

Л.А. Белявская, В.Е. Козырицкая, Е.В. Валагурова., Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного 154, Киев МПС, Д03680, Украина

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРЕПАРАТА АВЕРКОМ

Препарат аверком – этанольная вытяжка из биомассы *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179, содержит антипаразитарный антибиотик авермектин, а также комплекс биологически активных веществ: аминокислоты, липиды, в том числе ненасыщенные жирные кислоты и фитогормоны – ауксины, цитокинины, гиббереллины. Комплекс указанных компонентов характеризуется нематоцидным, фитостимулирующим, элиситорным действием на растения, что подтверждено в производственных опытах на культуре огурца сорта «Анжелина».

Ключевые слова: *Streptomyces avermitilis*, аверком, аминокислоты, витамины, липиды, фитогормоны, фитонематоды, растения.

Важным элементом современных агротехнологий является использование препаратов, проявляющих фитозащитную и ростстимулирующую активности, повышающих устойчивость растений к стрессовым факторам. Перспективными являются комплексные биологические препараты, действующими компонентами которых являются фитогормоны, витамины, аминокислоты, липиды, жирные кислоты и другие физиологически активные вещества [16, 17].

Известными продуцентами биологически активных веществ являются почвенные стрептомицеты. Особое внимание исследователей привлекает эта группа микроорганизмов как продуценты антибиотиков. В частности *Streptomyces avermitilis* синтезирует макролидный антибиотик авермектин – комплекс состоящий из восьми близкородственных компонентов: четырех мажорных ( $A_{1a}$ ,  $A_{2a}$ ,  $B_{1a}$ ,  $B_{2a}$ ) и четырех минорных ( $A_{1b}$ ,  $A_{2b}$ ,  $B_{1b}$ ,  $B_{2b}$ ). Для авермектинового комплекса свойственен широкий спектр инсектицидной, акарицидной и нематоцидной активностей [19]. Антибиотик послужил основой для создания ряда препаратов, которые используются как биопестициды для регулирования численности экзо- и эндопаразитов растений [7].

Учитывая то, что сельское хозяйство Украины испытывает острую необходимость в антипаразитарных биопрепаратах, сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины был проведен скрининг культур стрептомицетов, выделенных из различных типов почв. Селекционирован штамм *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 с высокой авермектинсинтезирующей активностью. На основе этого штамма был получен препарат «аверком» [11].

Исследование физиологической активности препарата методами специфического биотестирования показало, что аверком стимулирует энергию прорастания и развитие проростков пшеницы, овса, редиса, огурцов и томатов [1].

В связи с вышеизложенным представляется целесообразным изучить комплекс биологически активных веществ, которые входят в состав аверкома и обеспечивают его антипаразитарное и ростстимулирующее действие.

**Материалы и методы.** Объектом исследования был препарат аверком, полученный путем экстракции этиловым спиртом биомассы (3:1) *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас – 2179 в стационарной фазе роста (7-суточная культура) в период максимального накопления антибиотика. Культуру стрептомицета выращивали в жидкой соевой среде при температуре  $28 \pm 1$  °C [2]. Компонентный состав авермектинового комплекса и процентное соотношение отдельных его фракций определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в системе этанол – ацетонитрил – вода (55 : 22,5 : 22,5) на приборе Beckman System Gold (аналитическая колонка ODS размером 4,6 мм x 25 см, размер частиц 5 мкм; защитная предколонка Ultrasphere ODS размером 4,6 мм x 4,5 см, размер частиц 5 мкм). Скорость потока элюата 0,7 мл/мин, объем инъекционной пробы – 20 мкл. Детектирование проводили в максимуме поглощения авермектинов при 243 нм [4]. Аминокислоты идентифицировали на анализаторе

