

УДК 632.952:616-093

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНГІЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН ПОЛИНУ ГІРКОГО (*Artemisia absinthium*)

Е. М. ПОПОВА, М. А. КУЙБІДА, В. О. ПРИЛІПКО

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Розглянуто методи визначення фунгіцидної активності препаратів різного походження. Обрано найбільш чутливий метод визначення фунгіцидної активності. Досліджено методи з використанням фунгіциду біологічного та хімічного походження. В якості фунгіцидних препаратів було обрано мідний купорос та екстракт полину гіркового (*Artemisia absinthium*).*

Ключові слова: *фунгіцидна активність, методи визначення, фенольні речовини, полин гіркий, сульфат міді, *Fusarium oxysporum*.*

Вступ. Останнім часом втрати урожаю від захворюваності рослин у всьому світі мають тенденцію до збільшення. Поміж особливо небезпечних збудників хвороб значної шкоди сільськогосподарським культурам завдають гриби, які викликають ряд різноманітних пошкоджень. Тому правильний підбір і грамотне використання фунгіцидних препаратів, як одного з важливих засобів зниження захворюваності сільськогосподарських культур, набуває важливого значення. Для правильного підбору фунгіцидного препарату необхідно знати або правильно визначити біологічну активність фунгіцидного препарату.

Фунгіцидність – здатність зупиняти ріст і розмноження грибів.

Залежно від походження фунгіциди бувають:

- неорганічними: мідний купорос, хлороокис міді, вапняно-сірчаний відвар, мелена і колоїдна сірка, хлорна ртуть;
- органічними: похідні карбамінової кислоти (цинеб, купроцин-1, полімарцин, полікарбацин), фталіміди (каптан, фталан), хінони (фігон), ефіри

дінітроалкалфенолів (каратан), ртутьорганічні з'єднання (гранозан, меркургексан), оксатіїнові з'єднання (вітавакс), препарати на основі бензімідазолу (беноміл) [4].

- біологічного походження: казумін, алерин, фітоспорин, бар'єр, раслон, фітоп, інтеграл, бактофит, агат, планзир.

За характером розподілу серед тканин рослин фунгіциди поділяють на контактні і системні.

Контактні фунгіциди при обробці ними рослин залишаються на поверхні і викликають загибель збудника при зіткненні з ним. Деякі з них мають місцеву глибинну дію, наприклад, здатні проникати у зовнішні оболонки насіння. Ефективність контактних препаратів залежить від тривалості дії, кількості фунгіциду, ступеню сорбції на оброблюваній поверхні, фотохімічної і хімічної стійкості, погоди тощо. Контактні фунгіциди застосовують у сільськогосподарському виробництві з кінця XIX століття.

Системні фунгіциди проникають всередину рослини, поширюються по судинній системі і пригнічують розвиток збудника унаслідок безпосередньої дії на нього або в результаті зміни обміну речовин в рослині. Ефективність їх дії, в основному, визначається швидкістю проникнення в тканини рослин і у меншій мірі залежить від метеорологічних умов. Системні фунгіциди почали застосовувати значно пізніше контактних – з 60-х років XX століття [2].

Відповідно до сучасних вимог, що ставляться до біоцидних препаратів, хімічні сполуки, що використовуються як діюча речовина, повинні мати широкий спектр біоцидної дії, мають бути безпечними для живих організмів і екосистем у цілому [4].

Матеріали та методи досліджень. Для визначення фунгіцидної активності використовували такі методи культивування культури гриба *Fusarium oxysporum*;

Методи визначення фунгіцидної активності:

- метод «лунок»;
- метод «дисків»;

- метод розведення в рідкому поживному середовищі;

Метод «лунок» полягає у наступному: у товщі агарової пластинки робимо лунки діаметром 8 мм. У лунки вносили фунгіцидний препарат (ФП) різної концентрації. Метод лунок має переваги при використанні за рахунок того, що фунгіцид рівномірно всмоктується у товщу агаризованого середовища. Чашки Петрі з лунками в агарі витримували при 28 °С упродовж 48 годин [7].

