

КАРКАСНІ СПОЛУКИ ФУНГІБАКТЕРИЦИДНОЇ ДІЇ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ ПРОТРУЮВАЧІ ЗЕРНА

Миколенко С.Ю., Карабанов Ю.В., Пальчиков В.О.

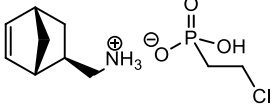
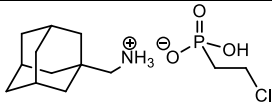
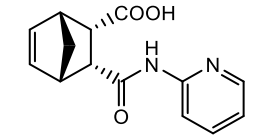
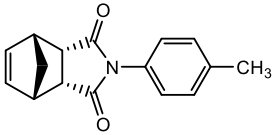
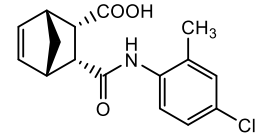
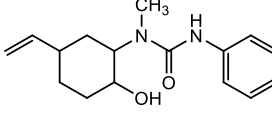
*Дніпровський державний аграрно-економічний університет
Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара*

Протруювання насіння різних культур є одним із найбільш ціленаправлених, ефективних, економічно доцільних та екологічно малонебезпечних заходів. Оскільки використання хімічних способів захисту рослин та їх насіння у харчовому ланцюзі «з лану до столу» передбачає появу втрат зерна і наявність певного економічного ефекту, важливість розробки нових протруювачів не викликає сумнівів. Середньосвітовий рівень втрат врожаю від ураження посівів фітопатогенами складає близько 20%, тому проблема пошуку та створення нових високоефективних, конкурентоздатних вітчизняних фунгібактерицидів завжди актуальна. Залежність фітопатогенів від дії та концентрації відомих препаратів у свою чергу призводить до появи резистентних штамів, тому розробка нових фунгібактерицидів є природним процесом. Відомо, що при систематичному застосуванні одного і того ж фунгіциду, у тому числі Бенлату, стійкість спор грибів може зростати у 3–12 разів. Визначення активності досліджуваних сполук проведено за стандартними методиками на сільськогосподарських тест-об'єктах. Вивчалися наступні види активності: фунгістатична, фунгіцидна, бактерицидна, рістрегулююча і було визначено, яким чином буде змінюватись рівень мікробіологічної контамінації зерна під час зберігання за умови протруювання зерна з використанням хімічних речовин. Досліджувані речовини синтезовано на кафедрі органічної хімії Дніпровського національного університету ім. Олеся Гончара за методиками, описаними нами у роботах [1-4]. Базовою сировиною для синтезу досліджуваних речовин є дициклопентадієн (ДЦПД) – відход коксохімічної та нафтопереробної галузі, який зазвичай спалюється.

1. Фунгістатична активність

Фунгістатична активність сполук визначалася в лабораторних умовах за стандартним методом [5]. Величина активності виражалася в ступені гальмування росту міцелію гриба у % до контролю. У контролі тільки живильне середовище, у дослідних варіантах у живильне середовище вносили випробувану речовину. Вивчали дію сполук у концентраціях 0.01 і 0.05% за діючою речовиною. Результати випробувань, хімічні формули сполук, їх порядкові номери наведено в табл. 1. Як еталони взято препарати ТМТД (80% порошок, застосовується тільки як протруйник насіння) та Бенлат (65% порошок).

Табл. 1. Фунгістатична активність сполук

Тест-речовина (шифр)	Формула	Концентрація препарату в середовищі, %	Гальмування росту міцелію у різних видів грибів, % до контролю				
			<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ПКА-3		0.01	70.0	75.0	88.5	80.0	82.0
		0.05	72.5	78.0	90.0	85.0	88.5
ПКА-9		0.01	70.0	75.0	85.0	82.0	75.0
		0.05	72.5	78.5	88.5	85.0	80.0
ПЕА-11		0.01	75.0	80.0	75.5	88.0	85.0
		0.05	78.5	85.0	80.0	90.0	92.5
ПЕА-13		0.01	65.5	70.0	75.5	80.0	75.0
		0.05	70.0	74.5	82.5	90.0	78.5
ПЕА-16		0.01	75.0	80.0	88.5	90.0	85.0
		0.05	88.0	85.5	95.5	100.0	90.0
ПАС-17		0.01	68.0	70.0	88.5	75.0	80.5
		0.05	72.5	75.0	90.0	80.0	86.5
Контроль ТМТД	Еталон, препарат ТМТД, 80% змочувальний порошок	0.01	88.5	90.0	90.0	100.0	90.0
		0.05	95.0	95.0	100.0	100.0	95.0
Контроль БЕНЛАТ	Еталон, препарат БЕНЛАТ, 65% змочувальний порошок	0.01	65.5	72.5	75.0	78.0	78.0
		0.05	70.0	75.5	78.5	82.5	78.5

