время хранения количество нитратов снижается, и спустя три месяца во

всех образцах содержание нитратов не превышает 10 мг/кг. Хитозан повышает ассимиляцию растениями неорганического азота из почвы (Burgows et al., 2007). С одной стороны, это способствует росту и развитию растений. С другой стороны, как показывают полученные нами данные, сельскохозяйственная продукция, выращенная таким образом, может содержать большое количество опасных для здоровья соединений.

Таким образом, установлено, что повышенное содержание хитозана в препарате «Хорион» приводит к увеличению урожайности картофеля на фоне недостаточной увлажненности в течение вегетационного периода благодаря оптимальному расходованию растением влаги. Применение препарата «Хорион» при выращивании картофеля снижает скорость расходования витамина С в картофеле во время хранения.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА УКОРЕНЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Виноград. Влияние хитозановых препаратов на укоренение черенков винограда определяется сортовыми особенностями. Ниже приведены данные по некоторым сортам винограда, показавшим при укоренении наиболее примечательные результаты. У саженцев винограда сорта Катыр (таблица 7) в кислой и слабокислой области значений рН наблюдается увеличение длины побегов. Примечательно, что при применении препарата «Хорион» при рН=6 и 7 на фоне сохранения на уровне контроля или даже уменьшения длины побегов масса побегов увеличивается на 30–40 %. Это связано с увеличением количества и размера листьев, что впоследствии благоприятно скажется на развитии саженцев за счет большей фотосинтетической активности растения. В наибольшей степени способствовал ризогенной активности саженцев препарат «Хорион» при рН=6: суммарная длина и количество корней первого порядка более чем в 2 раза превышают контрольное значение. При этом же значении рН наблюдали увеличение массы побегов. Высокая ризогенная активность была выявлена у саженцев, укореняемых в растворе ортофосфата калия, при этом рН раствора не оказывал существенного влияния на длину корней первого порядка. При укоренении в растворе при рН=6 все черенки не зависимо от вида препарата имели высокие качественные показатели.

Условные обозначения таблиц 7–9: * - цветы; # - корни второго порядка; ## - корни третьего порядка; + - каллус; **жирным шрифтом** выде-

лены результаты более чем на 30 % превышающие контрольное значение.

Таблица 7

Влияние обработки хитозановыми препаратами на укоренение черенков винограда сорта Катыр, 2009 год

Раствор	Средний выход саженцев, %	Длина побегов, мм	Масса побегов, г	Суммарная длина корней первого порядка, мм	Количество корней, шт.	Масса корней, г	
Вода	71	111±15	1,92±0,18	1345±200	21,0±1,8	0,41±0,05	
Хорион	pH=8	86	72±10	1,45±0,13	1495±180	17,0 [#] ±1,9	0,48±0,05
	pH=7	86	84±10	2,48±0,30	2565±340	28,2 [#] ±3,2	0,71±0,08
	pH=6	71	108±12	2,69±0,31	3905±450	43,4[#]±5,1	0,86±0,10
	pH=5	86	137±25	3,32±0,34	2145±220	31,1±3,6	0,61±0,07
Артемия	pH=8	71	94±9	1,54±0,16	1305±175	21,4 [#] ±2,9	0,50±0,05
	pH=7	86	76±10	1,31±0,15	785±95	11,5±1,8	0,20±0,02
	pH=6	86	135±27	2,79±0,34	2785±355	35,7±4,5	0,84±0,08
	pH=5	71	99±11	2,19±0,24	1645±280	19,8 [#] ±2,9	0,82±0,07
К.Р.О.	pH=7	86	113±13	2,30±0,29	3125±370	29,2 [#] ±4,1	1,48±0,11
	pH=6	100	151±28	2,98±0,35	3305±440	30,3[#]±4,6	1,34±0,10
	pH=5	83	91±10	1,96±0,21	3215±450	25,7 [#] ±3,2	1,18±0,09

В 2010 году на черенках винограда сорта Память Домбковской исследовали биологическую активность препаратов «Хорион», «Хорион 12» «Хорион 21», в качестве эталона выступал препарат «Артемия», в качестве контроля – вода. Данные приведены в таблице 8. Препараты «Хорион 12» и «Хорион 21» существенно повышали выход и качественные показатели (длину побегов, длину, количество и массу корней) саженцев, во всем применяемом диапазоне pH. Возможно, это объясняется снижением молекулярной массы хитозана, входящего в состав препарата после ультразвуковой обработки.