© Л.А. Белявская, В.Е. Козырицкая, Е.В. Валагурова., Г.А. Иутинская, 2012

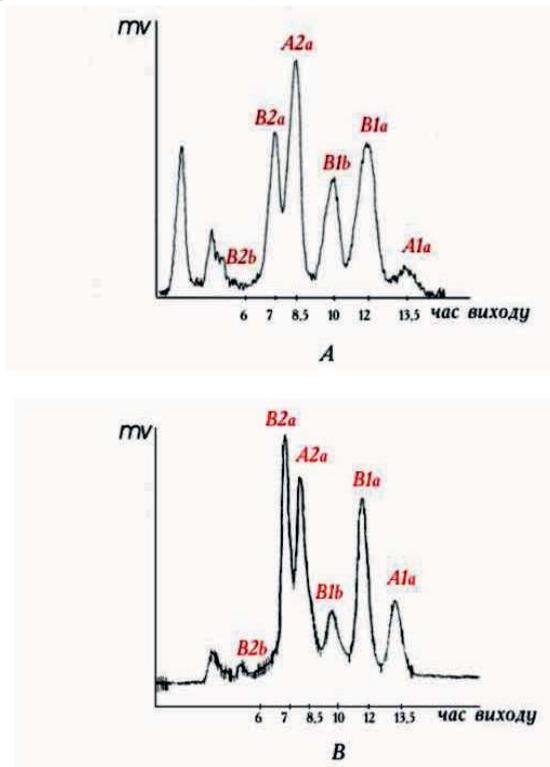
ААА-339 «Микротехника»; липиды определяли модифицированным методом Фолча [21], а жирнокислотный состав – на газовом анализаторе HP 6890 [5]. Содержание фитогормонов (ауксины и цитокинины) определяли методом спектроденситометрии тонкослойных хроматограмм на приборе «Camag TLC Scanner» (Швейцария) [12], а гиббереллины – фотоэлектроколориметрически на КФК-3-1 при длине волны 730 нм [10].

Действие аверкома на нематоды изучали согласно методике, принятой в нематологии [13]. При постановке опытов в условиях закрытого грунта, растения высаживали на площади 5 м<sup>2</sup>, плотность посева 2–2,5 растений на 1 м<sup>2</sup>. Повторность опыта 4-кратная. Препаратом обрабатывали рассаду растений огурцов сорта «Анжелина» [9].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы *Statistica 6.0* (Microsoft Excel).

**Результаты и их обсуждение.** Химико-аналитическое исследование аверкома показало, что препарат является комплексом биологически активных соединений. Кроме основного действующего начала – авермектина, который обеспечивает антипаразитарные свойства препарата, в его состав входят разнообразные внутриклеточные продукты метаболизма продуцента.

Присутствие в этиловом экстракте из биомассы *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 комплекса авермектинов и соотношение его отдельных фракций исследовали методом ВЭЖХ. Пики, представленные на хроматограммах, соответствуют авермектинам А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> (рис. 1). Содержание авермектина фракции В, которая ответственна за антипаразитарное действие всего авермектинового комплекса, составляет 40 %.



**Рис. 1. Компонентный состав авермектинового комплекса препарата аверком (А) и аверсектина С (В) – контроль.**

Подтверждена высокая нематоцидная активность аверкома. При изучении чувствительности галловой нематоды *Meloidogine incognita* – возбудителя мелоидогеноза корневой системы овощных культур, широко распространенного в тепличных хозяйствах Украины, установлено, что  $LD_{50}$  составляла 2,0 мкг/мл при действии аверкома в течение 0,5 часа (рис. 2).

В препарате аверком выявлена 21 аминокислота (табл. 1). В преобладающих количествах была представлены: глутаминовая кислота, аланин, лейцин, валин, тирозин, глицин, изолейцин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, пролин, треонин и другие.

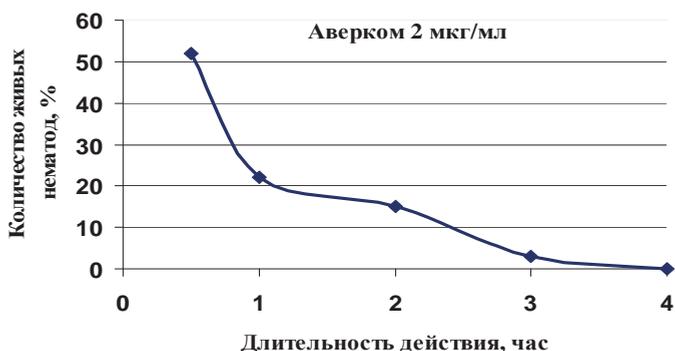


Рис. 2. Нематоцидное действие аверкома.