Встановлено, що всі випробувані речовини за активністю поступаються універсальному протруйнику ТМТД. При цьому були випробувані промислові зразки у вигляді специфічної препаративної форми, що містить у собі не тільки основну (діючу) речовину, але й цілий ряд домішок, серед яких є й такі, за рахунок яких істотно зростає активність. У той же час нові речовини випробовуються в чистому вигляді без домішок. Отже, активність речовин на рівні еталона Бенлат достатня для подальшої роботи зі створення препаративних форм. Сполуки **ПЕА-11**, **ПЕА-13**, **ПЕА-16** являють безсумнівний практичний

інтерес, за активністю вони не поступаються еталону Бенлату, а для окремих фітопатогенів навіть перевершують його.

2. Фунгіцидна активність

Фунгіцидна активність сполук визначалася в лабораторних дослідах за стандартним методом [5]. Величина активності виражалася в ступені гальмування проростання спор грибів у % до контролю. У контролі водне середовище, в дослідному варіанті в середовище вносили препарат. Концентрація препарату в середовищі 0.001%. Даний вид активності дає додаткову характеристику препарату. Якщо фунгістатична активність характеризує «лікувальні» властивості сполуки, то фунгіцидна активність характеризує «профілактичні» властивості препарату. Придушуючи проростання спор, ми захищаємо рослину від хвороб. Як еталон використано препарат ТМТД (табл. 1), що вбиває гіфи гриба й перешкоджає проростанню спор грибів. Результати випробувань препаратів наведено в табл. 2. Номера сполук і еталонів ті ж, що й у табл. 1. Сполуки ПЕА-11, ПЕА-13, ПЕА-16 виявили високу фунгіцидну активність і становлять практичний інтерес як профілактичні засоби боротьби із хворобами. Серед них найбільш активною є сполука ПЕА-16.

Табл. 2. Фунгіцидна активність сполук

Тест-речовина (шифр)	Концентрація препарату, %	Гальмування проростання спор грибів, % до контролю	
		<i>Helminthosporium sativum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
ПЕА-13	0.001	85	75
ПЕА-16	0.001	80	70
ПАС-17	0.001	90	80
Контроль ТМТД	0.001	95	85
Контроль БЕНЛАТ	0.001	33	25

3. Бактерицидна активність

Бактерицидна активність сполук визначалася у лабораторних дослідах за стандартним методом [6]. Величина активності виражалася в ступені гальмування росту бактерій, у % до контролю. У чашки Петрі заливали стандартизований м'ясо-пептонний агар (МПА). На 100 мл МПА вносили 4 мл суспензії мікробу певного виду. Суспензію готували за стандартом мутності на 10 ОД. У лунки на застиглий МПА вносили розчин препарату. Концентрація 500 мкг/мл. Ця концентрація є «відсікаючою», тому що еталон у цій концентрації повністю придушує ріст бактерій – гальмування росту дорівнює 100%. Після внесення препарату чашки ставили в термостат на 24 години при температурі $36.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Як контроль слугував еталон – Хлорамін. Результати випробувань наведено в табл. 3. Отримані результати дозволяють намітити шляхи створення нових більш активних бактерицидів. Практичне значення можуть мати сполуки ПКА-3, ПЕА-11, ПЕА-13 для боротьби з різними хворобами, що викликані бактеріями (бактеріози рослин). Слід зазначити, що речовини ПЕА-11 і ПЕА-13 проявляють, крім того, високу фунгіцидну активність, тобто вони можуть застосовуватися як

препарати комплексної дії (подвійного призначення) у якості фунгібактерициду, що може дати більшу ефективність і більш високий економічний ефект.

