

УДК 577.182.75:577.182.6:632.955

АНТИНЕМАТОДНЫЕ СВОЙСТВА *STREPTOMYCES AVERMITILIS* УКМ АС-2179 И ЕГО АВЕРМЕКТИНОВОГО КОМПЛЕКСА - АВЕРКОМА

Л. БЕЛЯВСКАЯ¹, Т. ГАЛАГАН², Е. БОЛТОВСКАЯ²,
В. КОЗЫРИЦКАЯ¹, Е. ВАЛАГУРОВА¹, Д. СИГАРЕВА,² Г. ИУТИНСКАЯ¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

²Институт защиты растений УААН

Abstract. Avermectin complex of *Streptomyces Avermitilis* UKM AC-2179 (Named Avercom) showed the high nematicidal activity against plants parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* in the in vitro system: LD₅₀ is 2,0 mkg/ml in 30 min. Abundance of plants parasitic nematodes in spring at wheat rhizosphere decreased in the presence of avercom and *Streptomyces avermitilis* by 90 and 93% respectively. For the first time, it was established, that plants' growth regulators (emistim C and biolan) intensify avercom nematicidal action.

Key words: Avercom, Nematicidal efficiency, Phytonematodes, Plants' growth regulators, *Streptomyces avermitilis*.

ВВЕДЕНИЕ

Интегрированная система защиты растений от вредителей и болезней предусматривает использование устойчивых сортов и гибридов, севооборотов, удаление растительных остатков, пропаривание почвы и т.п., а также обязательное применение средств защиты, среди которых традиционно доминируют химические препараты. Однако в последние годы, в соответствии с требованиями токсикологической безопасности к продукции растениеводства, активно развивается рынок биопрепаратов антипаразитарного и фитостимулирующего действия, созданных на основе живых культур микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности (К. Дятлова, 2001). При этом следует отметить, что биологические препараты по сравнению с химическими более безопасны с санитарно-гигиенической и экологической точек зрения. Они быстрее разлагаются в окружающей среде, не накапливаются в почве, воде и растениях, активнее включаются в круговорот веществ в природе.

В последние десятилетия в практику сельского хозяйства внедряются препараты, созданные на основе макролидного антибиотика авермектина - продукта метаболизма почвенного стрептомицета *Streptomyces avermitilis* (R. Burg et al., 1979). На его основе создано ряд препаратов, которые применяют как биопестициды для регуляции численности экзо- и эндопаразитов растений, в том числе и нематод (S. Ostlind, R. Long, 1979; I. Putter et al., 1981; W. Campbell, 1989). Такие препараты, как изоверм, аверсект, вертимек, рустомектин, ивомек показали высокую эффективность в защите растений от галловых нематод в условиях закрытого грунта (Г. Иутинская, 2007).

Сотрудниками Института микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины выделен штамм стрептомицета, способный синтезировать авермектин (В. Ісаєнко та інш., 1999). Селекционирован высокопродуктивный вариант *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, на основе которого разработан авермектинсодержащий препарат - аверком. (Т. Петрук та інш., 2004).

В последние годы в практику сельского хозяйства широко внедряются регуляторы роста растений (РРР), которые характеризуются значительным фитостимулирующим эффектом. Обычно их применяют вместе с пестицидами или биологическими препаратами (Регулятори росту в рослинництві, рекомендації по застосуванню, 2007). Вопрос применения авермектинсодержащих препаратов вместе РРР является мало изученным.

Поэтому цель нашей работы заключалась в определении нематоцидной активности аверкома, изучении влияния на нее регуляторов роста растений в системах *in vitro*, а также в исследовании действия продуцента, аверкома отдельно и в комбинации с *Bacillus megaterium* и *Azotobacter chroococcum* на комплекс паразитических нематод ризосферы пшеницы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе был использован селекционированный ранее нами штамм *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (Т. Петрук та інш., 2004), на основе которого создан аверком - новый препарат биологического происхождения, содержащий кроме антипаразитарного антибиотика авермектина, биологически активные вещества - аминокислоты, витамины, фосфолипиды, стерины, жирные кислоты, фитогормоны (L. Biliavska, 2007). Культуру стрептомицета выращивали в жидкой соевой среде при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Комплексный препарат аверком получали из мицелия продуцента путем экстракции этанолом. Азотфиксирующие *Azotobacter chroococcum* УКМ В-6003 и фосфатмобилизирующие *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 бактерии получены из коллекции отдела общей и почвенной микробиологии ИМВ НАНУ. В опытах были использованы регуляторы роста растений эместим С, биолан, разработанные в МНТЦ «Агробиотех» (Регулятори росту в рослинництві, рекомендації та застосування, 2007).

