

УДК 547.541.52.77+631.461.4.5.

СИНТЕЗ И ВЛИЯНИЕ N-1,2,4-ТРИАЗОЛИДА И N-ИНДОЛИДА ТОЛУОЛСУЛЬФОКИСЛОТЫ НА ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ¹

© 2007 З.П. Белоусова, Н.А. Кленова²

Анализировали влияние синтезированных N-1,2,4-триазида и N-индолида толуолсульфокислоты на почвенную микробиоту в концентрациях 100-200 мкг/мл в 5% изопропиловом спирте. В качестве объектов для проведения тестирования выбраны азотфиксаторы *Clostridium pasteurianum* и *Pseudomonas* и *Micrococcus*, осуществляющих нитратное дыхание. Оба соединения в концентрации 200 мг/л оказывали выраженный бактерицидный эффект, почти полностью подавляя рост изученных групп почвенных микроорганизмов. В концентрации 100 мг/л N-1,2,4-триазида толуолсульфокислоты незначительно стимулировал рост азотфиксаторов.

Введение

Защита природных ресурсов от загрязнений антропогенного происхождения является актуальной проблемой современности. В настоящее время широко используются химические средства защиты растений от вредителей. Однако пестициды, вносимые в почву человеком, оказывают повреждающее воздействие на фитоценозы, снижают видовое разнообразие и численность полезных насекомых и птиц, а в конечном итоге представляют опасность и для человека. Большинство пестицидов при промышленном применении оказывают негативное воздействие на комплекс почвенных микроорганизмов, что приводит к снижению плодородия и увеличению затрат, поэтому пестициды нового поколения должны быть безопасны для почвенных микроорганизмов [4].

Производные триазола широко применяют в сельском хозяйстве от поражения растений различного рода грибов-патогенов. Азацен и типт обладают высокой избирательностью, т.к. проникают, главным образом, в клетки грибов, а не растений, вмешиваются в процесс образования плазматических мембран грибов (повышается текучесть этих мембран и даже происходит их разрушение). Изби-

¹ Статья представлена доктором биологических наук, профессором О.Н. Макуриной.

² Белоусова Зоя Петровна, кафедра органической химии; Кленова Наталья Анатольевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 433011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

рательный гербицид 3-амино-1H-1,2,4-триазол (амитрол, амизол) блокирует синтез хлорофилла и относится к веществам, ингибирующим функции митохондрий: окислительное фосфорилирование, фотосинтез и фотофосфорилирование [1]. Индолиды масляной и уксусной кислот известны как эффективные стимуляторы ростовых процессов корневой системы, другие его производные проявляют как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на ростовые процессы [2].

Целью настоящего исследования является синтез N-триазолида (I) и N-индолида (II) толуолсульфокислоты и изучение их влияния на почвенные микроорганизмы.

Экспериментальная химическая часть

Упаривание всех растворов проводили в вакууме при температуре не выше 40°C. Хроматографическую подвижность определяли в системе толуол: хлороформ: метанол (5:2:1). ИК-спектры снимали на приборе Spectromom-2000 (Венгрия) в вазелиновом масле. Температуру плавления определяли на приборе ПТП завода «Химлаборприбор». Соединения (I) и (II) были синтезированы по следующим схемам:

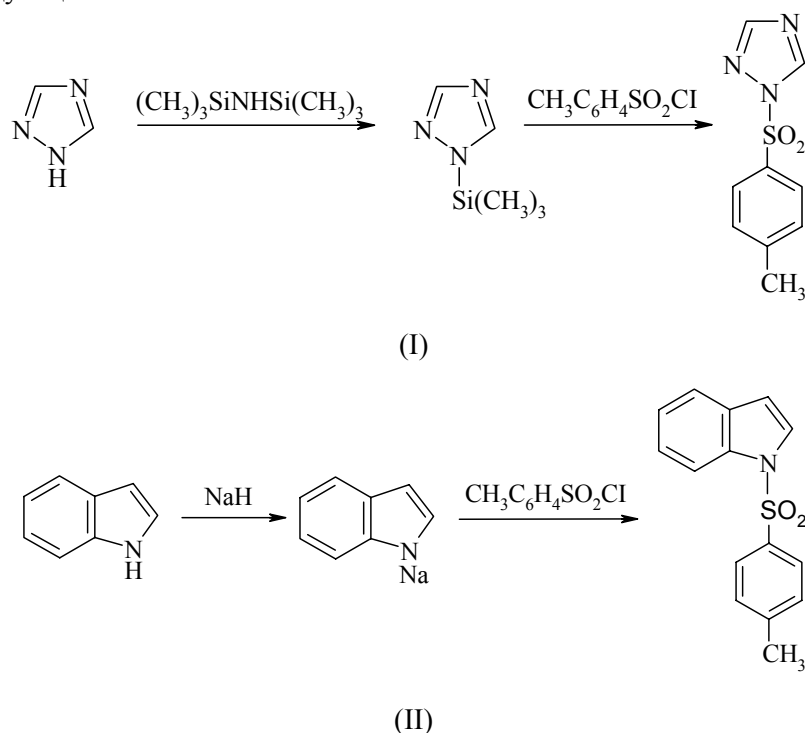


Рис. 1. N-триметилсилилтриазол синтезировали согласно методике [6].