Табл. 3. Бактерицидна активність сполук

Тест-речовина (шифр)	Гальмування росту різних видів бактерій, % до контролю		
	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Ervinia phytophthora</i>	<i>Pseudomonas cerasi</i>
ПЕА-13	100	75	75
ПЕА-16	100	100	85
ПАС-17	75	50	50
Контроль Хлорамін	100	100	100

4. Рістрегулююча активність

Рістрегулююча активність сполук визначалася у лабораторних умовах на проростках рослин за стандартним методом з модифікаціями [7, 8]. У розплавлений агар вносили випробувану речовину певної концентрації. На застиглий агар у чашках Петрі розкладали насіння капусти й вівса. Чашки з насінням ставили на 3 доби в термостат, де підтримувалася температура $24 \pm 1.5^\circ\text{C}$. У цей період насіння проростало. Після цього чашки виймали з термостата й 4 дні витримували у витяжній шафі для дорошування рослин при температурі $20 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Потім визначали схожість насіння і довжину коріння, стебел, листів. У кожному варіанті досліду 5 повторів. Помилка середньої арифметичної для довжини частин рослин 1.1-2.2%, а для схожості насіння 2.1-3.3%. У контрольному варіанті використаний застиглий агар, що містить тільки воду. Як еталон взято ретардант (інгібітор росту) Етрел (β -хлороетилфосфонова кислота) та стимулятор росту рослин Івін. Результати випробувань наведені в табл. 4.

Серед речовин ПЕА-11, ПЕА-13, ПЕА-16 знайдено активний регулятор росту рослин – сполука ПЕА-13. Для двочасткових рослин (капуста) вона трохи поступається еталону Івін як стимулятор росту коріння, але істотно перевершує його як регулятор росту надземної частини. На відміну від еталону, речовина ПЕА-13 стимулює одночасно ріст і кореня й стебла, що має велике практичне значення. Що стосується злаків (овес), то ця сполука також сильно стимулює їхній ріст. Характер дії є таким же, що й на капусті. За впливом на схожість насіння перевершує еталон.

Табл. 4. Рістрегулююча активність сполук

Тест-речовина (шифр)	Концентрація сполуки, %	Довжина частин рослин, % до контролю				Схожість насіння, % до контролю	
		капуста		овес		капуста	овес
		корінь	стебло	корінь	стебло		
ПЕА-13	0.01	57	68	49	58	97	94
	0.001	99	101	103	104	105	106
	0.0001	117	110	109	111	108	109
ПЕА-16	0.01	79	88	82	93	90	92
	0.001	105	111	110	107	109	110
	0.0001	112	109	121	116	104	105
ПАС-17	0.01	88	89	93	97	94	98

	0.001	105	101	110	102	105	105
	0.0001	109	100	107	108	106	107
Івін	0.01	104	71	117	110	97	110
	0.001	110	100	115	107	100	101
	0.0001	119	103	123	108	102	101

5. Зміна рівня мікробіологічного забруднення зерна під час зберігання

На наступному етапі досліджень встановлювали особливості динаміки контамінації зерна пшениці мікроорганізмами під час зберігання. У ході досліджень було використане зерно пшениці сорту «Антоновка» вихідної вологості 13.2%. Для обробки зерна використовували приготовані водні розчини фунгіцидів ПЕА-11, ПЕА-13 та ПЕА-16, які проявляли найвищу фунгіцидну, фунгістатичну і бактерицидну дії за результатами попередніх тестувань, у концентрації 0.05, 0.01 і 0.05% відповідно. Розчини розроблених фунгіцидів вносили у кількості 10% до маси зерна пшениці шляхом розпилювання і залишали при температурі 31–32 °С для висихання до рівноважної вологості. Запаковані у стерильну тару зразки аналізували за загальноприйнятими методиками ДСТУ 8446-15 (кількість мезофільно аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів) і ДСТУ 8447-15 (дріжджі і плісняві гриби). Для визначення максимального знезаражувального ефекту та оптимальної кількості внесеного протруювача здійснювали послідовну обробку зерна пшениці протягом п'яти разів.

У табл. 5 наведені результати тестування синтезованих хімічних речовин щодо впливу на загальне мікробне забруднення зерна і вміст мікроскопічних пліснявих грибів, які здатні провокувати суттєве зниження безпечності зерна внаслідок утворення токсичних метаболітів їх життєдіяльності – мікотоксинів. Мікотоксини відносяться до низькомолекулярних речовин, стійких до дії технологічних чинників, зокрема, температурної обробки. Їх видалення є складною технологічною задачею. Тому створення умов, які попереджають розвиток пліснявих грибів є одним із заходів у продовольчому ланцюзі, які включаються у систему створення безпечного кінцевого харчового продукту.

