

УДК 547.326, 632.931

ГРАНУЛЫ НА ОСНОВЕ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ДЛЯ БОРЬБЫ С КАРТОФЕЛЬНОЙ НЕМАТОДОЙ *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS***А.А. Суханова¹, А.Н. Бояндин¹, Н.Л. Ертилецкая¹, А.А. Чураков²***ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева», 660123, Красноярск, Россия**ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет», Красноярск, Россия*

Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* (ЗКН) является серьезной проблемой для выращивания картофеля во всем мире. Учитывая высокие потери урожая, вызванные ЗКН, и ограниченную эффективность традиционных подходов (синтетические нематодциды, агрофитоценоотические методы) для решения этой проблемы [1, 2], необходимо искать и исследовать новые средства борьбы с вредителями. Разработка препаратов длительного действия с нематодцидными ингредиентами может стать новым перспективным подходом в борьбе с ЗКН.

Одной из таких стратегий может быть, например, использование систем контролируемого высвобождения на полимерной основе, которые действуют как носители пестицидов и обеспечивают их медленное высвобождение в течение вегетационного периода. Для таких систем предпочтительно использовать биоразлагаемые полимерные материалы, которые могут разлагаться в окружающей среде на безопасные конечные продукты (вода и газ). Среди которых полигидроксикапроноаты [3], целлюлоза [4], полилактид [5], поликапролактон [6], а также их смеси с другими биodeградируемыми и синтетическими полимерами, и органическими и неорганическими вещества известны в качестве биоразлагаемых полимерных носителей пестицидов.

Поликапролактон (ПКЛ) представляет собой биоразлагаемый полиэфир, синтезированный из мономера ϵ -капролактона. Поликапролактон в окружающей среде деградирует до 6-гидроксикапроновой кислоты в результате гидролиза ферментами эстеразами, которая включается в цикл окисления жирных кислот микроорганизмов. Однако для широкого внедрения сельскохозяйственных препаратов на основе ПКЛ необходимо каким-либо образом снизить его себестоимость. Для снижения стоимости получаемого материала, а также для улучшения эксплуатационных характеристик ПКЛ его часто смешивают с другими полимерами, такими как поли(3-гидроксibuтират), полимолочная кислота, крахмал, целлюлоза или неорганическими наполнителями. В качестве глинистых минеральных наполнителей чаще всего используют монтмориллонит, бентонит, сапонит, гекторит, смектит или лапонит. Одним из наиболее широко используемых типов наполнителя ПКЛ является монтмориллонит (ММТ), представляющий собой слоистый силикат, ионы которого могут быть заменены органо-ионами для увеличения расстояния между слоями и улучшения совместимости полимер / глина [7].

Важным компонентом таких систем / композитов является пестицид, используемый в качестве действующего вещества против *G. rostochiensis*. Оксамил представляет собой карбаматный пестицид, который контролирует широкий спектр насекомых, клещей, клещей и, в первую очередь, нематод. Одной из причин его использования является его быстрая деградация и частичный гидролиз: период полураспада оксамила в почве колеблется от нескольких часов до нескольких дней и зависит от pH почвы. Из-за быстрого разложения в почве оксамил считается относительно безопасным, но это влияет на его эффективность, что требует дополнительных мер поддержания его активности.

Однако относительная безопасность подобных препаратов требует развития альтернативных подходов и возможности применения природных веществ схожего действия. Такими веществами могут быть изотиоцианаты, в больших количествах присутствующие в растениях семейства Крестоцветные. Аллилизотиоцианат (АИТЦ) – вещество натурального происхождения, продукт разложения аллилглюкозинолата (или синигрина), который содержится в ряде растений семейства Крестоцветные. Сообщается, что АИТЦ токсичен для *Globodera rostochiensis* и подавляет развитие ее цист [8].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования было получение биоразрушаемых гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил и ПКЛ/ММТ/АИТЦ, депонированных оксамилем и аллилизотиоцианатом, соответственно, и исследование их нематодцидной активности по отношению к ЗКН на сорте картофеля «Красноярский ранний».

В качестве биоразрушаемых материалов для получения композитных гранул использовали поликапролактон (ПКЛ) со средневесовой молекулярной массой (M_w) 80 кДа, степенью кристалличности (Сх) 52 %, температурой плавления ($T_{пл}$) 90 °С (Sigma Aldrich, США). В качестве наполнителя использовали органофильную глину «Монамет-101» – химически модифицированный монтмориллонит (ММТ) («Метаклей», Россия), в виде порошка с размером частиц <125 мкм. В качестве активных нематических веществ для депонирования использовали оксамил (экстрагирован из Видат 5Г, Corteva, США), широко применяемый нематический класса карбаматов, и аллилизотиоцианат (АИТЦ) – органическое вещество природного происхождения, которое, согласно литературным данным, обладает нематическим эффектом (Sigma Aldrich).