В литературе также приводятся данные, показывающие, что низкомолекулярный хитозан обладает большей элиситорной (Озерецковская и др., 2002) и антимикробной (Wiśniewska-Wrona et al., 2007) активностью. Это объясняется тем, что небольшим молекулам легче проникать сквозь клеточную стенку.

Влияние обработки хитозановыми препаратами на укоренение черенков винограда сорта Память Домбковской, 2010 год

Раствор	Выход саженцев, %	Длина побегов, мм	Масса побегов, г	Суммарная длина корней первого порядка, мм	Количество корней, шт.	Масса корней, г	
Вода	50	54±7	0,54±0,06	20±3	3,3 ⁺ ±0,3	0,02	
Артемия	pH=7,5	60	61±7	0,57±0,06	40±5	5,3 ⁺ ±0,6	0,09±0,01
	pH=7	20	71±10	0,80±0,09	40±5	6,0 ⁺ ±0,6	0,07±0,01
	pH=6	60	105±13	1,39±0,15	80±10	6,7 ⁺ ±0,6	0,15±0,02
	pH=5	20	160±18	3,11±0,32	1680±195	28,0±3,1	1,15±0,13
Хорион	pH=8	80	94±12	1,5±0,16	250±35	10,5±1,2	0,17±0,02
	pH=7	80	103±13	1,21±0,14	330±40	13,0[#]±1,5	0,30±0,03
	pH=6	40	133±15	1,49±0,16	145±20	10,0[#]±1,2	0,21±0,03
	pH=5	17	48±10	0,74±0,10	5	1,0 ⁺	-
Хорион-12	pH=8	100	206*±25	2,90±0,32	510±65	13,2[#]±1,5	0,29±0,04
	pH=7	71	142*±16	2,94±0,32	725±80	16,2[#]±1,9	0,61±0,07
	pH=6	100	209*±25	3,54±0,37	2295±260	34,3[#]±4,4	0,72±0,08
Ус	pH=8	83	131±15	2,26±0,28	505±65	13,0[#]±1,5	0,57±0,07
	pH=7	100	177*±19	3,32±0,36	1255±140	24,3[#]±3,2	1,12±0,13
	pH=6	100	249±29	2,32±0,28	1300±155	29,8[#]±3,1	1,07±0,10
	pH=5	100	170±18	2,57±0,30	1070±120	35,8[#]±4,4	1,20±0,14

Влияние хитозановых препаратов и ультразвукового облучения на ризогенез черенков винограда. Для повышения приживаемости черенков можно применять физическое воздействие, одним из видов которого являются ультразвуковые колебания. По данным таблицы 11 видно, что укоренение в растворах хитозановых препаратов стимулирует побегообразование, но угнетает ризогенез: для препарата «Хорион» при pH=6 количество корней более чем в три раза, а длина более чем в два раза ниже контрольного значения, сходные данные были получены для раствора препарата «Артемия» при pH=7,5.

Ультразвуковое облучение черенков винограда в течение 3 и 6 минут увеличивает эффективность действия хитозановых препаратов. При трехминутной обработке в растворе препарата «Хорион» при pH=7 и 6 увеличивается выход саженцев более чем на 50 % по сравнению с не об-

лученными черенками. При увеличении времени озвучивания до 6 минут в растворе препарата «Хорион» при pH=7 выход саженцев сохраняется, а при pH=6 снижается до контрольного значения.

Таблица 11

Влияние хитозановых препаратов и ультразвукового облучения на укоренение черенков винограда сорта Мускат Катунский, 2010 год