Синтез 1,2,4-триазолида толуолсульфокислоты (I). К охлажденному до -10°C раствору 2 г (0,014 моль) N-триметилсилил-1,2,4-триазола в 10 мл безводного тетрагидрофурана прикапывали при перемешивании 3,37 г (0,017 моль)

хлорангидрида толуолсульфокислоты, растворенные в 5 мл безводного тетрагидрофурана. Перемешивание продолжали в течение 3 час. Полученную реакционную смесь с выпавшим в ходе реакции осадком упаривали досуха в вакууме. После перекристаллизации из метанола получили 3,6 г (0,014 моль) продукта (I) в виде кристаллов светло-желтого цвета. Чистоту и структуру (I) подтверждали методом элементного анализа, температурой плавления, данными ТСХ, ИК-спектроскопии (табл. 1).

Индолид толуолсульфокислоты (II) Смесь 2 г (0,017 моль) индола, 17 мл дихлорэтана, 0,8 г (0,020 моль) гидрида натрия перемешивали в течение 20 мин на магнитной мешалке. Затем добавили 2 г (0,010 моль) хлорангидрида толуолсульфокислоты и продолжили перемешивание смеси еще 25 мин, пока индол не перестал обнаруживаться по данным ТСХ. После чего раствор промывали водой и высушивали сульфатом натрия. Раствор упаривали в вакууме. Выпавшие кристаллы отфильтровали и высушили. Структуру полученного соединения в количестве 3,9 г (0,014 моль) подтверждали методом элементного анализа, температурой плавления, данными ТСХ, ИК-спектроскопии (табл. 1).

Таблица 1

Физико-химические характеристики (I) и (II)

Соединение	Выход (%)	Т.пл. (°C)	R _f	ИК-спектр (см ⁻¹)	Данные элементного анализа (%)	
					Вычислено	Найдено
I	80,5	70	0,86	1380, 1170 (-SO ₂ -N<)	C 48,43 H 4,04 N 18,83 O 14,35 S 14,35	C 48,23 H 3,86 N 19,08 O 14,95 S 13,88
II	84,5	77-78	0,55	1360, 1185 (-SO ₂ -N<)	C 66,42 H 4,79 N 11,81 O 11,81 S 5,17	C 66,38 H 4,58 N 11,92 O 12,02 S 5,10

Экспериментальная биологическая часть

Материалы и методы

Почвенные образцы были отобраны по стандартной методике в июле 2003 г на окраине г. Самары. Собранные образцы хранились в бумажных пакетах при температуре 0-+5°C и влажности 60%. В качестве объектов для проведения тестирования были выбраны две группы почвенных микроорганизмов, участвующих в азотистом обмене. Это свободноживущие азотфиксаторы *Clostridium pasterianum*

и группа микроорганизмов, относящихся к родам *Pseudomonas* и *Micrococcus*, осуществляющих нитратное дыхание (денитрификацию). Приготовление почвенной суспензии для посева накопительных культур проводили по стандартной методике [3]. Посев осуществляли на высокоселективные среды: для азотфиксаторов использовалась среда Виноградского, а для денитрификаторов – среда Гильтая [4]. Перед внесением исследуемых соединений в среду культивирования их растворяли в 5% изопропиловом спирте, воздействующие концентрации составили 100-200 мг на 1 л среды (100-200 мкг/мл). В контрольные пробы вносили растворитель в том же объеме. Пробы выращивали при температуре 30°C в течение 72 час и колориметрировали при длине волны 600 нм, толщина кюветы 0,5 см. Результаты выражали в условных единицах: ОП×100. Для идентификации *Cl.pasteurianum* проводили окраску гранулезы [5]. Идентификацию *Pseudomonas* и *Micrococcus* осуществляли по морфологическим признакам, используя окраску по Граму [5].

Результаты и их обсуждение

Под действием (I) наблюдали дозозависимое снижение интенсивности роста денитрификаторов (57% и 30,5% от контроля) (табл. 2). У свободноживущих азотфиксаторов концентрация 100 мкг/мл (I) способствовала небольшой стимуляции роста (119 %), а увеличение концентрации вдвое сопровождалось угнетением роста 22,5% от контроля).