Метод «дисків» базується на визначенні фунгіцидної активності за діаметром затримки росту гриба навколо диску. Метод полягає в наступному: круглі паперові диски занурювали у фунгіцидний препарат на 5 хв, після чого обережно пінцетом розміщували на поверхні агаризованого середовища. Чашки Петрі поміщали в термостат при 28 °С упродовж 48 годин. По закінченню періоду культивування культури вимірюють зону затримки росту.

Метод розведення у рідкому поживному середовищі дозволяє визначити мінімальну інгібуючу концентрацію, тобто мінімальну концентрацію ФП, за якої пригнічується ріст грибів після 36-48-годинного періоду інкубації. Метод розведення заснований на використанні послідовних розведень концентрацій ФП. ФП в різних концентраціях вносили в рідке живильне середовище (бульйон). Потім суспензію гриба, концентрацію якого визначали відповідно до стандарту мутності 0,5 за McFarland, поміщали у бульйон з ФП. Після інкубації упродовж 48 годин за температури 28 °С проводили облік отриманих результатів. Наявність росту мікроорганізму в бульйоні (помутніння бульйону) свідчить про те, що дана концентрація ФП недостатня, щоб пригнічувати його розмноження [1, 6].

У роботі застосовували препарати з фунгіцидною активністю: сульфат міді (мідний купорос) та екстракт фенольних речовин полину гіркого.

До фенольних сполук, що містяться в тканинах полину гіркого відносяться: глікозиди (анабсинтин і абсинтин), таніни, каротин, а також речовини хамазулен і терпеноїди.

Дослідження біологічної активності екстрактів фенольних речовин полину гіркого проводили з 3-х областей.

Траву полину гіркою заготовляли на початку червня. Висушену до постійної маси траву полину гіркою, подрібнювали та відбирали фракцію діаметром 0,25 см, та зважували 3 г готового матеріалу. Екстракцію фенольних речовин екстрагували 50 % етанолом у пропорції 1:30. Екстракцію фенольних речовин проводили зі зворотним холодильником упродовж 3-х год.

Вміст поліфенолів у екстрактах визначали фотометричним методом з використанням реактиву Фоліна–Чокольте.

Прикладом препарату хімічного походження є досить поширений у використанні дезінфектант – сульфат міді. Незважаючи на появу нових препаратів, мідний купорос продовжують використовувати через його відносну дешевизну і простоту у використанні.

Результати досліджень.

Під час проведення досліджень з використанням культури гриба *Fusarium oxysporum* перед нами було поставлено завдання підібрати оптимальне поживне середовище для культивування. Розглядалися такі поживні середовища: середовище Сабуро, Чапека та картопляно-глюкозний агар (КГА).



Рис. 1. Підбір оптимального поживного середовища для культивування *Fusarium oxysporum*: “++” – чітко виражений ріст; “+” – наявний ріст “+-” – одиничні колонії

Для подальшого дослідження фунгіцидної активності ми використовували КГА з двох причин: на КГА культура має чітко виражений та

гарний ріст, а також світло-помаранчевий колір середовища дозволяє краще спостерігати інгібування росту та розвитку гриба *Fusarium oxysporum*, конідії якого світло забарвлені.

При вивченні впливу сульфату міді на ріст та розвиток гриба *Fusarium oxysporum* використовувались розчини сульфату міді 0,5 % та 1 %.