Раствор	Выход саженцев, %	Длина побегов, мм	Масса побегов, г	Суммарная длина корней первого порядка, мм	Количество корней, шт.	Масса корней, г	
Без ультразвукового облучения							
Вода	43	105±12	1,03±0,12	760±90	17,3 [#] ±2,0	0,57±0,07	
Хорион	pH=8	57	170±19	1,89±0,20	495±55	13,0 [#] ±1,5	0,20±0,02
	pH=7	43	98±12	0,87±0,09	535±65	8,7 [#] ±0,9	0,23±0,02
	pH=6	57	161±19	1,16±0,12	350±40	5,5±0,6	0,24±0,02
	pH=5	29	205±22	2,02±0,21	975±100	17,5 [#] ±2,0	0,32±0,04
Аргемин	pH=7,5	29	114±14	1,01±0,12	320±40	10,0 [#] ±1,2	0,16±0,02
	pH=7	71	234*±25	1,77±0,19	765±90	14,2 [#] ±1,6	0,24±0,03
	pH=6	29	114±14	1,14±0,12	955±100	16,5 [#] ±1,8	0,40±0,05
	pH=5	57	153±18	1,10±0,12	685±85	20,0 [#] ±2,3	0,25±0,03
Облучение в течение 3 минут							
Вода	57	185±20	1,17±0,12	235±30	6,2 [#] ±0,6	0,12±0,01	
Хорион	pH=8	29	155±18	1,42±0,16	330±40	8,0±0,9	0,14±0,02
	pH=7	71	202*±22	1,92±0,20	900±85	15,8 [#] ±1,8	0,41±0,05
	pH=6	86	294*±35	2,19±0,22	1095±120	19,7 [#] ±2,2	0,48±0,06
	pH=5	14	130±16	0,83±0,09	400±70	9,0±1,1	0,15±0,02
Аргемин	pH=7,5	43	144±17	1,03±0,10	360±40	10,7 [#] ±1,2	0,15±0,02
	pH=7	71	217±23	1,53±0,17	485±55	9,2 [#] ±1,0	0,15±0,02
	pH=6	43	141±17	0,71±0,08	190±25	6,0±0,6	0,10±0,01
	pH=5	29	362±39	2,80±0,30	2160±270	34,0[#]±6,0	1,57±0,17
Облучение в течение 6 минут							
Вода	57	239±25	2,20±0,25	520±60	13,5 [#] ±1,5	0,37±0,05	
Хорион	pH=8	57	158±18	1,51±0,16	665±75	16,0 [#] ±1,7	0,23±0,04
	pH=7	71	269±30	2,19±0,23	820±90	19,8 [#] ±2,2	0,39±0,05
	pH=6	57	216*±23	2,58±0,27	2055±270	34,8[#]±6,0	0,88±0,10
	pH=5	29	135±16	0,86±0,09	130±20	5,0 [#] ±0,6	0,04±0,01
Аргемин	pH=7,5	57	186±20	2,08±0,22	850±95	15,0 [#] ±1,7	0,46±0,06
	pH=7	57	126±14	1,01±0,10	200±30	5,0 [#] ±0,6	0,08±0,01
	pH=6	57	142±17	1,74±0,18	2130±250	26,5[#]±3,2	0,90±0,10
	pH=5	29	210±25	1,95±0,20	1625±180	37,0±6,1	0,52±0,05

Ультразвуковое облучение стимулирует ризогенез: при трехминутном облучении в растворе препарата «Артемия» при рН=5 суммарная длина корней увеличивается на 215 %, количество корней на 70 %, а масса корней на 175 % по сравнению с аналогичными необлученными черенками. Шестиминутное ультразвуковое облучение в растворе «Хорион» при рН=6 способствует увеличению длины и количества корней почти в шесть раз. Положительное действие ультразвука объясняется влиянием на тканевые и внутриклеточные процессы: изменением процессов диффузии и осмоса, проницаемости клеточных мембран, интенсивности протекания ферментативных процессов, окисления, кислотно-щелочного равновесия, электрической активности клетки (Молчанов, 2009).

Облепиха. Применение хитозанового препарата на основе хорионов цист *Artemia species* оказывает существенное положительное влияние на все показатели укореняемых черенков (таблица 12): позволяет повысить приживаемость саженцев облепихи на 61 %, стимулирует формирование мощной корневой системы, способствует росту побега и кущению.

Таблица 12

Выход и качественные показатели черенков облепихи (апрель 2009)

Показатель	Контроль	Хорион	В % от контроля
Приживаемость, %	46±5	74±5	161
Высота саженца, см	20±2	32±3	160
Число скелетных ветвей первого порядка	3,0±0,5	5,5±0,5	183
Число корней первого порядка	18±2	22±2	122
Суммарная длина корней первого порядка, см	128±7	185±9	145

В опыте укоренение проводили в пленочной теплице с туманообразующей установкой. Закрытый грунт и высокая влажность способствуют развитию грибных патогенов, вызывающих некроз базальной части, отмирание нижних листьев и гибель уже сформировавшихся первичных корней. В данных условиях положительное влияние препарата «Хорион» на укоренение черенков облепихи объясняется фунгицидной и элиситорной активностью входящего в его состав хитозана. Хитин, хитозан и их производные входят в состав клеточных стенок паразитарных грибов и служат информационными сигнальными молекулами, экспрессируя широкий спектр защитных генов высших растений (Немцев и др., 2001, Панина, 2005). То есть при определенных условиях хитозановые препараты

на основе отходов вылова цист *Artemia species* могут частично заменить пестициды, способствуя снижению химической нагрузки на биоценозы и агроценозы.