Таблица 2

Интенсивность роста денитрификаторов (*p.Pseudomonas*, *p.Micrococcus*) и азотфиксаторов (*p.Clostridium*) при действии (I) и (II) (n=20)

Состав растворов исследованных соединений	Интенсивность роста, у.е., 72 часа инкубации Денитрификаторы	Интенсивность роста, у.е., 72 часа инкубации Азотфиксаторы
Контроль, 1% изопропанол	16,55± 0,63	20,78± 0,85
100 г/л (I) в 1% изопропанол	9,45± 0,63 P<0,001	24,67± 0,87 P<0,001
200 мг/л (I) в 1% изопропанол	5,05± 0,50 P<0,001	4,07± 0,17 P<0,001
Контроль, 1% изопропанол	23,00 ± 1,72	58,65± 1,25
100 мг/л (II) в 1 % изопропанол	15,58± 0,62 P<0,001	34,30 ± 1,27 P<0,001
200 мг/л (II) в 1 % изопропанол	5,16± 0,90 P<0,001	9,15 ± 0,67 P<0,001

(II) в концентрации 100 мкг/мл снижал интенсивность роста денитрофикаторов на 32,3% и в концентрации 200 мкг/мл – на 77,6% (табл. 2). Через 72 час инкубации накопительной культуры азотфиксаторов интенсивность роста уменьшалась под действием 100 мкг/мл (II) на 41,5%, 200 мкг/мл – на 84%.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали наличие высокой биологической активности у полученных производных толуолсульфоокислоты. Как N-индолид-, так и N-триазилид толуолсульфоокислоты в концентрации 200 мг/л оказывали выраженный бактерицидный эффект, почти полностью подавляя рост изученных групп почвенных микроорганизмов. Это может быть обусловлено ингибированием процессов синтеза ДНК, компонентов клеточных стенок бактерий, поскольку подобное действие известно для триазола, индола и их производных [4]. Полученные данные свидетельствуют о том, что незначительное накопление индолида толуолсульфоокислоты (II) в почве может сопровождаться небольшим уменьшением плодородия почвы, так как рост азотфиксаторов тормозится в большей степени, чем рост денитрификаторов (табл. 2). Триазилид толуолсульфоокислоты (I) в меньшей концентрации угнетает рост денитрификаторов более, чем на 40%, тогда как рост азотфиксаторов достоверно, хоть и незначительно стимулируется. Возможно, использование триазолсодержащих производных и других сульфокислот в качестве пестицидов, будет в меньшей степени способствовать снижению плодородия почв.

Литература

- [1] Альберт, А. Избирательная токсичность / А. Альберт. – М.: Медицина, 1989. – 250 с.
- [2] Белоусова, З.П. Генотоксичность производных индола // Вестник СамГУ. – 2004. – Естественнонаучная серия. Второй специальный выпуск. – С. 106-113.
- [3] Саратиков, А.С. Токсиколого-генетическая оценка 1,2,4-триазола с целью гигиенического нормирования в воде водоемов / А.С. Саратиков, Е.М. Трофимович, Т.П. Новожеева // Гигиена и санитария. – 1986. – №11. – С. 65-66.
- [4] Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Колос, 1972. – 200 с.
- [5] Шишов, Л.Л. Критерии и модели плодородия почв / Л.Л. Шишов, И.И. Карманов, Д.Н. Дурманов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 184 с.
- [6] L. Birkofer L., Gilgenberg W., Ritter A. Angew. Chem., Bd.73, s.143 (1961).

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

SYNTHESIS AND EFFECT OF N-1,2,4-TRIAZOLID AND N-INDOLID OF TOLUENE SULFONIC ACID ON SOIL MICROORGANISMS²

© 2007 Z.P. Belousova, N.A. Klenova³

The effect of synthesized N-1,2,4-triazolid and N-indolid of toluene sulfonic acid *on a soil microbiota* in concentrations of 100-200 mkg /ml in 5 % isopropanol are analyzed. *Nitrogen fixers Clostridium pasterianum, Pseudomonas and Micrococcus*, exercising nitrate respiration are chosen as objects for carrying out the tests. Both connections in concentration of 200 mg/l rendered the expressed bactericidal effect, almost completely suppressing growth of the studied groups of soil microorganisms. In concentration of 100 mg/l the N-1,2,4-triazolid of toluene sulfonic acid is insignificantly stimulated with growth of nitrogen fixers.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

² Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Macurina.

³ Belousova Zoya Petrovna, Klenova Nataliya Anatolievna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 433011, Russia.