

ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИТОТОКСИЧНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПЕСТИЦИДОВ

Лученок Л. Н., кандидат сельскохозяйственных наук
РУП «Институт мелиорации»

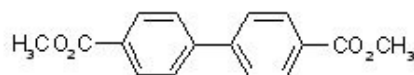
Пап А. А., кандидат химических наук
ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»

Баран С. Г., стажёр младшего научного сотрудника
РУП «Институт мелиорации».

Ключевые слова: пестициды, производные бифенила, дегидрогеназная активность, фитотоксичность

Введение

В настоящее время рост продуктивности сельскохозяйственных земель возможен только при интенсификации растениеводства, одно из важных мест в которой принадлежит средствам защиты растений (фунгицидам, гербицидам и инсектицидам). В 2011 г. на закупку пестицидов было потрачено около 200 млн. долларов США. Значительные затраты на закупку средств защиты приводят к удорожанию производства кормов и, следовательно, и животноводческой продукции. Поэтому инновационное и импортозамещающее развитие белорусского научно-промышленного комплекса должно быть направлено на получение новых пестицидов, а также на разработку и усовершенствование технологий их синтеза из доступных и недорогих исходных отечественных соединений. Одним из таких соединений является диметилэфир бифенил-4,4'-дикарбоновой кислоты, который доступен в неограниченных количествах и легко выделяется из отходов производства диметилтерефталата по технологии, реализованной на ОАО «Могилёвхимволокно» [1]. На его основе можно получать различной сложности производные бифенила, обладающие пестицидными свойствами. В зависимости от заместителей при бифенильном ядре соединения могут обладать фунгицидными, инсектицидными или гербицидными свойствами.



диметилэфир бифенил-4,4'-дикарбоновой кислоты

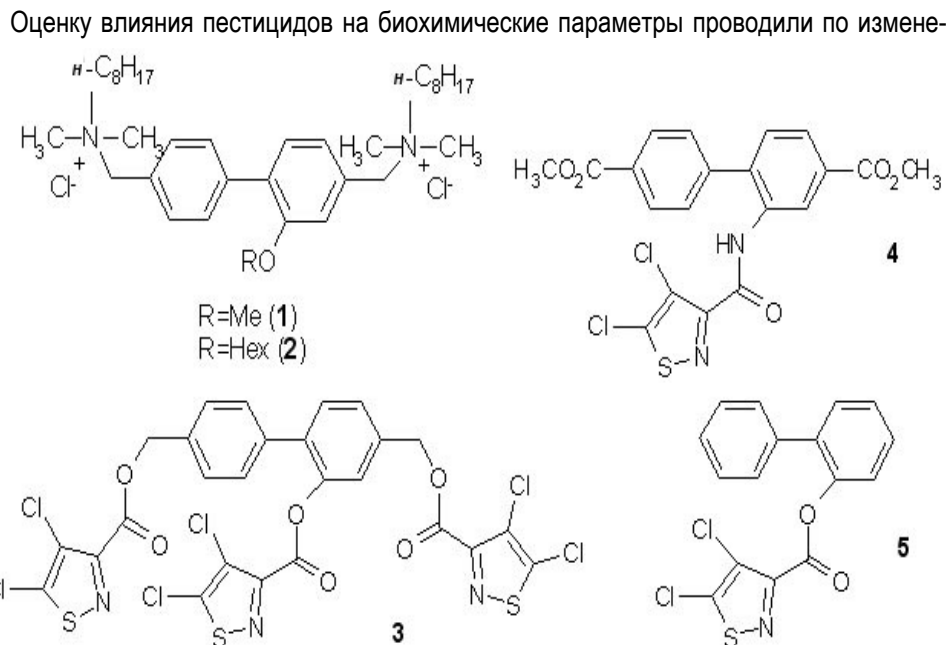
В рамках договора о научном сотрудничестве нами совместно с сотрудниками ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси» осуществлён синтез и разработан удобный метод получения новых производных бифенила 1-5.

