

ДЕЯКІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ФУНГІЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ

**Е.М. ПОПОВА, А.В. ДРАЖНІКОВА, І.В. КОЩІЙ*, А.В. ВЕЛИЧКО,
О.В. ВІНІЧЕНКО**

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Національний технічний університет України «Київський політехнічний
інститут»

Розроблено спосіб створення фунгіцидного препарату на основі фенольних сполук, які екстраговано із моху сфагнум. Показано, що створений препарат є екологічно безпечним, володіє значно нижчою токсичністю у порівнянні з широко розповсюдженими на ринку України фунгіцидними препаратами. Встановлено високу біологічну активність нового фунгіцидного препарату, показано економічну доцільність застосування створеного препарату для профілактики ушкоджень рослин грибною етіологією.

Ключові слова: *фунгіцидні препарати, фенольні речовини, мох сфагнум, біологічна активність, токсичність.*

Вступ. Актуальність проблеми мікопошкоджень рослин ґрунтується, головним чином, на тому, що жодний існуючий на ринку України біоцидний препарат не можна вважати повністю нешкідливим для тварин, людини та оточуючого середовища в цілому, а також тим, що більша частина грибів – збудників біоповшкоджень – є умовно патогенними організмами. Широкому розповсюдженню міксоміцетів у природі сприяє їх властивість адаптуватися в екстремальних умовах та в умовах антропогенного навантаження [1]. Цьому сприяє їх швидкий ріст, інтенсивний спосіб розмноження та розповсюдження, високоефективна ферментна система, лабільний метаболізм [2].

Систематичне і подовжене застосування хімічних біоцидів призвело до того, що вони стали постійно діючим екологічним фактором, негативний вплив якого з часом посилюється. Показано, що під впливом фунгіцидів інтенсифікується біосинтез грибами таких захисних метаболітів як пігменти, полісахариди, а також процес дихання, що сприяє підвищенню стійкості грибів до фунгіцидів.

Звідси виникає нагальна проблема створення екологічно безпечних з високою біологічною активністю фунгіцидних препаратів. Одним із шляхів вирішення такої проблеми є розроблення біоцидів на основі екстрактів рослинного походження. Серед біологічно активних речовин, які синтезуються рослинами, відомі такі обширні класи сполук як алкалоїди, ізопреноїди, фенольні сполуки та їх похідні.

Фенольні сполуки є одним з найбільш поширених і чисельних класів вторинних метаболітів у рослин з різною біологічною активністю. Ці сполуки неоднорідні за хімічною будовою, в рослинах зустрічаються у вигляді мономерів, димерів та полімерів. До фенольних сполук відносяться кумарини, флавоноїди, хромони, лігнани, лігніни та інші. Тобто, фенольні речовини є досить великою і неоднорідною групою сполук, біологічна активність яких формуються у залежності як від виду рослин, так і від місцевості, у якій збирають рослини для подальшого використання у якості джерела фенольних речовин. Досліджувалися сотні видів рослин, з яких отримували як фенольні сполуки, так і окремі їх фракції та компоненти. І лише одиниці з них проявили високу антигрибкову активність, здатну конкурувати на рівні існуючих фунгіцидних препаратів. У залежності від джерела походження та від способу виділення і очистки біологічна активність фенольних сполук варіює від 2 до 2000 мкг/мл та відрізняється специфічністю. Важливим напрямком у підвищенні біологічної активності фунгіцидних препаратів на основі фенольних речовин рослинного походження є подальше доскональне вивчення механізмів дії окремих класів фенольних сполук. Крім того, серйозним резервом у створенні фунгіцидних препаратів є розроблення таких

комплексних препаратів, які могли б забезпечити зниження фунгіцидної концентрації за рахунок введення до складу препарату поверхнево активних речовин.

Звідси завданням роботи було отримання екологічно безпечного економічно доцільного фунгіцидного препарату з високою біологічною активністю.

Матеріали та методи досліджень. Екстрагування фенольних сполук зі сфагнового моху проводили за розробленим нами способом [3]. Вміст поліфенолів у екстрактах визначали фотометричним методом з використанням реактиву Фоліна-Чокольте [4]. Загальний вихід фенольних сполук виражали як еквівалент галової кислоти на один грам сировини (мг ЕГК/г).