Нематологические исследования проводили в лаборатории нематологии Института защиты растений Украинской академии аграрных наук. Изучение нематоцидного действия в системах *in vitro* проводили по методике Чижова и др. (В. Дриняев et al., 1994). В опытах по определению действия регуляторов роста растений (РРР) на нематоцидное действие аверкома был использован эместим С и биолан в разведении $1 \cdot 10^{-5}$. Наблюдения проводили при температуре $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ в течении 4 часов с интервалом 0,5 ч.

Изучение влияния *S. avermitilis*, аверкома отдельно и в композиции с агрономически важными микроорганизмами на природный комплекс паразитических нематод ризосферы пшеницы сорта Коллективная 3 проводили в вегетационном опыте по методике описанной Л. Белявской (2008). Схема опыта: 1-контроль без обработки; 2- аверком (Ave) в концентрации 2,0 мкг/мл; 3- *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 (7-суточная культура) с титром клеток $1 \cdot 10^6$ в 1 мл; 4 – *A. chroococcum* УКМ В-6003 (5-суточная культура) с титром клеток $1 \cdot 10^6$ в 1 мл + *B. megaterium* УКМ В-5724 (односуточная культура) с титром клеток $1 \cdot 10^6$ в 1 мл; 5 - *A. chroococcum* + *B. megaterium* + аверком. Черноземная почва для опыта была отобрана на полях пшеницы, где у растений наблюдались симптомы нематоидозов, и любезно предоставлена нам руководством Частного Института Radostim (Германия).

Эффективность нематоцидного действия аверкома и его композиций с агрономически важными микроорганизмами определяли в процентах снижения численности паразитических нематод в опытных вариантах по отношению к контролю. В течение периода вегетации растений определяли биометрические показатели их развития.

Все исследования проводили в 3-х кратной повторности.

Расчеты и статистическую обработку данных выполняли с использованием компьютерных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущие исследования показали способность авермектинового комплекса *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 в концентрациях 1,25 и 2,0 мкг/мл вызывать *in vitro* гибель 93-100 % нематод в течение 3-4 часов. LD_{50} аверкома составила 2,0 мкг/мл при условиях: 0,5 часа экспозиции, рН 7,0, температура $+28^\circ\text{C}$ (В. Козирицька та ін., 2007).

При изучении нематоцидной активности аверкома и его композиций с биоланом и эместимом С в схему опыта были также включены варианты, которые позволили оценить способность самих РРР подавлять подвижность нематод (табл.1). Установлено, что аверком в первые 0,5 часа эксперимента в концентрации 2 мкг/мл вызывает гибель 50% нематод, а через 2 часа - 98%. Сами же РРР подавляли подвижность нематод в первый час действия. С течением времени процент неподвижных организмов уменьшался до 33,3% в присутствии биолана и до 3,0 % - в варианте с эместимом С.

После 2-х часов культивирования ингибирующее действие РРР на нематоды постепенно снижалось, следовательно, они проявляют лишь определенное нематостатическое действие. В то же время, РРР способны усиливать нематоцидное действие аверкома. Аверком вместе с биоланом и эместимом С уже через 0,5 ч проявил 100%-ное нематоцидное действие. Таким образом, впервые показано, что стимуляторы роста растений (биолан и эместим С) усиливают нематоцидное действие аверкома.

Таблица 1

Антинематодная активность (*in vitro*) аверкома и регуляторов роста растений

Препараты	Гибель нематод, % от начального количества				
	Продолжительность культивирования, ч				
	0,5	1	2	3	4
Контроль (без препаратов)	0	0	0	0	0
Аверком, 2 мкг/мл	50,0	73	98	100	100
Эмистим С, $1 \cdot 10^{-5}$	62,5	14,2	7,0	3,0	3,4
Биолан, $1 \cdot 10^{-5}$	58,7	55,0	41,7	35,0	33,3
Биолан + Аверком (1:1)	100	100	100	100	100
Эмистим С + Аверком (1:1)	100	100	100	100	100

Для суммарной оценки эффективности использования аверкома и штамма - продуцента было важно определить его действие на комплекс паразитических нематод, которые обычно населяют почвы в полевых условиях. Нематологический анализ исследуемой почвы, показал, что группа фитогельминтов представлена в нем 2 видами эндопаразитов (*Pratylenchus pratensis*, *Ditylenchus dipsaci*) и 3 - экзопаразитов (*Tylenchobrynychus dubius*, *Helicotylenchus dihystra*, *Paratylenchus nanus*). Причем численность группы в целом, в частности видов *Pr. pratensis* и *T. dubius* значительно превышала известные пределы вредоносности (Д. Сігарьова та інш., 2004).

