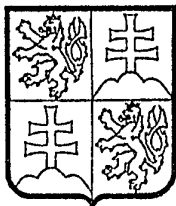


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 634

(21) Číslo přihlášky : 5693-89.B

(22) Přihlášeno : 09 10 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :
A 01 N 43/78

(40) Zveřejněno : 11 04 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

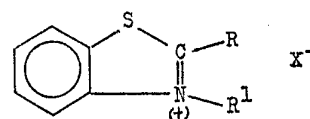
(73) Majitel patentu : UNIVERZITA KOMENSKÉHO, BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : MITTERHAUSZEROVÁ ĽUDMILA ing.CSc.,
KRAČOVÁ KATARÍNA RNDr.CSc.,
SUTORIS VIKTOR prof.RNDr.CSc.,
HALGAŠ JÁN RNDr.CSc., BRATISLAVA

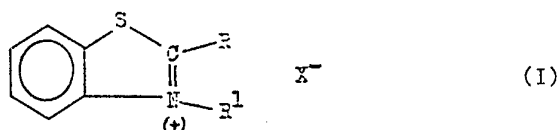
(54) Název vynálezu : Prostriedok s regulačnou účinnosťou
na rast rias a syntézu chlorofylu

(57) Anotace :

Riešenie sa týka prostriedku s regulačnou účinnosťou na rast a syntézu chlorofylu zelených rias. Prostriedok pozostáva z roztoku 2-R-3-R¹benzotiazoliovéj soli všeobecného vzorca I, kde R je vodík, metyltio, etoxykarbonylmetyltio; R¹ je vodík, metyl, benzyl, alyl, metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, propoxykarbonylmetyl, izopropoxykarbonylmetyl; X⁻ je bromidová, jodidová, sulfátová, metosulfátová skupina. Zlúčeniny obecného vzorca I pôsobia inhibične na rast a syntézu chlorofylu rias pri koncentráciách v kultivačnom médiu 5,3 mg.dm⁻³ a vyšších. Benzotiazoliové soli u ktorých R¹ je alkoxykarbonylmetyl, tiež derivát u ktorého R je etoxykarbonylmetyltio, pôsobia stimulačne na rast a syntézu chlorofylu rias v koncentračnom rozmedzí 3,2 mg.dm⁻³ až 0,03 ng.dm⁻³.



Vynález sa týka prostriedku s regulačnou účinnosťou na rast a syntézu chlorofylu zelených rias, ktorý pozostáva z roztoku benzotiazoliovkej soli všeobecného vzorca I



kde R je vodík, metyltio, etoxykarbonylmetyltio;

R¹ je vodík, metyl, benzyl, alyl, metoxykarbonylmetyl, etoxykarbonylmetyl, propoxykarbonylmetyl, izopropoxykarbonylmetyl;

X⁻ je bromidová, jodidová, sulfátová, metosulfátová skupina.

Benzotiazoliová sol môže byť v roztoku organických rozpúšťadiel ako dimetylsulfoxid, metylalkohol, trietyléngylkol, N,N'-dimetylformamid, výhodne však možno použiť vodný roztok.

Benzotiazoliové soli obecného vzorca I pôsobia inhibične na rast a syntézu chlorofylu zelených rias pri koncentráciách v kultivačnom médiu 5,3 mg.dm⁻³ a vyšších. Pri týchto koncentráciách spôsobujú tiež fotodegradáciu chlorofylu v izolovaných rastlinných chloroplastoch. Deriváty u ktorých R¹ je alkoxykarbonylmetyl a tiež derivát u ktorého R je alkoxykarbonylmetyltio, pôsobia stimulačne na rast a syntézu chlorofylu zelených rias v koncentračnom rozmedzí 3,2 mg.dm⁻³ až 0,03 mg.dm⁻³.

Niektoré benzotiazoliové soli sú účinné ako regulátory rastu rastlín (Sutoris V., Halgaš J., Sekerka V.: čs. autorské osvedčenia č. 225008, 223426, 231212, 231229, 233443; Sutoris V., Gáplovský A., Sekerka V.: Chem.Papers 40 (1) 103, 1986), príp. pôsobia špecificky na zvyšovanie obsahu cukrov v rastlinách produkujúcich cukor (Sutoris V., Sekerka V., Halgaš J., Bajči P., Konečný V., Varkonda Š.: čs. autorské osvedčenie č. 237706). U benzotiazoliových solí sa zistila antimikróbná účinnosť na G⁺ baktérie skupiny Staphylococcus (Sutoris V., Foltínová P., Halgaš J.: čs. autorské osvedčenie č. 237709) ako aj antifungálna účinnosť (Sutoris V., Halgaš J., Sekerka V., Foltínová A., Gáplovský A.: Chem.Zvesti 37, 653-662, 1983).