Однако важным требованием к вновь синтезируемым пестицидам является их биорациональность, т.е. при высокой эффективности и при низких концентрациях полученные соединения должны быть нетоксичными как для растений, так и для почвенной микрофлоры. Таким образом, целью наших исследований является оценка, как влияют синтезированные соединения 1-5 на растения и биохимическую активность агроторфозёма.

Объекты и методы исследований

Для изучения фитотоксичных и биохимических свойств синтезированных пестицидов были отобраны 5 соединений:

- 1: 2-метокси-4,4'-ди[(N,N-диметил-N-октиламмоний)метил]бифенил дихлорид;
- 2: 2-гексилокси-4,4'-ди[(N,N-диметил-N-октиламмоний)метил]бифенил дихлорид;
- 3: диметилвый эфир 2-(4-метокси-5-хлоризотиазол-3-карбамоил)бифенил-4,4'-дикарбоновой кислоты;
- 4: 2-(4,5-дихлоризотиазол-3-карбонилокси)-4,4'-ди[(4,5-дихлоризотиазол-3-карбонилокси)метил]бифенил
- 5: 2-(4,5-дихлоризотиазол-3-карбонилокси)бифенил.



нию активности дегидрогеназы [3], являющейся косвенным показателем почвенной микробиологической активности. Почва, используемая в экспериментах (агроторфозём с содержанием органического вещества (ОВ) 52,2%), была отобрана на территории бывшей Минской опытной болотной станции. Навески увлажнённой почвы обрабатывали 10 мл водных (соединения 1 и 2) или водно-спиртовых растворов (соединения 3-5) концен-

трациями 0,0026-26 мкг/мл (диапазон выбран в соответствии с рекомендуемым для аналогичных соединений) в зависимости от метода, а в случае контрольного образца – 10 мл дистиллированной воды [2]. Повторность опытов трёхкратная.

Для определения дегидрогеназной активности почвенные пробы (по 30 г) обработанные растворами соединений 1-5 концентрацией 0,26 мкг/мл инкубировали 14 суток при комнатной температуре, поддерживая влажность почвы при 60% объёмной влагоемкости. Затем почвенные пробы доводили до воздушно-сухого состояния и определяли активность дегидрогеназы по методу Ленарда (Lenhard 1962) [6; 34]. Так, 1,5 г почвы (просеянной через сито 2 мм) тщательно перемешивали с 10 мг CaCO₃. Затем добавляли 3 мл H₂O, 1 мл 3% 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ), 1 мл 1% глюкозы. Полученную смесь инкубировали 24 часа при температуре 37°C, затем при перемешивании добавляли 5 мл этилового спирта. Далее суспензию фильтровали в мерные колбы объемом 25 мл, до метки доводили этанолом.

Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Proscan MC 122 при длине волны 485 нм относительно этанола. Определение содержания 2,3,5-трифенилформаза проводили по калибровочному графику. Активность дегидрогеназы выражали в миллиграммах 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ) на 1,5 г почвы за 24 часа [5; 33-39].

Фитотоксичность оценивали по степени отклика кресс-салата (*Lepidium sativum*) на обработку почвы растворами соединений 1-5 концентраций 0,0026-26 мкг/мл.

Семена кресс-салата высевали в чашки Петри (по 10 шт. в чашке) на обработанном соединением 1-5 агроторфозёме (50 г). Время экспозиции составляло 7 суток при комнатной температуре. Влажность почвы поддерживали при 60% объёмной влагоемкости. Проростки кресс-салата взвешивали на весах Ohaus Adventurer RV 214 с дискретностью 0,1 мг. По изменению массы 10 проростков кресс-салата относительно контроля оценивали фитотоксичность синтезированных производных.