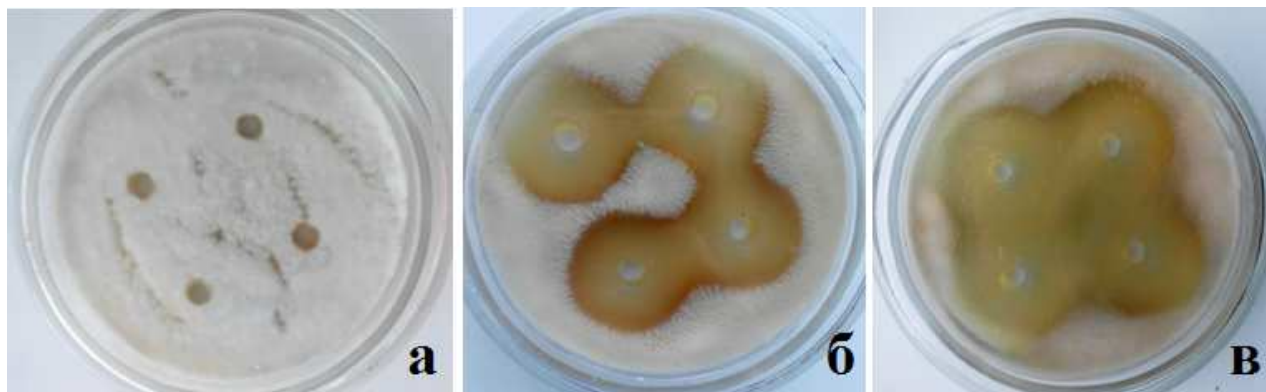


Рис. 2. Метод «лунок» для визначення фунгіцидної дії сульфату міді: а – контроль, лунки наповнені стерильною дистильованою водою, б – лунки наповнені 0,5 % розчином сульфату міді, в – лунки наповнені 1 % розчином сульфату міді

Наведені на рисунку 2 результати досліджень свідчать про те, що сульфат міді проявляє по відношенню до гриба *Fusarium oxysporum* фунгіцидні властивості, що виражаються у досить видимих зонах затримки росту

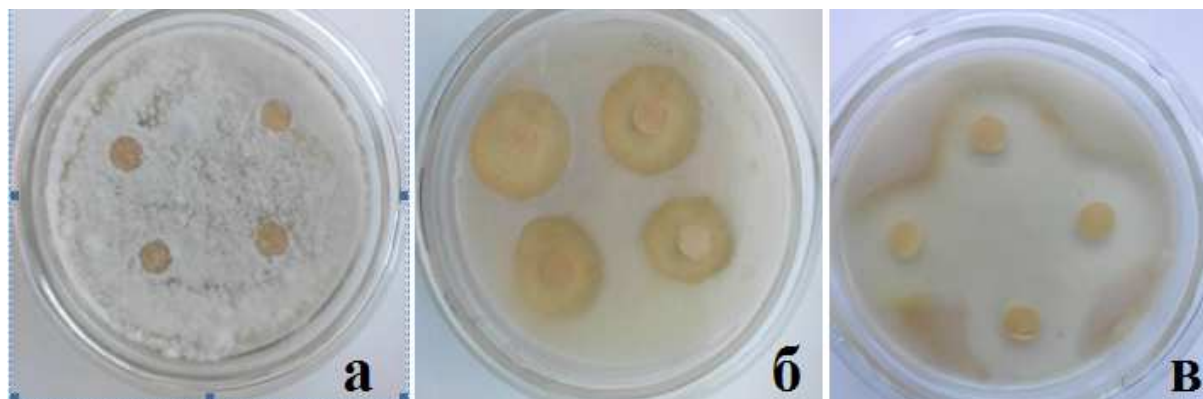


Рис. 3. Метод «дисків» для визначення фунгіцидної дії сульфату міді: а – контроль, диски змочені стерильною дистильованою водою, б – диски змочені 0,5 % розчином сульфату міді, в – диски змочені 1 % розчином сульфату міді