ВЫВОДЫ

1. Содержание водорастворимых солей в хорионах цист *Artemia species* – 16,4 %. Лучшие результаты по обессоливанию получены при ультразвуковом облучении акустической мощностью 150 Вт в течение трех минут водной суспензии хорионов при гидромодуле 1:40. Хитозановые препараты получают настаиванием хорионов в 40 %-ном растворе КОН при модуле 1:10. Ультразвуковая обработка при этом позволяет сократить время настаивания и получить хитозан с более низкой молекулярной массой.

2. На биологическую активность хитозановых препаратов наиболее существенное влияние оказывает рН раствора и молекулярная масса входящего в состав хитозана. Введение в препарат хелата цинка повышает энергию прорастания семян льна-долгунца на 20–39 %. Введение хелата меди снижает энергии прорастания семян в среднем на 20 %, но приводит к увеличению длины корней.

3. При проращивании семян наибольшей биологической активностью обладает препарат «Хорион» при степени разведения 1:100 и рН=6, что объясняется лучшей растворимостью хитозана в слабо кислой среде. При обработке семян льна-долгунца энергия прорастания повышается на 17 %, а длина корней в два раза. При обработке семян гороха развивается корни второго порядка длиной до 4 мм.

4. Применение препарата «Хорион» повышает урожайность картофеля сорта Архидея на 293 %. На фоне недостаточной увлажненности вегетационного периода это объясняется способностью хитозана регулировать использование воды.

5. Влияние хитозановых препаратов на укоренение черенков винограда определяется индивидуальными особенностями сорта. В большинстве случаев хитозановый препарат стимулирует образование корней второго и третьего порядка. При укоренении черенков сорта Мускат Коричневый в растворе препарата «Хорион» при рН=6 шестиминутное ультразвуковое облучение черенков акустической мощностью 50 Вт приводит к увеличению суммарной длины и количества корней в шесть раз. Препараты, полученные после ультразвукового облучения и имею-

щие в своем составе более низкомолекулярный хитозан, проявляют большую биологическую активность в отношении черенков винограда сорта Память Домбковской: при pH=6 длина побегов увеличивается на 57–87 %, количество корней – более чем в три раза.

6. Обработка препаратом «Хорион» зеленых черенков облепихи повышает приживаемость на 61%, способствует кущению и увеличению суммарной длины корней первого порядка на 45 %, что связано с фунгицидной и элиситорной активностью хитозана.

Основное содержание изложено в работах:

1 Морозова, Е.А. Применение ультразвука для обессоливания хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. «Технологии и оборудование химической, биологической и пищевой промышленности», май 2008. – Бийск: АлтГТУ. – 2008. – С. 128–130.

2 Морозова, Е.А. Влияние хитозанового препарата, полученного из некондиционных цист *Artemia sp.*, на энергию прорастания семян льна-долгунца / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Сб. статей III Международ. науч.-практ. конф. «Аграрная наука – сельскому хозяйству», книга 1. – Барнаул: АГАУ. – 2008. – С. 372–373.

3 Морозова, Е.А. Сравнительный анализ основных физико-химических показателей некондиционных цист и хорионов цист *Artemia sp.* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Материалы 5-й Межрегион. науч.-практ. конф. «Производные хитозана и стимуляторы роста в сельском хозяйстве», март 2008. – Бийск: АлтГТУ. – 2008. – С. 22–25.

4 Морозова, Е.А. Разработка метода очистки исходного сырья (хорионов цист *Artemia species*) для получения поли-(1,4)-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Материалы II-ой Всерос. науч.-техн. конф. «Полимеры, композиционные материалы и наполнители для них («Полимер 2008»)), май 2008. – Бийск: АлтГТУ. – 2008. – С. 31–33.

5 Морозова, Е.А. Ризогенная активность хитозанового препарата, полученного из некондиционных цист *Artemia sp.*, на примере семян льна-долгунца / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Ползуновский вестник. – Барнаул. – 2008. – №. 1-2. – С. 45–48.

6 Морозова, Е.А. Обессоливание хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин, М.В. Хмелев // Ползуновский вестник. – Барнаул. – 2008. – №. 1-2. – С. 82–84.