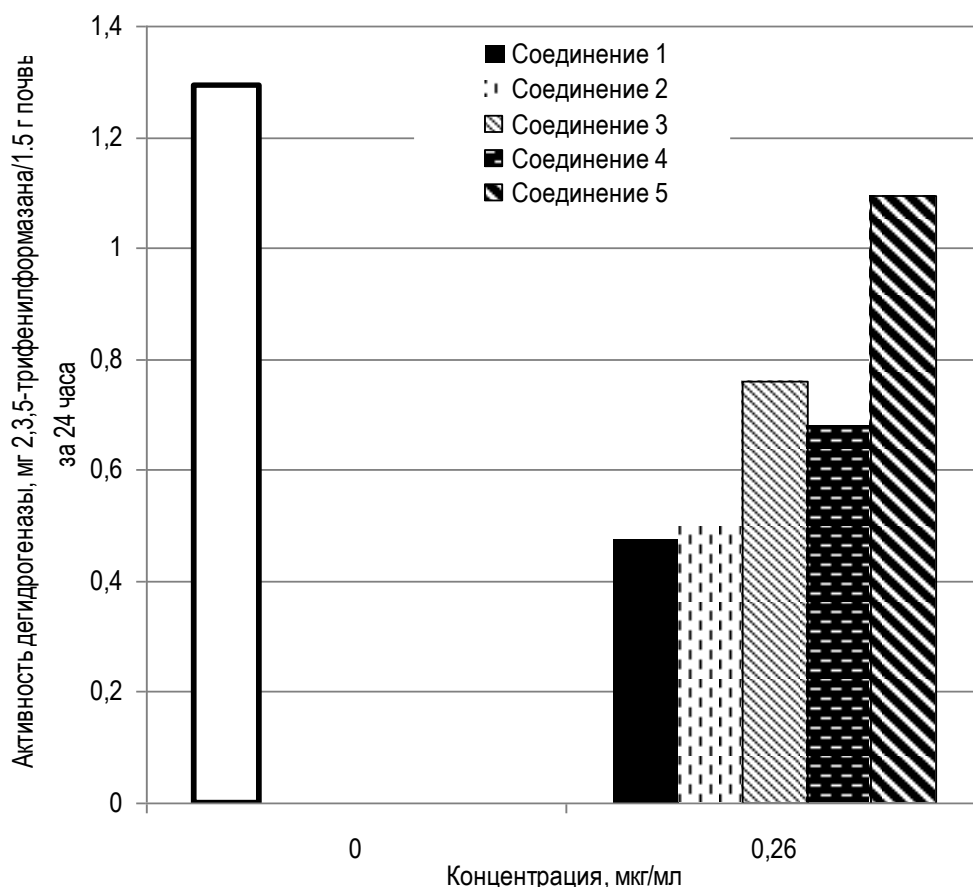
Обсуждение результатов

Влияние производных бифенила 1-5 на активность дегидрогеназы

Дегидрогеназная активность отражает жизнедеятельность микрофлоры почвы и является более чувствительным и доступным показателем токсического влияния пестицидов, тяжелых металлов, углеводов и т.д. по сравнению с учётом выживаемости микроорганизмов [4]. Например, токсическое действие пестицидов в почве заключается в нарушении синтеза ферментов микрофлорой, замедлении или остановке метаболизма, приводящих к снижению активности дегидрогеназы [3].

В лабораторных экспериментах установлено, что все полученные соединения (1-5) при концентрации 0,26 мкг/мл снижают биохимическую активность почвы (рис.). Степень ингибирования активности дегидрогеназы зависит от структуры синтезированных соединений – природы заместителей и их количества при бифенильном ядре. Так, де-

гидрогеназная активность снижалась в 2,7 и 2,6 раз относительно контроля для бифенилсодержащих бис-четвертичных аммонийных соединений (ЧАС) 1 и 2 соответственно. По причине того, что соединения 1 и 2 в значительной степени влияли на жизнедеятельность микрофлоры почвы (дегидрогеназная активность снижалась более чем на 50%), их применение в качестве пестицидов ограничено только предпосевной обработкой семян. В случае производных 4,5-дихлоризотиазолкарбоновой кислоты 3, 4 и 5 активность снижалась в 1,7, 1,9 и 1,2 раза соответственно (рис.).