Пробная санация почвы путем обработки аверкомом показала эффективность его внесения за 2 часа до посадки семян: общая численность фитонематод в почве уменьшилась в 4 раза, количество *Tylenchobrynychus dubius* - в 2,8 раза. Наиболее чувствительными к препарату оказались представители *Pratylenchus pratensis*, обработка аверкомом вызывала их полную гибель (табл. 2).

Таблица 2

Численность нематод в почве

Варианты	Фитогельминты, особей в 100 см ³ почвы		
	Всего	в том числе	
		<i>Pr. Pratensis</i>	<i>T. dubius</i>
Контроль (без обработки)	584	128	456
Аверком 2 мкг/мл перед посадкой	375	0	375
Аверком 2 мкг/мл за 2 суток перед посадкой	135	0	135
Пределы вредоносности для фитогельминтов	33-479	18-33	11-154

Как мы уже отмечали, в последнее время большое внимание уделяют препаратам комплексного действия на основе нескольких микроорганизмов с разными свойствами. Поэтому мы считали целесообразным исследовать также нематоцидную эффективность использования аверкома отдельно и совместно с агрономически важными микроорганизмами в вегетационном опыте.

В естественно инфицированную нематодами почву высаживали семена пшеницы сорта Коллективная 3, которые были обработаны аверкомом, культурой продуцента или азотфиксирующими и фосфатмобилизирующими бактериями вместе с аверкомом. После выращивания в течение 20 суток пшеницы был проведен учет нематод. Поскольку в производственных условиях присутствие в ризосфере растений нескольких видов паразитических нематод одновременно обычное явление, то оценивали влияние продуцента, аверкома отдельно и совместно с агрономически важными микроорганизмами на общую численность фитогельминтов.

В опытных вариантах наблюдали снижение численности паразитирующих фитонематод (*D. dipsaci*, *Pr. pratensis*, *T. dubius*, *H. dihystra*, *P. nanus*). Так, при обработке *A. chroococcum* + *B. megaterium* численность нематод сравнительно с контролем снижалась на 88%, а при применении отдельно аверкома и культуры стрептомицета - на 90-93% (табл. 3). Значительное

снижение количества нематод во всех вариантах опыта связано не только с антипаразитарным действием *S. avermitilis* и аверкома, но и с нематоцидным действием *A. chroococcum* (P. Chahal et al., 1986).

Таблица 3

Численность фитонематод в почве при действии композиционных препаратов

Композиции	Фитогельминтов, (особей в 100 см ³ почвы)	% гибели
Контроль	1050	0
Аверком (Ave)	105	90
<i>S. avermitilis</i>	75	93
<i>A. chroococcum</i> + <i>B. megaterium</i>	125	88
Ave + <i>A. chroococcum</i> + <i>B. megaterium</i>	125	88

Уменьшение количества фитогельминтов, а также фитостимулирующее действие аверкома и его композиций с микробными препаратами положительно влияет на рост и развитие пшеницы. Во всех вариантах опыта отмечали увеличение длины и массы корней растений относительно контроля (табл. 4).

Таблица 4

Влияние микробных композиционных препаратов на развитие пшеницы яровой сорта Коллективная 3

Препараты	Длина				Масса сухого вещества			
	Корни		Стебли		Корни		Стебли	
	См	% к К*	см	% к К*	Мг	% к К*	Мг	% к К*
Контроль без обработки, (К)	10,3±0,7	100	16±2,0	100	0,8±0,05	100	1,8±0,4	100
Аверком	12±0,9	117	27±1,7	169	0,83±0,05	104	2,6±0,5	144
<i>S. avermitilis</i>	11,4±0,8	111	22±2,0	138	1,3±0,2	162	3,5±0,7	194
<i>A. chroococcum</i> + <i>B. megaterium</i>	14,6±0,7	141	25±2,1	156	0,75±0,1	93	2,9±0,5	164
Аверкомом + <i>A. chroococcum</i> + <i>B. megaterium</i>	16,9±1,6	164	31±1,1	194	9,73±0,5	121	2,7±0,6	153

Примечание: К* - контроль

Это способствует росту адсорбционной поверхности и, как следствие, поступлению большего количества доступных питательных веществ. Так, в вариантах с использованием *A. chroococcum* + *B. megaterium* отдельно и в композиции с аверкомом средняя длина корней и стеблей увеличивалась, соответственно, на 41-64% и 56-94% по сравнению с контролем.