Табл. 5. Вплив похідних ендикового ангідриду на мікрофлору зерна пшениці

Тест-речовина (шифр), концентрація	Вміст МАФАМ, КУО/г, після протруювань, разів					Вміст пліснявих грибів, КУО/г, після протруювань разів				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ПЕА-11 (0.05%)	830	540	180	490	720	110	20	20	15	20
ПЕА-13 (0.01%)	1200	1200	190	160	410	150	80	30	27	55
ПЕА-16 (0.05%)	1100	1400	200	250	160	80	20	20	20	15

Окремо слід відзначити, що незалежно від використаного фунгіциду і кількості протруювань вміст дріжджів у всіх зразках пшениці не перевищував 10 КУО/г продукту. Вміст мезофільно-анаеробних і факультативно аеробних мікроорганізмів відображає загальний рівень забрудненості сільськогосподарської сировини. Перше протруювання фактично не позначається на рівні загальної зараженості зерна. Після третього протруювання кількість мезофільно-аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів у зерні пшениці знижується у 4.6–5.1 рази порівняно із вихідним зразком без обробки (910 КУО/г) для усіх тестованих речовин. Протруювач ПЕА-11 характеризувався при подальших обробках значним зниженням ефективності, при цьому для зерна, обробленого ПЕА-13, четверте протруювання виявилось найбільш ефективним, у той час як для ПЕА-16 – п'яте, останнє. Внесення мінімальної у рамках поставленого експерименту кількості тестованих речовин фактично не позначалось на кількості пліснявих грибів зерна пшениці. Після першого протруювання зниження їх вмісту з 140 КУО/г для вихідного зразка до 80 КУО/г відбувається лише при застосуванні ПЕА-16. При збільшенні дозування найбільш ефективним було використання ПЕА-11 і ПЕА-16, які знижували мікологічне навантаження зерна пшениці у 7.0–9.3 рази. Максимум знешкодження відбувався на четвертому і п'ятому етапі протруювання відповідно. Щодо тестованої речовини ПЕА-13 її ефективність була дещо меншою (4.7–5.2 рази порівняно із контролем) і знижувалась на останньому етапі протруювання аналогічно до МАФМ.

Беручи до уваги параметр максимальної ефективності використання протруювачів за умови мінімізації використання хімічних речовин найбільшим раціональним є застосування нових протруювачів ПЕА-11 і ПЕА-16. Їх загальну гостру токсичність оцінено нами за розрахунковим методом [9] на рівні LD₅₀ (щури, перорально) 1331 та 917 мг/кг відповідно. Враховуючи низький рівень їх токсичності (IV клас), особливості синтезу із промислових відходів виробництв та досить ефективну дію порівняно із відомими протруювачами, їх застосування може бути перспективним як в умовах невеликих фермерських господарств, так і на хлібозаготівельних підприємствах для протруювання насіннєвого зерна.

Список літератури

1. Продукты взаимодействия эндикового ангидрида с ароматическими аминами и их окисление в условиях реакции Прилежаева / В.А. Пальчиков, И.Н. Тарабара, С.А. Придьма, С.И. Оковитый, Т.В. Петрова, Л.И. Касьян // Вопр. химии и хим. технологии. – 2006. – № 5. – С. 78-86.
2. Ацилирование аминопиридинов и родственных соединений эндиковым ангидридом / Л.И. Касьян, И.Н. Тарабара, В.А. Пальчиков, О.В. Крищик, А.К. Исаев, А.О. Касьян / Журн. орган. химии. – 2005. – Т. 41. – Вып. 10. – С. 1561-1570.
3. Азотсодержащие продукты трансформации 1-винил-3,4-эпоксциклогексана / Касьян Л.И., Гапонова Р.Г., Сеферова М.Ф. // Вопр. химии и хим. технологии. – 2001. – № 4. – С. 35-39.

4. Мочевины и тиомочевины на основе аминов ряда норборнена / А.О. Касьян, О.Ю. Красновская, С.И. Оковитый, Л.И. Касьян // Журн. орган. химии. – 1995. – Т. 31, вып. 3. – С. 347-356.
5. Методические указания по определению фунгицидной активности новых соединений. ВНИИХСЗР, отд. ВНИИТЭХИМ, Черкассы, 1984, 25 с.
6. Г.Н. Першин. Химиотерапия. – М.: Медгиз. – 1970. – 471 с.
7. Сергеева Г.А. Методика лабораторных испытаний гербицидов. Защита растений. – 1963. – № 2. – С. 42-43.
8. А.с. СССР 547203 (1977), МПК² A01N 5/00. Стимулятор роста растений / Карабанов Ю.В., Брагина А.Ш., Домбровская Л.И. и др. – № 2188242/15; Заявл. 10.11.1975; Оpubл. 25.02.1977, бюл. №7.
9. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction / Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. // Mol. Informatics. – 2011. – Vol. 30 (2-3). – P. 241-250.