Изменение активности дегидрогеназы почвы в зависимости от применяемого препарата

Таким образом, бифенилсодержащие ЧАС 1 и 2 являются более токсичными для микрофлоры почвы, чем производные бифенила 3-5, и в большей степени замедляют окислительно-восстановительные процессы, протекающие в почве [5]. Среди производных 3-5 наиболее токсичным является соединение 4, а наименее токсичным среди всех образцов – соединение 5. Однако синтезированные соединения (даже ЧАС 1 и 2) не обладают полной токсичностью. Незначительный отрицательный эффект соединений 3-5

(ингибирование биохимической активности не более чем на 50%) может нивелироваться в течение месяца. В связи с этим производные можно рассматривать в качестве потенциальных биорациональных пестицидов.

Изучение фитотоксичности синтезированных производных бифенила 1-5

Кресс-салат (лат. *Lepidium sativum*) – однолетнее растение семейства крестоцветных, обладающее повышенной чувствительностью к загрязнению почвы пестицидами и тяжёлыми металлами. Этот биоиндикатор отличается быстрым прорастанием семян и почти стопроцентной всхожестью, которая заметно снижается в присутствии поллютантов. Побеги и корни кресс-салата под действием загрязнителей подвергаются заметным морфологическим изменениям (задержка роста и искривление побегов, уменьшение длины и массы корней) [7; 261-276].

Экспериментальные данные показали, что соединения 1-5 обладают фитотоксичными свойствами, которые зависят от структуры соединений и усиливаются с увеличением концентрации (табл.). Так же (как и при изучении биохимической активности почвы) отмечено значительное уменьшение массы проростков кресс-салата при использовании соединений 1 и 2 даже при малых концентрациях. Обработка почвы минимальной концентрацией 0,0026 мкг/мл бифенилсодержащими ЧАС 1 и 2 подавляли рост кресс-салата (масса проростков снижалась на 32-33% относительно контроля). Соединения 3-5 имеют менее выраженную фитотоксичность, а при низких концентрациях отмечена тенденция к изменению массы проростков.

При использовании максимальной концентрации 26 мкг/мл средняя масса 10 проростков кресс-салата снижалась на 56 и 60% относительно контрольного образца для соединений 1 и 2 соответственно (табл. 1). Применение растворов соединений 3-5 той же концентрации в несколько меньшей степени подавляло рост растений – на 38-43%.

В связи с вышеизложенными фактами можно сделать вывод, что все синтезированные соединения обладают фитотоксичными свойствами по отношению к кресс-салату и их, вероятно, можно рассматривать в качестве потенциальных гербицидов. Особое внимание необходимо обратить на бифенилсодержащие ЧАС 1 и 2, подавляющие рост растений сильнее, чем производные 3-5. При этом среди всех образцов наиболее фитотоксичным является соединение 2, а среди производных 4,5-дихлоризотиазолкарбоновой кислоты – соединение 4. Следует также отметить, что наименее фитотоксичным оказалось соединение 5. Использование при малых концентрациях соединений 3-5 незначительно ингибирует рост проростков кресс-салата, поэтому их применение в качестве пестицидов практически не оказывает негативного влияния на растения. Обработка почвы растворами производных 3-5 концентраций 0,0026-0,026 мкг/мл приводило к ингибированию роста кресс-салата относительно контроля не более чем на 11%, а концентрации 0,26 мкг/мл на 23,5, 17,6, 7,3% соответственно.

Масса проростков кресс-салата в зависимости от концентрации применяемого препарата

Концентрация применяемого препарата, мкг/мл	Средняя масса 10 проростков кресс-салата, г				
	Соединение 1	Соединение 2	Соединение 3	Соединение 4	Соединение 5
0	0.301±0.010				
0.0026	0.206±0.005	0.201±0.004	0.284±0.004	0.269±0.002	0.295±0.004
0.026	0.190±0.005	0.200±0.01	0.273±0.004	0.268±0.024	0.311±0.021
0.26	0.180±0.001	0.179±0.001	0.230±0.010	0.248±0.002	0.279±0.003
2.6	0.166±0.007	0.159±0.003	0.206±0.013	0.200±0.009	0.199±0.011
26	0.134±0.010	0.121±0.003	0.174±0.006	0.173±0.013	0.187±0.019

Выводы

Все синтезированные соединения ингибируют биохимическую активность почвы и рост проростков кресс-салата. Степень токсичности зависит от природы и количества заместителей при бифенильном ядре, а также определяется их концентрацией.