Прирост как корневой, так и надземной массы растений при совместной обработке *A. chroococcum* + *B. megaterium* + аверком и при внесении культуры стрептомицета составлял 21 - 62% и 53-94% соответственно .

Высокая антипаразитарная активность аверкома против фитонематод и позитивное влияние на растения – *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 свидетельствует о перспективности его использования для производства экологически безопасного полифункционального препарата с нематоцидным и фитостимулирующим действиями.

ВЫВОДЫ

Аверком проявляет высокую нематоцидную активность относительно фитонематод *Meloidogyne incognita*. LD₅₀ аверкома составляет 2,0 мкг/мл при условиях 0,5 ч экспозиции, pH 7,0, и температуры +28°C. Впервые показано, что регуляторы роста растений (эмистим С, биолан) усиливают нематоцидное действие аверкома.

В условиях вегетационного опыта внесение живой культуры *S. avermitilis* и аверкома в почву способствовало снижению нематодной инвазии в ризосфере яровой пшеницы на 90% и 93%, соответственно.

Использование аверкома вместе с *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 и *Azotobacter chroococcum* УКМ В-6003 положительно влияет на развитие растений пшеницы, способствует увеличению длины и массы корней, а также стеблей растений относительно контроля.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Білявська, Л. О. Біосинтез антипаразитарних і фітостимулюючих речовин *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Київ, 2008, 21 с.
2. Дриняев, В. А. и др. Способ определения нематодной активности авермектинов – Патент РФ № 5037541/13, заявл. 11.01.91, опубл. 30.04.94, Бюлл. № 10.
3. Дятлова, К. Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. – 2001, Т. 7, № 5, С. 17-22.
4. Иутинская, Г. А. Разработка комплексных препаратов на основе микроорганизмов и фиторегуляторов // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. Сборник материалов конференции (12-16 июня, Киев). – Modern concepts in agriculture Radostim, 2007, P. 52-55.
5. Козырицкая, В. Е. и др. Биологические свойства авермектинового комплекса *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2179 // Agrarian science, 2007, 1, 17-20 p.
6. Пат. 34390 А, Україна С12Р9/00. Штам актиномицета *Streptomyces avermitilis* IMV Ас-2161 який продукує авермектини. Ісаєнко, В. и др. - № 99126577; Заявл. 03.12.99; Опубл. 15.02.01, бюл. № 1.
7. Петрук, Т. В. и др. Підвищення біосинтетичної активності *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161 під впливом N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину // Мікроб. журнал, 2004, т. 66, № 6, С. 24-30.
8. Петрук, Т. В. и др. Нематодна активність *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161 // III (X) з'їзд Товариства мікробіологів України. – збірник тез – Одеса, 2004, С. 70.
9. Сігарьова, Д. Д., Галаган, Т. О., Нікішичева, К. С. Нематодози озимої пшениці як об'єкти обліку та прогнозування Державною службою захисту рослин // Матер. Міжнарод. науково-практичної конф. "Інтегрований захист рослин на початку ХХІ століття" (1-5 листопада, 2004р., м. Київ), С. 91-97
10. Biliavska, L. Complex of biologically active substances of *Streptomyces avermitilis* UCM Ac-2179 – avermectin producer // S.P. Kostychev and contemporary agricultural microbiology: Intern. Scientific Conf. Yalta, 8-12 october 2007. – Chernihiv: CSTEЛ, 2007, P. 41.
11. Burg, R. et al. Avermectin, new family of potent anthelmintic agents, producing organism and fermentation // Antimicrob. Agents and Chemother, 1979, № 15, p. 361-367.
12. Chahal, P., Chahal, V. Effect of *Azotobacter chroococcum* on the hatching of egg masses and eggs of *Meloidogyne incognita* // Plant and Soil, 1986, 95, p. 289-291.
13. Ivermectin and Abamectin. Campbell, W. (ed.). New York: Springer-Verlag 1989; 363 p.
14. Ostlind, S., Long, R. Insecticidal activity of the antiparasitic avermectins. Vet Rec 1979; 105:8:168
15. Putter, I. et al. Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematocides from a soil microorganism. Experientia 1981; 37:963-964.

Data prezentării articolului - 27.02.2009