Композитные гранулы ПКЛ/ММТ / Оксамил и ПКЛ/ММТ/АИТЦ получали с применением портативного экструдера Brabender GmbH (Германия) при температуре плавления 90 °С. Для получения гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил, полимер предварительно смешивали с глиной в пропорциях 1:1 на измерительном миксере Brabender 50 ЕНТ (Германия) и к полученной смеси добавляли раствор оксамила в метаноле в таком количестве, что его содержание в смеси составляло не менее 7 %. Полученную смесь использовали для получения филамента на экструдере, который затем гранулировали. Так как АИТЦ является летучим веществом, требовалось предварительно его инкапсулировать в наполнитель по методике de Souza et al. [9]. 50 г. АИТЦ и 25 г. ММТ в соотношении 2:1 добавляли в раствор, содержащий 10 г. Tween-80 и 150 мл воды. Смесь перемешивали на магнитной мешалке при 800 об/мин до полной гомогенизации. Затем смесь сушили при 110 °С в течение 8 часов. Полученную смесь с инкапсулированным АИТЦ смешивали с ПКЛ в соотношении 1:1 и использовали для получения филамента на экструдере, который затем гранулировали.

На примере оксамила исследовали выход активного вещества из гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил в почву в лабораторных условиях. 100 мг гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил в трех проворностях помещали в пластиковые контейнеры, предварительно заполненные 50 г. экспериментальной почвы (влажностью 60 %), а затем засыпали сверху дополнительными 50 г. почвы, что в сумме составило 100 г. почвы в каждом контейнере. Контейнеры инкубировали при 20 °С в сухом проветриваемом помещении. Влажность почвы в контейнерах поддерживали регулярными поливами (не реже 1 раза в неделю) водопроводной водой из расчета 50 мл на каждую емкость. Эксперимент проводился в течение 91 суток с 7 экспериментальными точками (7, 21, 35, 49, 63, 77 и 91 сут). Измеряли относительную остаточную массу гранул и остаточное содержание оксамила в гранулах.

Перед исследованием эффективности гранул против *Globodera rostochiensis* непосредственно в почве и в присутствии клубней картофеля, предварительно была выполнена оценка их эффективности против нематод *in vitro*. Оценка была выполнена по методике, описанной у Buda & Cepulyte-Rakauskienė [10]. Нематическую эффективность испытуемых гранул сравнивали с положительными контролями: для гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил в качестве контроля выступал раствор оксамила в метаноле концентрацией 2,1 г/л (разведенный в один, два и три раза, так, что объем 500 мкл соответствует по содержанию АИ трем, двум и одной грануле ПКЛ/ММТ / Оксамил, соответственно); для гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ контролем был раствор АИТЦ в дистиллированной воде концентрацией 192 мл/л (разведенный в один, два и три раза, так, что объем 500 мкл соответствует по содержанию АИ трем, двум и одной грануле ПКЛ/ММТ/АИТЦ, соответственно). Отрицательные контроли – метанол и дистиллированная вода.

Для оценки нематической активности полученных экспериментальных гранул ПКЛ/ММТ/Оксамил и ПКЛ/ММТ/АИТЦ были проведены лабораторные испытания в течение двух месяцев на пророщенных клубнях картофеля сорта «Красноярский ранний», помещенных в почву, предварительно инфицированную золотистой картофельной нематодой *G. rostochiensis*. Золотистая картофельная цистообразующая нематода *Globodera rostochiensis* патотип Ro1 предоставлена Всероссийским пунктом по оценке сортов картофеля на устойчивость к раку и нематоду.

В опытные горшки объемом 0,5 л предварительно вносили почву, цисты *G. rostochiensis* (по 50 цист на горшок) и проросший клубень картофеля. В опытные горшки вносили по 20 мг на горшок гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил, исходя из рекомендуемых дозировок для оксамила (1 кг/га), и по 50 и по 100 мг на горшок гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ. Всего для каждого из двух сортов картофеля исследовали восемь групп (по пять повторностей в каждой). В конце опыта подсчитывали высоту и количество стеблей растений, и количество цист на корнях картофеля внутрилабораторными методами. Осмотр корней проводили без снятия растений под биноклем с 3-кратным увеличением.