7 Морозова, Е.А. Ризогенная активность и влияние хитозановых препаратов полученных из хорионов цист *Artemia species* на энергию прорастания гороха сорта «Новосибирец» / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Материалы III

Международ. конф. (18 – 21 ноября 2008 г., г. Харьков, Украина). – Харьков: СПД ФЛ Михайлов Г.Г. – 2008. – С. 286–287.

8 Морозова, Е.А. Оптимизация процесса обессоливания хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Природные и интеллектуальные ресурсы Сибири (СИБРЕСУРС-14-2008): доклады (материалы) 14-й Междунар. науч.-практ. конф. Омск, 6-8 окт. 2008 г. / Отв. Ред. В.Н. Масленников. – Томск: САН ВШ; В-Спектр. – 2008. – С. 233–236.

9 Морозова, Е.А. Эффективность применения хитозанового препарата на основе хорионов цист *Artemia species* на ранние стадии развития семян льна-долгунца сорта «Томский 14» / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Сб. статей IV Международ. науч.-практ. конф. (5-6 февраля 2009) «Аграрная наука - сельскому хозяйству», книга 2. – Барнаул: АГАУ. – 2009. – С. 123–126.

10 Морозова, Е.А. Повышение урожайности и качества картофеля за счет применения препарата «Хорион» / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Инновационные технологии: производство, экономика, образование: мат. Всерос. научно-практ. Конф. 24 сентября 2009 года / под ред. Г.В. Леонова; Алт. гос. Техн. Ун-т, БТИ. – Бийск: АлтГТУ. – 2009. – С. 417–419.

11 Морозова, Е.А. Эффективность действия хитозановых препаратов на стадии укоренения одревесневших черенков винограда / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Виноградарство в Западной Сибири: материалы Четвертой межрегион. науч.-практ. конф. 12 сентября 2009 года – Бийск: АлтГТУ. – 2010. – С. 59–65.

12 Морозова, Е.А. Применение хитозановых препаратов на стадии укоренения одревесневших черенков винограда / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета – 2010. – №. 2 (64) – С. 41–43.

13 Морозова, Е.А. Применение хитозанового препарата на основе хорионов цист *Artemia species* при укоренении черенков облепихи в полевых условиях / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Сборник трудов регион. науч.-практ. конф. «Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве, растениеводстве и экономике» - Томск: Изд-во ТСХИ. – 2010. – Вып. 12. – С. 31–34.

14 Морозова, Е.А. Разработка метода получения биологически активного препарата на основе хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы Десятой Международ. конф. – Н.Новгород: ННГУ. – 2010. – С. 42–44.

15 Морозова, Е.А. Сравнительный анализ эффективности использования препаратов «Артемия» и «Хорион» / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Производные хитозана и стимуляторы роста в сельском хозяйстве: материалы

6-й Межрегион. науч.-практ. конф. 23 марта 2010 года – Бийск: АлтГТУ. – 2010. – С. 59–64.

16 Морозова, Е.А. Опыт применения хитозанового препарата на основе хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Аграрная наука сельскохозяйственному производству Монголии, Сибири и Казахстана: Сборник научных докладов XIII-й Междунар. науч.-практ. конф. Ч. 1. (Улаанбаатор, 6-7 июня 2010 г.) – Улаанбаатор: Монгольская академия аграрных наук. – 2010. – С. 421–423.

17 Морозова, Е.А. Разработка биологически активных препаратов на основе поли-(1,4)-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы из хорионов цист *Artemia species* / **Е.А. Морозова** // Отчет о выполнении НИОКР // Код ВНИ-ТИЦ 18 4000 214 0301, входящий номер И100302102744, 2010. – С. 20-39.

18 Морозова, Е.А. Влияния хитозановых препаратов и ультразвукового облучения на укоренение черенков винограда / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Современное состояние почвенного покрова, сохранение воспроизводства и плодородия почв: материалы Международ. науч. конф., посвященной 65-летию КазНИИ почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова (15-16 сентября 2010). – Алматы: Изд-во КазНИИ почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова, 2010. – С. 340-344.

19 Морозова, Е.А. Использование отходов вылова цист артемии в растениеводстве / **Е.А. Морозова**, А.Л. Верещагин // Экологический Вестник Северного Кавказа – 2010. – № 2. – С. 61-63.

20 Патент Российская Федерация Способ получения средства для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур и средство / **Морозова Е.А.**, Верещагин А.Л.; заявитель и патентообладатель Бийский Технологический Институт – № 106504/13; заявл. 24.02.2009; опубл. 20.12.2010.