Inhibičná účinnosť zlúčenín obecného vzorca I na riasy sa testovala stacionárnou kultiváciou synchronnej kultúry Chlorella vulgaris. Hodnotil sa nárast buniek rias a obsah syntetizovaného chlorofylu. Inhibičná účinnosť týchto zlúčenín je vyjadrená faktorom IC₅₀, ktorý predstavuje takú koncentráciu danej benzotiazoliovkej soli v kultivačnom médiu rias, ktorá spôsobí 50%nú inhibíciu rastu, resp. syntézy chlorofylu, vzhľadom na kontrolné vzorky rias.

Regulačná účinnosť na rast a syntézu chlorofylu rias Chlorella vulgaris sa sledovala na nasledujúcich derivátoch benzotiazoliových solí:

1. 3-metylbenzotiazoliumjodid
2. 3-alylbenzotiazoliumbromid
3. 3-benzylbenzotiazoliumbromid
4. 2-metyltio-3-metylbenzotiazoliummetosulfát
5. 2-metyltio-3-metylbenzotiazoliumjodid
6. benzotiazoliumsulfát
7. 3-metoxycarbonylmetylbenzotiazoliumbromid
8. 3-etoxycarbonylmetylbenzotiazoliumbromid
9. 3-propoxycarbonylmetylbenzotiazoliumbromid
10. 3-izopropoxycarbonylmetylbenzotiazoliumbromid
11. 2-etoxycarbonylmetyltio-3-metylbenzotiazoliumbromid

Zistené hodnoty IC_{50} zlúčenín obecného vzorca I sú uvedené v tab. 1. Pre porovnanie uzáďame, že inhibičná účinnosť 2-merkaptobenzotiazolu, stanovená tou istou metódou a vyjadrená faktorom IC_{50} je $68,4 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pre syntézu chlorofylu rias a $80,4 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pre rast rias. Ako vyplýva z hodnôt v tab. 1, inhibičná účinnosť 3-metylbenzotiazoliumjodidu a 3-allylbenzotiazoliumbromidu na riasy je vyššia ako štandardného 2-merkaptobenzotiazolu.

Stimulačná účinnosť benzotiazolivoých solí na rast a syntézu chlorofylu rias je uvedená v tab. 2.

T a b u ľ k a 1

Inhibičná účinnosť zlúčenín obecného vzorca I na riasy *Chlorella vulgaris*

Vzorka č.	R	R^1	X^-	$IC_{50} \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	
				syntézy chlorofylu	rastu rias
1	H	CH_3	I	37,0	54,0
2	H	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	Br	58,6	65,2
3	H	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Br	152	316
4	SCH_3	CH_3	CH_3SO_4	171	188
5	SCH_3	CH_3	I	160	182
6	H	H	HSO_4	598	776
7	H	$\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	Br	375	398
8	H	$\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	Br	288	344
9	H	$\text{CH}_2\text{COOC}_3\text{H}_7$	Br	261	273
10	H	$\text{CH}_2\text{COOC}_3\text{H}_7-i$	Br	293	365
11	$\text{SCH}_2\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5$	CH_3	Br	242	249

T a b u ľ k a 2

Stimulačná účinnosť zlúčenín podľa vynálezu na rast a syntézu chlorofylu rias *Chlorella vulgaris*, vyjadrená v percentách kontrolnej vzorky

Vzorka č.	% kontroly $\pm \sigma$ x/	
	Syntéza chlorofylu	Rast rias
7	$119,4 \pm 18,5$	$109,3 \pm 14,7$
8	$113,9 \pm 20,7$	$103,4 \pm 7,9$
9	$123,2 \pm 25,9$	$106,5 \pm 13,4$
10	$120,1 \pm 16,1$	$105,8 \pm 11,3$
11	$129,2 \pm 19,0$	$114,9 \pm 12,6$

x/ Priemery hodnôt v koncentračnom rozmedzí $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-15} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Regulačná účinnosť benzotiazoliových solí obecného vzorca I na riasy a rastliny je podrobnejšie demonštrovaná na príkladoch.

Príklad 1

Účinok zlúčenín podľa vynálezu na rast rias *Chlorella vulgaris* a obsah syntetizovaného chlorofylu

Riasy *Chlorella vulgaris* sa pestovali stacionárnou kultiváciou pri teplote $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pri svetelnom režime 16 hodín svetlo 8 hodín tma, v kultivačnom médiu podľa Šetlíka (Šetlík I.: Annual Report of Algolog. Lab. for 1967, 71-140, Třeboň 1968). K živnému médiu sa pridával roztok študovanej zlúčeniny v destilovanej vode takej koncentrácie, aby sa získala séria kultivačných baniek s odstupňovanou koncentráciou látky a odstupňovaným biologickým účinkom. Banky sa inokulovali presným objemom homogénnej suspenzie rias. Po 7-dennej kultivácii sa objem kultivačného média doplnil destilovanou vodou na pôvodný objem (vyrovnanie odparu vody) a v suspenzii buniek sa merala absorbancia pri 660 nm (úmerná množstvu buniek rias) a obsah chlorofylu po jeho extrakcii N,N'-dimetylformamidom z odcentrifugovaných buniek rias. Celkový obsah chlorofylu rias v kultivačnom médiu sa vyhodnotil podľa rovnice:

$\text{Chl (mg.dm}^{-3}) = 17,9 A_{647} + 8,08 A_{664,5}$; kde A je absorbancia vzorky pri 647 resp. 664,5 nm v 1 cm kvete (Inskeep W.P., Bloom P.R.: Plant Physiol. 77/2/, 483-5, 1985).

Získané hodnoty týchto parametrov sa porovnávali s hodnotami parametrov súčasne testovaných kontrolných vzoriek (vyhodnotené ako % kontroly). Na základe týchto hodnôt sa extrapoláciou vyčíslili koncentrácie študovaných zlúčenín, pri ktorých sa dosiahla 50%ná inhibícia (IC_{50}). V tab. 3 sú uvedené hodnoty regulačnej účinnosti 3-izopropoxykarbonylmetylbenzotiazoliumbromidu na rast a syntézu chlorofylu rias v závislosti od aplikovanej koncentrácie.

Hodnoty koncentrácie študovanej zlúčeniny, pri ktorej dochádza k 50%nej inhibícii rastu rias resp. syntézy chlorofylu sa stanovujú extrapoláciou zo závislosti zistených hodnôt inhibície od logaritmu aplikovanej koncentrácie študovanej zlúčeniny.

T a b u l k a 3

Regulačná účinnosť 3-izopropoxykarbonylmetylbenzotiazoliumbromidu na rast a syntézu chlorofylu rias *Chlorella vulgaris*

Koncentrácia	% kontroly $\pm \sigma$	
	Obsah chlorofylu	Rast rias
$1 \cdot 10^{-3}$	0	$8,2 \pm 0,1$
$5 \cdot 10^{-4}$	0	$22,6 \pm 0,4$
$3 \cdot 10^{-4}$	$47,6 \pm 3,5$	$66,0 \pm 0,4$
$2 \cdot 10^{-4}$	$53,5 \pm 3,6$	$72,0 \pm 0,1$
$1 \cdot 10^{-4}$	$96,0 \pm 2,6$	$93,8 \pm 4,7$
$1 \cdot 10^{-5}$	$117,7 \pm 20,3$	$102,3 \pm 12,5$
$1 \cdot 10^{-7}$	$128,7 \pm 12,0$	$108,3 \pm 11,1$
$1 \cdot 10^{-9}$	$122,5 \pm 17,8$	$109,5 \pm 11,3$
$1 \cdot 10^{-11}$	$130,5 \pm 2,1$	$118,6 \pm 1,8$
$1 \cdot 10^{-13}$	$110,1 \pm 14,7$	$103,2 \pm 8,2$

Príklad 2

Vplyv benzotiazoliových solí na fotodegradáciu chlorofylu v preparátoch chloroplastov

K preparátu chloroplastov pripravených zo špenátu za použitia tlmivého roztoku TRIS ($2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; pH 7,0) a sacharózy ($0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) sa pridal vodný roztok benzotiazoliových solí a vzorky sa po zhomogenizovaní ožiarovali neónovým svietidlom 4 hodiny. Pôvodný obsah chlorofylu v neožiarených vzorkách bol $23 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Potom sa ožiarené vzorky zriedili acetónom v pomere 4 : 1 a spektrofotometricky sa stanovoval pokles absorbančie chlorofylu pri vlnovej dĺžke 664,5 nm vzhľadom na absorbanciu neožiarenej kontrolnej vzorky. Pri testovaných koncentráciách benzotiazoliových solí ($1 \cdot 10^{-2}$ až $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) sa zaznamenalo výrazné zvýšenie fotodegradácie chlorofylu. Analogické zvýšenie fotodegradácie rastlinných pigmentov (chlorofyl, karotén) účinkom vyšších koncentrácií benzotiazoliových solí sa stanovilo v roztokoch N,N'-dimetylformamidu. V tabuľke 4 sú uvedené hodnoty ovplyvnenia absorbančie chlorofylu pri vlnovej dĺžke 664,5 nm v preparáte chloroplastov 3-etoxykarbonylmethylbenzotiazóliumbromidom po 4-hodinovom ožiarení vzoriek.