В результате работы получены экструзионные гранулы на основе ПКЛ/ММТ / Оксамил и ПКЛ/ММТ/АИТЦ. Гранулы ПКЛ/ММТ / Оксамил имели длину 5–10 мм, толщину 2 мм, шероховатую поверхность и были окрашены в темно-зеленый цвет, который был обусловлен красителем в экстракте оксамила, использовавшегося для получения гранул данного состава. Гранулы ПКЛ/ММТ/АИТЦ имели такие же размеры, как и гранулы ПКЛ/ММТ / Оксамил, но были гладкими и блестящими, и коричневого цвета из-за использованного изотиоционата. Микроскопия гранул показала, что добавление частиц ММТ в гранулы ПКЛ/ММТ / Оксамил приводит к появлению пор, кратеров и трещин в пределах частиц ММТ. В микроструктуре гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ отчетливо видны агломераты ММТ размером 100–250 мкм. В целом, гранулы обоих составов имели плотную и гладкую структуру с порами 70–100 мкм и агломератами ММТ размером до 100–150 мкм. Неупорядоченное распределение ММТ в полимерной матрице привело к образованию смешанной структуры композита.

Исследование выхода оксамила в почву из полученных гранул показало значительные отличия от контрольного коммерческого препарата Видат 5Г. В частности, для полученных гранул был характерен постепенный выход оксамила из матрицы, что отражалось в соответствующем повышении концентрации оксамила в экспериментальной почве. К концу эксперимента (92 сутки), 2,5 мг оксамила вышло из 100 мг исследуемых гранул от теоретически возможных 7,0 мг. Гранулы ПКЛ / Оксамил при этом демонстрировали в целом меньший, по сравнению с ПКЛ/ММТ / Оксамил, выход оксамила в течение всего эксперимента, и на 92 сутки концентрация оксамила для этих гранул была менее 12 мкг/г почвы. Для контрольного препарата «Видат 5Г» максимум выхода наблюдали уже в первой экспериментальной точке (7 суток), концентрация оксамила составляла 13,21 мкг/г почвы. Данный результат показал, что полученный полимерный носитель позволяет продлить период высокой концентрации нематцида в почве. Выход АИТЦ из гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ сравнивали с гранулами ПКЛ/АИТЦ без добавления ММТ в качестве контроля. Так же, как и для гранул с оксамилем, для этих гранул был характерен постепенный выход активного ингредиента. Профили выхода исследуемых гранул и контроля значительно не отличались. На 92 сутки гранулы ПКЛ/ММТ/АИТЦ достигли выхода АИТЦ 8,9 мкг/г почвы. Параллельное определение убыли массы показало, что исследуемые гранулы умеренно деградировали в течение всего срока эксперимента – на 92 сутки остаточная масса гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил составила 60,6 %. Деградация контрольных гранул ПКЛ / Оксамил достоверно не отличалась от ПКЛ/ММТ / Оксамил. Гранулы ПКЛ/ММТ/АИТЦ так же, как и гранулы с оксамилем, умеренно деградировали в течение всего срока эксперимента – на 92 сутки остаточная масса гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ составила 55,6 %. Деградация контрольных гранул ПКЛ/АИТЦ также достоверно не отличалась от ПКЛ/ММТ/АИТЦ.

По результатам исследования нематцидной активности полученных гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил значительный эффект был зарегистрирован уже через 24 часа их экспозиции в планшете с нематодами – дозировки из одной, двух и трех гранул привели к смертности 44, 50 и 75 % нематод, соответственно. Соответствующие контрольные дозировки раствора оксамила в метаноле показали значения лишь незначительно выше – 56, 68 и 81 %. Через 48 и 72 часа экспозиции разница между положительным контролем и гранулами, а также между разными дозировками гранул оказалась еще меньше. В частности, после 72 часов экспозиции дозировки из одной, двух и трех гранул соответствовали 92, 96 и 97 % смертности нематод. Положительный контроль для всех трех дозировок показал стопроцентную смертность. Таким образом, данный эксперимент показал, что полученные полимерные гранулы с депонированным оксамилем сопоставимы по эффективности со свободным препаратом оксамила. Результаты исследования нематцидной активности гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ, как и гранулы, депонированные оксамилем, гранулы ПКЛ/ММТ/АИТЦ в целом показали достаточную нематцидную активность. Через 24 часа экспозиции смертность нематод в присутствии этих гранул составила 35, 32 и 35 % при дозировках одна, две и три гранулы, соответственно. В контрольной группе данные концентрации показали смертность нематод 22, 30 и 35 %. Через 48 часов смертность нематод находилась в пределах 51–64 % в зависимости от дозировки, контроль показывал сопоставимые значения 48–65 %. Через 72 часа экспозиции смертность нематод достигла 92 % для дозировки в три гранулы, при этом соответствующая дозировка свободного АИТЦ показывала 87 %. Из данных результатов можно сделать вывод, что депонированный АИТЦ в некоторой степени обладает более выраженным нематцидным эффектом по сравнению со свободным АИТЦ, однако