Таблица 1

Аминокислотный состав аверкома

№ пп.	Название аминокислоты	Содержание аминокислот	
		мг/мл	% от общего содержания
1	Глутаминовая кислота	0,904	28
2	Аланин	0,376	11,7
3	Лейцин	0,294	9,3
4	Валин	0,237	7,5
5	Тирозин	0,216	6,8
6	Глицин	0,148	4,7
7	Изолейцин	0,144	4,5
8	Фенилаланин	0,126	4,0
9	Аспарагиновая кислота	0,115	3,8
10	Пролин	0,115	3,6
11	Треонин	0,097	3,2
12	Метионин	0,074	2,3
13	Серин	0,071	2,2
14	Цистин	0,067	2,3
15	Лизин	0,059	1,9
16	Гистидин	0,041	1,3
17	Аргинин	0,031	1,0
18	Цистеиновая кислота	0,027	0,8
19	Таурин	0,014	0,4
20	$\gamma$ -аминоасляная кислота	0,011	0,36
21	Орнитин	0,011	0,34
Сумма аминокислот		3,178	100

К биологически активным веществам микробного происхождения следует отнести липиды. В составе аверкома обнаружены такие физиологически активные фракции липидов: фосфолипиды, стерин и свободные жирные кислоты, в меньших количествах присутствовали: моно- и диглицериды, триглицериды, эфиры стерин, воска и неидентифицированные фракции (рис. 3).

В составе препарата аверком были обнаружены 14 жирных кислот (табл. 2), среди которых в наибольшем количестве присутствовали олеиновая (до 22 %) и 12-метилтетрадекановая (до 16 %). Впервые в авермектинсодержащих препаратах выявлена полиненасыщенная арахидоновая кислота (2,4 %).

Среди биологически активных веществ препарата важное место принадлежит фитогормонам с ростстимулирующими свойствами. Нами впервые показано, что авермектинсодержащий препарат аверком содержит три класса фитогормонов: ауксины, гиббереллины и цитокинины. Ауксины представлены индолилуксусной кислотой в количестве 217 нг/мл аверкома; цитокинины – изопентинил-аденином (428 нг/мл), зеатином (149 нг/мл) и зеатин-рибозидом (118 нг/мл). В значительных количествах выявлена гибберелловая кислота – 4500 нг/мл аверкома.

## Жиринокислотный состав аверкома

№ пп	Жирная кислота	Число атомов углерода	Содержание жирных кислот в аверкоме, % от общего количества
1	Лауриновая	C <sub>12,0</sub>	2,8855
2	Дентицетовая	C <sub>12,1</sub>	7,9210
3	Миристиновая	C <sub>14,0</sub>	5,6880
4	12-метилтетрадекановая	Антеизо- C <sub>15,0</sub>	16,2476
5	Изопальмитиновая	Изо- C <sub>16,0</sub>	6,4110
6	Пальмитиновая	C <sub>16,0</sub>	10,8327
7	14-метилгексадекановая	Антеизо- C <sub>17,0</sub>	6,2191
8	Стеариновая	C <sub>18,0</sub>	3,5838
9	Олеиновая	C <sub>18,1</sub>	22,1480
10	Линолевая	C <sub>18,2</sub>	4,5526
11	Линоленовая	C <sub>18,3</sub>	1,4413
12	Галдолеиновая	C <sub>20,1</sub>	2,8970
13	Арахидоновая	C <sub>20,4</sub>	2,3569
14	Лигноцериновая	C <sub>24,0</sub>	6,8155

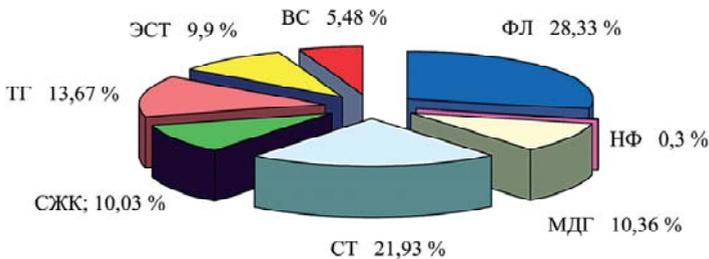


Рис. 3. Компонентный состав липидов аверкома (%): ФЛ – фосфолипиды, МДГ – моно- и диглицериды, СТ – стерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ТГ – триглицериды, ЭСТ – эфиры стеринов, ВС – воска и НФ – неидентифицированные фракции.