Фунгіцидні властивості екстракту фенольних сполук зі сфагнового моху визначали *in vitro* за методикою poison food technique [5]. Для цього в пробірках змішували екстракт з рідким середовищем Чапека у співвідношенні об'ємів 1 : 1, вносили 0,2 мл суспензії конідій *Fusarium spp.* з щільністю $10^6 - 10^7$ конідій/мл та витримували впродовж 20 годин при 27 °С, потім мікроскопіюванням (x40) визначали відсоток спор, що почали проростати. Досліди проводили у трьох повторностях.

При вивченні токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху був використаний комплексний підхід, суть якого полягає в тому, що токсичність визначається як на організменному, так і на клітинному рівнях [6]. На організменному рівні вивчали токсичність екстракту фенольних сполук за інгібуванням росту корінців салату *Lepidium sativum*, та проводили дослідження зі встановлення гострої токсичності за показником виживання *Daphnia magna* Straus. На клітинному рівні вивчали генотоксичні властивості екстракту фенольних сполук на клітинах кореневої меристеми салату *Lepidium sativum*, використовуючи мікроядерний тест.

Для визначення токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху з фунгіцидною активністю досліджували відповідні розведення екстракту. В якості контролю була використана дистильована вода.

Визначення токсичності за інгібуванням росту корінців салату посівного *Lepidium sativum* ґрунтується на оцінці зміни швидкості росту корінців і виживанні рослин при дії різних концентрації досліджуваного розчину [7]. Для цього фіксували кількість насінин, які проросли у контрольних і досліджуваних розчинах. Вимірювали довжину кожного корінця після 120 год. експозиції і вираховували середнє значення приросту корінця для кожної досліджуваної концентрації фенольних сполук екстракту сфагнового моху і контролю. Критерієм визначення токсичності за інгібуванням подовження корінців салату посівного *Lepidium sativum* є концентрація фенольних сполук екстракту, яка пригнічує довжину корінця на 50 % і 20 % відносно контролю (ЕК₅₀ і ЕК₂₀).

Біотестування з використанням у якості тест-об'єкту гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* Straus ґрунтується на визначенні змін у виживанні ракоподібних внаслідок дії різних концентрацій фенольних сполук екстракту сфагнового моху в порівнянні з контрольними умовами.

Методика полягає у встановленні різниці між кількістю загиблих дафній у водному розчині препарату фунгіцидної дії, що аналізується (дослід), та воді, яка не містить токсичних речовин (контроль). Критерієм гострої токсичності є загибель 50 і більше відсотків дафній у досліді, порівняно з контролем за 96 год. експозиції. Впродовж досліду проводиться облік живих дафній через 1, 24, 48, 96 год. [8].

Для визначення впливу екстракту фенольних речовин сфагнового моху з фунгіцидною активністю на клітини кореневої меристеми салату (*Lepidium sativum*) використовували мікроядерний аналіз [9]. Для визначення генотоксичних властивостей екстракту в клітинах кореневої меристеми салату *Lepidium sativum* розраховували частоту появи морфологічних порушень ядра рослинної клітини (Ч, %), враховуючи загальне число клітин і клітин з мікроядрами.

Результати та їх обговорення. При відпрацьованих нами параметрах екстракції вихід фенольних сполук з одного граму сировини становить 4,46 мг або 0,4 %. Таким чином, отримані нами дані щодо вмісту фенольних сполук корелюються з даними щодо вмісту фенольних сполук у оливкових вичавках (0,3 %), які також рекомендовано використовувати як сировину для отримання органічних пестицидів [10].

Органічні пестициди на основі рослинних екстрактів можуть бути застосовані, в першу чергу, там, де захист рослин хімічно синтезованими препаратами є обмеженим або забороненим.

Тому нами було визначено фунгіцидну активність отриманого екстракту фенольних сполук проти фітопатогенного гриба роду *Fusarium* (рис. 1). Показано, що мінімальна фунгіцидна концентрація фенольних сполук, екстрагованих зі сфагнового моху становить 60 мг ЕГК/л.