Выраженными токсичными свойствами обладают бифенилсодержащие бис-четвертичные аммонийные соединения 1 и 2, которые даже при малых концентрациях ингибируют дегидрогеназную активность и рост проростков кресс-салата. Данные соединения можно рассматривать как потенциальные гербициды или использовать для предпосевной обработки семян в качестве фунгицидов.

Применение соединений 3-5 при 0,0026-0,26 мкг/мл не наносит вред ни растениям, ни почвенной микрофлоре. В связи с этим они, вероятно, могут выступать в роли биорациональных пестицидов.

Литература

1. Способ переработки кубового остатка производства диметилтерефталата: пат. 8072 Респ. Беларусь, МПК7 C07C 69/82, C07C 67/48 / Разина Светлана Леонидовна, Грицев Александр Михайлович, Ольховик Вячеслав Константинович, Калечиц Галина Викторовна, Юхимец Николай Владимирович; заявитель ОАО «Могилёвхимволокно». – № 19990093, заяв. 1999.02.01; опубл. 2000.09.30 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2006. – №3. – С. 83.
2. Pyrazolyl Biphenyl Carboxamides and The Use Thereof for Controlling Undesirable Microorganisms : US Patent 7348350 B2, Int. Cl. A01N 43/56, C07D 231/18 / Hans-Ludwig Elbe, Heiko Reick, Ralf Dunkel, Astrid Mauler-Machnik, Ulrike Wachendorff-Neumann, Karl-Heinz Kuck, Martin Kugler, Thomas Jaetsch ; Assignee: Bayer CropScience AG. – 11/050306 ; Filed Feb. 2, 2005 ; Published Aug. 18, 2005 // US 2005/0182120 A1.
3. In vitro effects of metals and pesticides on dehydrogenase activity in microbial community of cowpea (*Vigna unguiculata*) rhizosphere / C. O. Nweke [et. al] // African Journal of Biotechnology. – Vol. 6 (3). – 2007. – P 290-295.

4. Михайлоўская, Н.А. Ферментатыўная актыўнасць дзярнова-падзолістай лёгкасугліністай глебы ў залежнасці ад аграхімічных паказчыкаў і ўраджаю сельскагаспадарчых культур / Н. А. Михайлоўская // Весці Акадэміі навук БССР. – 1990. – № 2. – С. 40-45.
5. Optimum Conditions for Measuring Dehydrogenase Activity of *Aspergillus niger* using TTC / A. E. Ghaly, N. S. Mahmoud // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. – 2006 – № 2 (4). – P. 186-194.
6. Хазиев, Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. – М.: Наука, 1990. – 178 с.
7. Stoytcheva, M. Pesticides / M.Stoytcheva. - The Impacts of Pesticides Exposure. – Rijeka. – 2011. – 446 p.

Summary

Lučenok L.N., Pap A.A., Baran S.G.

EVALUATION OF BIOCHEMICAL AND PHYTOTOXIC PROPERTIES OF NEW DERIVATIVES OF BI-PHENYL AS POTENTIAL PESTICIDES

The article presents data on phytotoxicity and biochemical parameters of the synthesized new derivatives of pesticides, with pesticide properties. Effect of the compounds was evaluated by the degree of response of soil dehydrogenase activity and weight of watercress salad seedlings at different concentrations. Analysis of experimental data showed that all synthesized compounds are toxic to soil microflora and watercress. However, in view of the fact that bis-quaternary ammonium compounds 1 and 2 are largely inhibit the growth of cress salad seedlings and the activity of dehydrogenase even at the lowest concentrations, they are likely to be considered as potential herbicides, and soil application is limited to pre-treatment of seeds. Use of the compounds 3-5 at not low concentrations does not harm any plants or soil microflora. So, they can be regarded as biorational pesticides.

Поступила 10 сентября 2011 г.