T a b u ľ k a 4

Ovplyvnenie absorbančie chlorofylu pri vlnovej dĺžke 664,5 nm v preparáte chloroplastov špenátu 3-etoxykarbonylmethylbenzotiazóliumbromidom po 4-hodinovom ožiarení vzoriek (pôvodný obsah chlorofylu vo vzorkách bol $24 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Koncentrácia $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	% Pôvodnej absorbančie chlorofylu
0 (kontrola)	63,3
$1 \cdot 10^{-2}$	15,8
$5 \cdot 10^{-3}$	19,7
$1 \cdot 10^{-3}$	26,0
$5 \cdot 10^{-4}$	30,7
$2 \cdot 10^{-4}$	40,9
$1 \cdot 10^{-4}$	43,5
$5 \cdot 10^{-5}$	49,2
$1 \cdot 10^{-5}$	63,2

Príklad 3

Vplyv benzotiazoliových solí na nárast čerstvej hmoty a obsah chlorofylu v nadzemnej časti kukurice

Pri testovaní nárastu čerstvej hmoty, ako aj obsahu syntetizovaného chlorofylu v nadzemnej časti kukurice sa kukuričné semená predkličovali za tmy vo válcoch stočeného filtračného papiera, navlhčeného destilovanou vodou po dobu 3 dní. Potom sa klíčence vložili do hydropónií obsahujúcich vodné roztoky benzotiazoliových solí o koncentráciách $1 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a umiestnili sa do kultivačného boxu s režimom osvetlenia 14 hodín svetlo, 10 hodín tma. Po 6 dňoch kultivácie pri izbovej teplote sa stanovila hmotnosť zelenej časti klíčencov a obsahu chlorofylu.

Pri testovaných koncentráciách benzotiazoliových solí sa zaznamenal stimulačný účinok ako na nárast čerstvej hmoty, tak aj na obsah syntetizovaného chlorofylu v nadzemnej časti kukurice. V tabuľke 5 sú uvedené stimulačné účinnosti 3-metoxycarbonylmethylbenzotiazóliumbromidu a 3-metylbenzotiazóliumjodidu na nárast čerstvej hmoty a obsah syntetizovaného chlorofylu v nadzemnej časti kukurice.

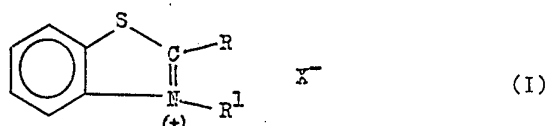
T a b u l k a 5

Stimulačná účinnosť 3-metoxycarbonylmetylbenzotiazoliumbromidu a 3-metylbenzotiazoliumjodidu na nárast čerstvej hmoty a obsah syntetizovaného chlorofylu v nadzemnej časti kukurice

Vzorka č.	Koncentrácia mól.dm ⁻³	% Kontroly $\pm$ I.S. _{0,05}	
		Obsah chlorofylu	Hmotnosť stebiel
7	0 (kontrola)	100,0 $\pm$ 5,1	100,0 $\pm$ 5,4
	1.10 ⁻⁵	109,2 $\pm$ 5,8	98,6 $\pm$ 3,4
	1.10 ⁻⁶	110,7 $\pm$ 0,7	113,0 $\pm$ 4,2
	1.10 ⁻⁸	111,2 $\pm$ 6,5	107,5 $\pm$ 2,2
	1.10 ⁻¹⁰	102,3 $\pm$ 1,1	111,7 $\pm$ 1,3
1	1.10 ⁻⁵	115,5 $\pm$ 6,4	108,9 $\pm$ 8,2
	1.10 ⁻⁸	117,0 $\pm$ 5,6	115,1 $\pm$ 2,6
	1.10 ⁻¹¹	120,4 $\pm$ 3,8	133,9 $\pm$ 2,5

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Prostriedok s regulačnou účinnosťou na rast rias a syntézu chlorofylu, vyznačujúci sa tým, že ako účinnú látku obsahuje 2-R-3-R¹ benzotiazoliovú sol všeobecného vzorca I



kde R je vodík, metyltio, etoxykarbonylmetyltio;

R¹ je vodík, metyl, benzyl, alyl, metoxykarbonylmetyl,
etoxycarbonylmetyl, propoxykarbonylmetyl, izopropoxykarbonylmetyl;

X⁻ je bromidová, jodidová, sulfátová, metosulfátová skupina.

2. Prostriedok podľa bodu 1 s antialgálnou účinnosťou, vyznačujúci sa tým, že koncentrácia účinnej látky je 5,3 mg.dm⁻³ alebo vyššia.
3. Prostriedok podľa bodu 1 s rastovo stimulačnou účinnosťou na rast rias a syntézu chlorofylu, vyznačujúci sa tým, že koncentrácia účinnej látky je v rozmedzí 3,2 mg.dm⁻³ až 0,03 ng.dm⁻³, pričom R znamená etoxykarbonylmetyltioskupinu.