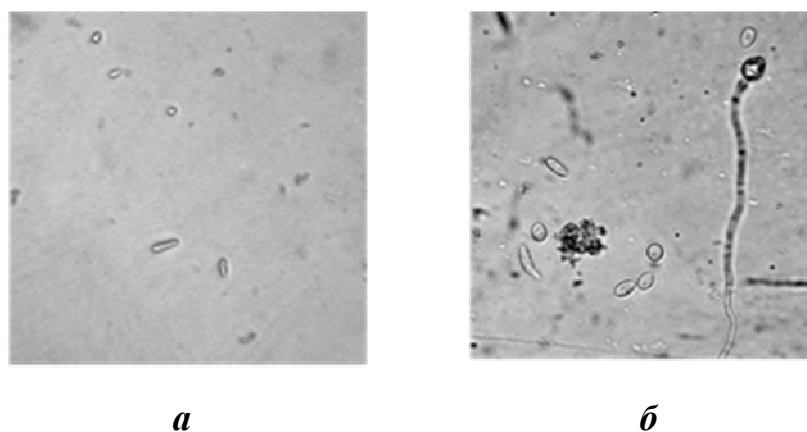


Рис. 1. Спори *Fusarium* spp. (x 400): а – дослід, б – контроль

Результати оцінки токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху за інгібуванням подовження корінців салату посівного *Lepidium sativum* наведено в таблиці 1.

Оцінка токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху за інгібуванням подовження корінців салату посівного *Lepidium sativum*

Концентрація розчину, мг ЕГК/л	Десятковий логарифм концентрації розчину	Середня довжина корінців, см	Пригнічення росту корінців, %
Контроль	-	6,90	100
0,44	-0,3595	6,29	8,84
0,88	-0,0579	6,13	11,16
1,75	0,2430	5,11	25,94
3,50	0,5440	3,52	48,99
7,00	0,8451	1,50	78,26
14,00	1,1416	0,69	90,00
35,00	1,5440	0,23	96,67

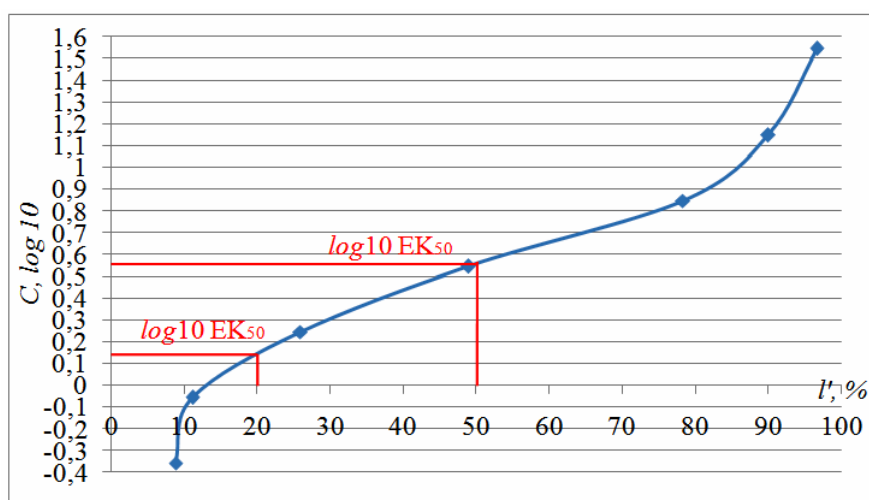


Рис. 2. Обрахунок EK_{50} і EK_{20} графічним методом

Встановили: EK_{50} – 3,54 мг ЕГК/л фенольних речовин EK_{20} – 1,38 мг ЕГК/л фенольних речовин.

Результати оцінки гострої летальної токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху наведено в таблиці 2.

**Оцінка гострої токсичності екстракту фенольних сполук сфагнового моху
за показником виживання *Daphnia magna* Straus**

Концентрація розчину, мг ЕГК/л	Час, год				
	1	6	24	48	96
	Загиблі/живі дафнії				
Контроль	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
0,44	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
0,88	0/30	0/30	0/30	0/30	2/28
1,75	0/30	1/29	3/27	6/24	7/23
3,50	0/30	3/27	8/22	10/20	12/18
7,00	2/28	4/26	9/21	13/17	16/14
14,00	3/27	8/22	11/19	17/13	26/4
35,00	9/21	12/18	17/13	29/1	30/0
70,00	11/19	14/16	23/7	30/0	30/0