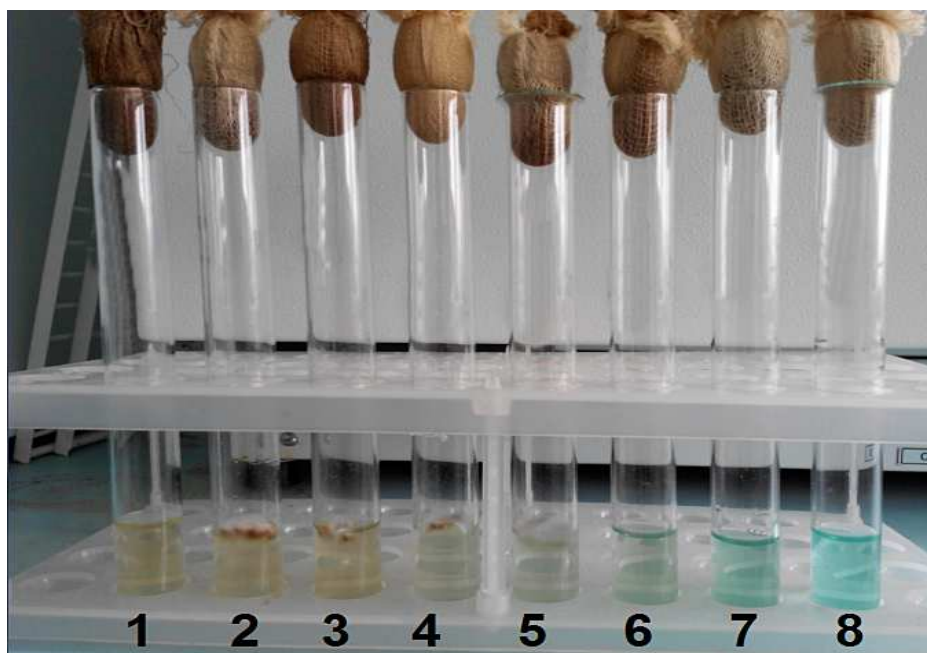


Рис. 4. Фунгіцидний вплив сульфату міді на прикладі розведень в рідкому ПС: 1 – контроль, середовище без внесення фунгіциду та суспензії гриба; 2 – контроль, середовище з суспензією гриба, без фунгіциду; 3 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 0,125 % концентрації; 4 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 0,25 % концентрації; 5 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 0,5 % концентрації; 6 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 1 % концентрації; 7 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 1,5 % концентрації; 8 – середовище з суспензією гриба та фунгіцидом 2 % концентрації

По закінченні культивування спостерігали інгібування росту *F.oxysporum* починаючи з концентрації ФП 0,25 %, повне припинення росту після висіву даної суспензії на чашку Петрі спостерігалась в пробірці з концентрацією ФП 1 %.

Результати проведених досліджень із застосуванням різних методів з використанням фунгіциду хімічного походження (сульфат міді) можна порівняти між собою за показниками, які дозволяють вибрати найбільш інформативний метод визначення фунгіцидної активності досліджуваних препаратів.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика методів за відповідними показниками

Показник	Метод “лунок”	Метод “дисків”	Розведення в рідкому ПС
Складність методу	+++	++	++
Витрата матеріалів	++	+	+
Чутливість	++++	+++	++
Тривалість проведення	++	++	++

«++++» – максимальне значення відповідного показника

«+» – мінімальне значення відповідного показника

З даних табл. 1 можна констатувати, що найбільш складним в постановці серед перелічених методів є метод «лунок». Найбільш економічно вигідними є методи дисків, метод розведень в рідкому поживному середовищі та метод «дисків». Найбільшу точність демонструє метод «лунок», і при виборі методу дослідження фунгіцидної активності слід звертати увагу не лише на простоту методу та економію матеріалів, найбільш важливим показником є точність методу.

Порівнюючи діаметр зони затримки росту, ми отримали результати представлені у табл. 2.

Таблиця 2

Зони затримки росту культури *Fusarium oxysporum*, r, мм

Концентрація CuSO ₄	Метод “лунок”, r, мм		Метод “дисків”, r, мм	
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻⁴
1 %-й розчин CuSO ₄	11	13	10	12
0,5 %-й розчин CuSO ₄	9	11	6	9

Порівнюючи ці методи між собою, слід зазначити, що за однакової концентрації сульфату міді, однаковому розведенні культури гриба, часі

культивування та середовищі культивування найкращі результати продемонстрував метод «лунок».

У подальшому ми вивчали фунгіцидну активність екстракту фенольних речовин полину гіркого із застосуванням методу дифузії в агар – методу «лунок».

Результати представлені на рис. 5.