этот эффект достигается только на третьи сутки экспозиции. В эксперименте по оценке нематодической активности *in vivo* гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил цисты полностью отсутствовали на корнях отрицательного контроля и присутствовали в единичных количествах на корнях картофеля в почве, обработанной коммерческим препаратом оксамил. При этом внесение гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил в экспериментальные горшки уменьшило число цист в 2,33 раза по сравнению с положительным контролем. Этот эффект можно объяснить пролонгированным действием гранул и постепенным высвобождением оксамил. Достоверных различий в числе стеблей и их длине между контролями, Видат 5Г и гранулами ПКЛ/ММТ / Оксамил обнаружено не было. Исключение составляет положительный контроль сорта Красноярский ранний – для этой группы наблюдалось повышенное число стеблей по сравнению со всеми остальными группами, что может быть косвенным показателем недостатка питательных веществ в растении.

Так же, как и для гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил, к концу эксперимента по оценке нематодической активности гранул ПКЛ/ММТ/АИТЦ корни растений, независимо от группы и сорта картофеля, визуально не отличались. Ожидаемо, цисты полностью отсутствовали на корнях отрицательного контроля. Число цист при этом уменьшилось в 1,6–2,5 раза, причем различие в дозировках и способах внесения (гранулы или раствор) достоверно не повлияло на эффективность – число цист для групп для депонированного АИТЦ находилось в диапазоне 121–171. Предполагается, что увеличение процента депонирования повысит эффективность биопестицида до значений, сопоставимых с таковыми для оксамил и гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил. Достоверных различий в числе стеблей и их длине, так же, как и для гранул ПКЛ/ММТ / Оксамил, не было обнаружено.

Полученные новые знания о создании и исследовании экологических гранул на основе ПКЛ/ММТ с инкапсулированными активными веществами (оксамил, аллилизотиоцианат) будут использованы в материаловедении биоразрушаемых полимеров для сельского хозяйства

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ «Разработка экологических систем на основе биоразрушаемых полимеров с депонированными биологически активными веществами для предотвращения болезней картофеля» № 23-16-00184.

Литература

1. Gowen S.R. Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects //FAO Plant Production and Protection Paper (FAO). – 1997. – URL: <https://www.fao.org/3/v9978e/v9978e08.htm> (дата обращения 2022–12–21).
2. Sukhanova A.A., Boyandin A.N., Ertiletskaya N.L. Potato Cyst Nematode Management Strategies: Current Situation and Promising Approaches //ACS Agricultural Science & Technology. – 2022. – DOI:10.1021/acsagritech.1c00274.
3. Cao L. et al. Biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) microcapsules for controlled release of trifluralin with improved photostability and herbicidal activity //Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Т. 102. – С. 134–141. – DOI:10.1016/j.msec.2019.04.050.
4. Zhao M. et al. A high-efficient nano pesticide-fertilizer combination fabricated by amino acid-modified cellulose based carriers //Pest Management Science. – 2022. – Т. 78. – №. 2. – С. 506–520. – DOI:10.1002/ps.6655.
5. Xiao D. et al. A temperature-responsive release cellulose-based microcapsule loaded with chlorpyrifos for sustainable pest control //Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Т. 403. – С. 123654. – DOI:10.1016/j.jhazmat.2020.123654.
6. Boyandin A.N., Kazantseva E.A. Constructing slow-release formulations of herbicide metribuzin using its co-extrusion with biodegradable polyester poly-ε-caprolactone //Journal of Environmental Science and Health, Part B. – 2021. – Т. 56. – №. 5. – С. 467–476. – DOI:10.1080/03601234.2021.1911206.
7. Fukushima K., Tabuani D., Camino G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite //Materials Science and Engineering: C. – 2009. – Т. 29. – №. 4. – С. 1433–1441. – DOI:10.1016/j.msec.2008.11.005
8. Yu Q. et al. Selective nematicidal activity of allyl isothiocyanate //J. Food Agric. Environ. – 2005. – Т. 3. – С. 218–221. – DOI:10.1021/jf200925k
9. de Souza A.G. et al. Synergic antimicrobial properties of Carvacrol essential oil and montmorillonite in biodegradable starch films //International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 164. – С. 1737–1747. – DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.226.
10. Būda V., Čepulytė-Rakauskienė R. The effects of α-solanine and zinc sulphate on the behaviour of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* //Nematology. – 2015. – Т. 17. – №. 9. – С. 1105–1111. – DOI:10.1163/15685411–00002927