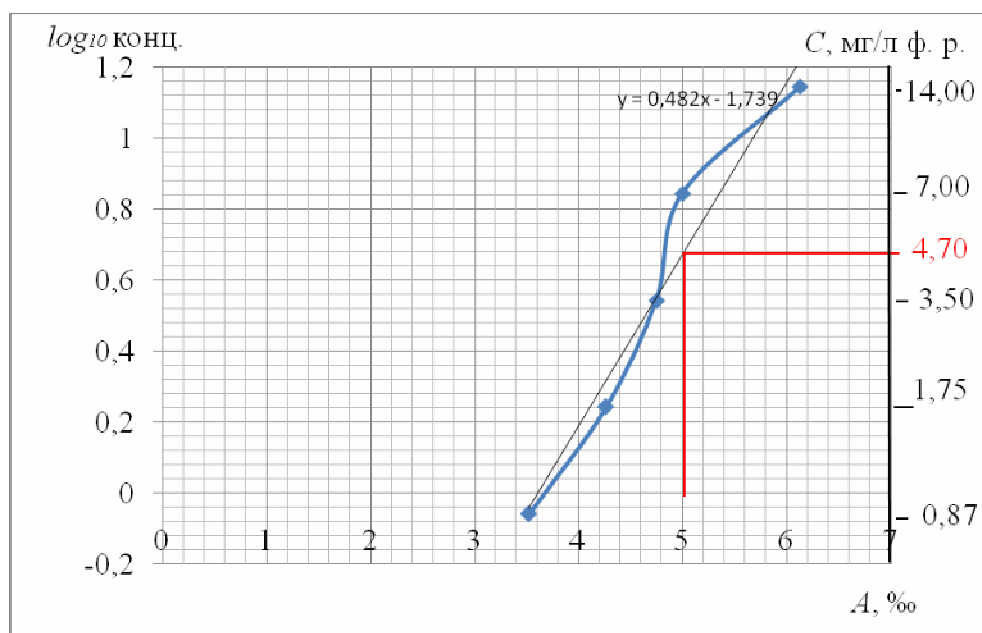


Рис. 3. Розрахунок середньої летальної концентрації (графічний метод Беренса [11])

Таким чином, встановлено, що $LK_{50} = 4,69$ мг ЕГК/л фенольних сполук екстракту сфагнового моху. Відповідно до класифікації запропонованою Флеровим [12], критерієм якої є величина LK_{50} , встановлено що екстракт фенольних сполук мохоподібних відповідає 3 класу, тобто характеризується середньою токсичністю.

Дані з визначення генотоксичних властивостей досліджуваного екстракту наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Генотоксичний вплив екстракту фенольних сполук сфагнового моху на клітини кореневої меристеми салату *Lepidium sativum*

Аномалії клітин	Контроль	Концентрація розчину екстракту фенольних сполук сфагнового моху, мг ЕГК/л						
		0,438	0,88	1,75	3,50	7,00	14,00	35,00
Мікроядра	0	0	0	0	0	1	1	2
Всього клітин	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Мікроядра, %	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,2

Як видно з таблиці 3, лише 7,0 мг ЕГК/л фенольних сполук екстракту із сфагнового моху проявляють генотоксичні властивості на клітини кореневої меристеми салату, що свідчить про невисоку генотоксичність препарату.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено спосіб отримання фенольних речовин із сфагнового моху та оптимізовано процедуру режиму екстракції фенольних сполук.
2. Досліджено фунгіцидну активність отриманого екстракту фенольних речовин та визначено, що мінімальна концентрація фенольних сполук, яка інгібує проростання спор фітопатогенного гриба *Fusarium*, становить 60 мг ЕКГ/л.
3. Визначено середню летальну концентрацію екстракту фенольних речовин для гіллястовусих ракоподібних, яка становить 4,7 мг ЕГК/л фенольних речовин. 7,0 мг ЕГК/л фенольних сполук екстракту із сфагнового моху проявляють генотоксичні властивості на клітини кореневої меристеми салату, що свідчить про невисоку генотоксичність препарату.

4. Комплексна оцінка токсичності екстракту фенольних речовин дозволила нам віднести досліджуваний препарат до 3-го класу токсичності, тобто екстракт фенольних речовин можна вважати середньо токсичним.