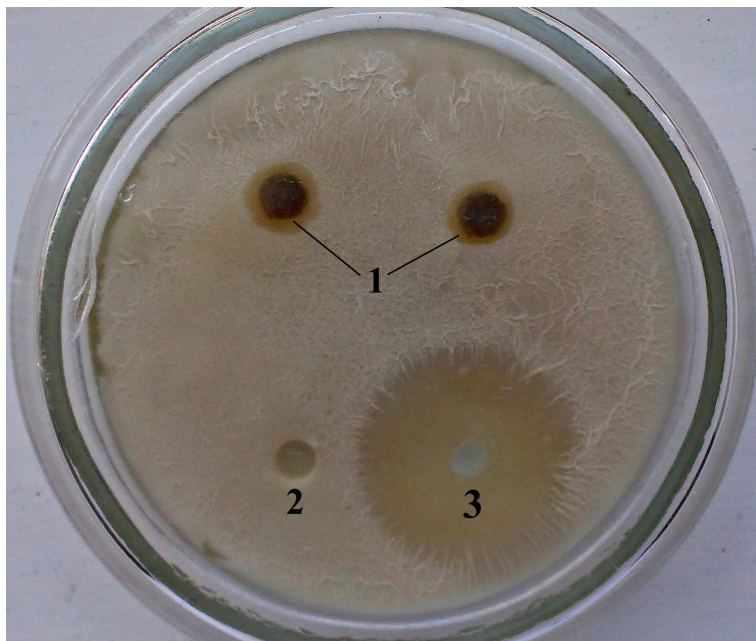


Рис. 5. Визначення фунгіцидної активності екстракту полину: 1 – лунки, наповнені екстрактом полину; 2 – контроль; 3 – лунки, наповнені сульфатом міді

Встановлено також, що 0,41 мг фенольних речовин затримує ріст мікроскопічного гриба *Fusarium oxysporum* на 5 мм.

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведених досліджень було встановлено оптимальне поживне середовище для вирощування досліджуваної культури *Fusarium oxysporum*. Виявлено, що найкращий ріст культури відбувається на картопляно-глюкозному агарі.

2. Встановлено, що ефективність дії фунгіцидних препаратів прямо пропорційна концентрації.

3. Встановлено, що найбільш чутливим методом визначення фунгіцидної активності є метод дифузії в агар – метод “лунок”. Ця методика дозволяє найбільш точно визначити зону затримки росту гриба відповідно до концентрації фунгіциду по всій товщі агару лунки.

4. Встановлено, що 0,41 мг фенольних речовин затримує ріст мікроскопічного гриба *Fusarium oxysporum* на 5 мм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 615 с.

2. Голышин Н. М. Фунгициды / Н. М. Голышин. – М.: Колос, 1993. – 319 с.

3. Слюсаренко Т. П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т. П. Слюсаренко. – М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. – 137 с.

4. Перспективи застосування біопрепаратів із грибів для захисту рослин та стан їх виробництва / [Горовий Л. Ф., Ревенко І. І., Кошевський І. І., Теслюк В. В.] – К.: КМТИ, 2002. – 243 с.

5. Горовий Л. Ф. Список пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні / Л. Ф. Горовий / Карантин і захист рослин. – 2007. – № 2–3. – С. 85–92.

6. Засоби хімічні дезінфекційні та антисептичні. Основна бактерицидна активність: ДСТУ ЕН 1040 :2004 – К. : Держспоживстандарт України. – 2005. – 35 с.

7. Дудка И. А. Методы экспериментальной микологии / Дудка И. А., Вассер С. П., Элланская И. А. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПОЛЫНИ ГОРЬКОЙ (*Artemisia absinthium*)

Е. М. ПОПОВА, М. А. КУЙБИДА, В. О. ПРИЛИПКО

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Рассмотрено методы определения фунгицидной активности препаратов различного происхождения. Выбрано наиболее целесообразный метод определения фунгицидной активности. Исследованы методы с использованием фунгицида биологического и химического происхождения. В качестве фунгицидных препаратов было избрано медный купорос и экстракт полыни горькой (*Artemisia absinthium*).*

Ключевые слова: *фунгицидная активность, метод определения, фенольные соединения, полынь горькая (*Artemisia absinthium*), сульфат меди, *Fusarium oxysporum*.*

IMPROVING CONDITIONS DEFINITIONS ACTIVITY ANTIFUNGAL PHENOLIC COMPOUNDS WORMWOOD (*Artemisia absinthium*)

E. M. POPOVA, M. A. KUIBIDA, V. A. PRILIPKO

National Aviation University, Kyiv

*The methods of determining the fungicidal activity of drugs of different provenance. Chosen most sensitive method for determining the fungicidal activity. Methods of using the fungicide biological and chemical provenance. As fungicidal agents was elected copper sulfate and extract of wormwood (*Artemisia absinthium*).*

Keywords: *fungicidal activity method for determining, phenolic substances, wormwood, copper sulphate, *Fusarium oxysporum*.*