5. Отримані нами результати із визначення біологічної активності екстракту фенольних речовин із сфагнового моху свідчать про екологічну доцільність та економічну обґрунтованість застосування отриманого нами препарату фенольних речовин із сфагнового моху у якості фунгіцидного препарату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jaenike R. Enzymes under extremes of physical conditions / R. Jaenike // *Ann. Rev. Biophys. and Bioendg.* – 1981. – V.10. – №1. – P. 1-67.

2. Павлова И.А. Экология микромицетов / И.А. Павлова, М.В. Апрелева, Е.А. Колмакова // Труды биологич. НИИ Санкт-Петербургского государственного ун-та: Экология грибов, теоретические и прикладные аспекты. – СПб.: СПГУ, 1992. – С. 173-194.

3. Пат. на корисну модель 63697 Україна, МПК А01N 61/02 (2006.01). Спосіб отримання препарату з фунгіцидною активністю / Дrajнікова А.В., Попова Е.М., Кощій І.В., Вініченко О.В.; заявники та патентоотримувачи Дrajнікова А.В., Попова Е.М., Кощій І.В., Вініченко О.В. – №а201100406; заявл. 13.01.11; опубл. 25.10.11, Бюл. №20.

4. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // *Methods in Enzymology.* – 1999. – V. 299. – P. 152-178.

5. Onkar D. Dhingra Basic plant pathology methods 2nd Edition / Onkar D. Dhingra, J.B. Sinclair. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press / Lewis Publishers, 1995. – 434 p.

6. Arkhipchuk V.V. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells / V.V. Arkhipchuk,

M.V. Malinovskaya, N.N. Garanko // Environmental Toxicology. – 2000. – № 4. – P. 338–344.

7. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / [О. М. Арсан, О. А. Давидов, Т. М. Дьяченко та ін.]; за ред. В. Д. Романенка. – К.: Логос, 2006 – 408 с.

8. ДСТУ 4173-2003 "Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* та *Ceriodaphnia affinis*"

9. Ильинских Н.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов / Н.Н. Ильинских, И.Н. Ильинских, В.Н. Некрасов // Цитология и генетика. – 1988. – Т. 22, № 1. – С. 67–72.

10. Winkelhausen E. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace / E. Winkelhausen, R. Pospiech, G. Laufenberg // Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia. – 2005. – Vol. 24. – No. 1. – P. 41-46.

11. Ісаєнко В. М. Основи екологічної токсикології: лабораторний практикум / В. М. Ісаєнко, Т. І. Білик, Л. С. Кіпніс. – К. : НАУ, 2007. – 68 с.

12. Зайцева О. В. Современное биотестирование вод, требования к тест-организмам и тест-функциям с позиций сравнительной физиологии и физиологии адаптационных процессов / О. В. Зайцева, В. В. Ковалев, Н. Е. Шувалова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1994. – № 4. – С. 40.

Некоторые аспекты создания фунгицидных препаратов

***Э.М. ПОПОВА, А.В. ДРАЖНИКОВА, И.В. КОЩИЙ*, А.В. ВЕЛИЧКО,
А.В. ВИНИЧЕНКО***

Национальный авиационный университет, г. Киев

**Национальный технический университет Украины «Киевский
политехнический институт»*

Разработан способ создания фунгицидного препарата на основе фенольных соединений, которые экстрагированы из сфагнового мха. Показано,

что созданный препарат является экологически безопасным, его токсичность значительно ниже в сравнении с широко распространенными на рынке Украины фунгицидными препаратами. Определена высокая биологическая активность нового фунгицидного препарата, показана экономическая целесообразность применения созданного препарата для профилактики повреждений растений грибной этиологии.

Ключевые слова: *фунгицидные препараты, фенольные соединения, мох сфагнум, биологическая активность, токсичность.*

Some aspects of fungicidal preparations development

E.M. POPOVA, A.V. DRAZHNIKOVA, I.V. KOSCHY*, A.V. VELICHKO,

O.V. VINICHENKO

National Aviation University, Kyiv

**National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”*

The method of fungicidal preparation creation was developed on the basis of phenolic compounds extracted from sphagnum moss. Developed preparation is ecologically safe, its toxicity is less than widely used fungicidal preparations in Ukraine. The high biological activity of new fungicidal preparation was determined. The usage of preparation is economically reasonable for prevention of plant damage of fungal etiology.

Key words: *fungicidal preparations, phenolic compounds, sphagnum moss, biological activity, toxicity.*