Широкий спектр биологически активных веществ в аверкоме дает основание предположить его положительное влияние на рост и развитие растений. При использовании препарата аверком в производственных условиях (ГП Научно-исследовательский агрокомбинат «Пуща-Водица»), препарат оказывал положительное влияние на рост и урожайность огурцов. Установлено удлинение продолжительности продуктивного периода вегетации растений огурца сорта Анжелина, уменьшение заражения фитопатогенами, а также увеличение урожайности на 20 % по отношению к контролю.

По данным литературы макролидный антибиотик авермектин обладает высокой инсектицидной, акарицидной и нематоцидной активностью [19]. На основе авермектина и его отдельных фракций созданы препараты, которые признаны самыми эффективными и экологически безопасными средствами борьбы с эндо- и экзопаразитами животных и растений [8].

Из литературы известно [7], что авермектинсодержащие препараты очень активны против галловой нематоды. Исследования, проведенные Белявской с соавт. [2] показали, что препарат аверком эффективен против широкого круга нематод: *Pratylenchus pratensis*, *Tylenchorbynchus dubius*, *Helicotylenchus dihystra*, *Pratylenchus nanu*, *Ditylenchus dipsaci*. Это свидетельствует о том, что авермектинсодержащие препараты, в том числе и аверком, на сегодняшний день являются лучшими нематоцидами.

Присутствие в аверкоме различных биологически активных веществ обеспечивает многообразное физиологическое воздействие на растения. Известно, что большинство растений усваивают определенные аминокислоты в неизменном виде [20], следовательно, присутствие их в аверкоме позволит растениям получать вместе с препаратом легкодоступные источники азотного питания. Кроме того, важное значение имеет присутствие в препарате таких аминокислот, как фенилаланин, пролин, глутаминовая кислота, которые способствуют повышению устойчивости растений к биогенным и абиогенным стрессовым факторам [6]. Особое внима-

ние привлекает  $\gamma$ -аминоасляная кислота, которая препятствует передаче нервного импульса у вредителей, и тем самым усиливает нервнопаралитическое действие авермектинсодержащих препаратов [18].

Среди биологически активных веществ микробного происхождения особое место занимают липиды. Они входят в состав мембран и ферментов, участвуют в процессе активного переноса электронов, обладают антимикробными и антиоксидантными свойствами [3]. Присутствие в составе аверкома таких физиологически активных фракций липидов, как фосфолипиды и стеринны, причем в значительных количествах (21–28 %), влияет на биологическую активность препарата. Известно, что фосфолипиды благоприятствуют стабилизации системы антиоксидантной защиты организма [14], а следовательно повышают устойчивость растений к стрессовым факторам. Количественный и качественный состав стериннов является одним из показателей иммунного потенциала растений [6].

Следует обратить внимание на то, что в составе жирных кислот аверкома содержится ряд ненасыщенных – олеиновая, линолевая, линоленовая, которые принимают активное участие в синтезе вторичных метаболитов [15]. Полиненасыщенная арахидоновая кислота является элиситором и, попадая в ткани растений, индуцирует ответ иммунной системы на действие неблагоприятных факторов [17].

Важную роль в регуляции роста и развития растений играют фитогормоны. Они принимают участие в координации разнообразных физиологических процессов в растениях – регулируют состояние покоя и прорастания семян, влияют на корнеобразование, цветение, плодоношение, повышают устойчивость растений к факторам окружающей среды [16]. Важно присутствие в аверкоме фитогормонов с ростстимулирующими свойствами, таких как индолилуксусная кислота, изопентинил-аденин, зеатин, зеатин-рибозид, гибберелловая кислота, которые при внесении с препаратом могут влиять не только на рост и развитие растений, но и на почвенную микрофлору.

Таким образом, комплексный полифункциональный препарат аверком содержит ряд биологически активных веществ – антипаразитарный антибиотик авермектин; аминокислоты – фенилаланин, пролин, глутаминовую кислоту; липиды – фосфолипиды, стеринны, ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновую, а также фитогормоны с ростстимулирующими свойствами. Комплекс этих биологически активных веществ обеспечивает антипаразитарное, фитостимулирующее и элиситорное действие препарата.

*Л.О. Біляська, В.Є. Козирицька, О.В. Валагурова, Г.О. Іутинська*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

## **БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ПРЕПАРАТА АВЕРКОМ**

Препарат аверком являє собою етанольну витяжку із біомаси *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас – 2179, в якому окрім антипаразитарного антибіотика авермектину міститься комплекс біологічно активних речовин: амінокислоти, вітаміни, ліпіди, в тому числі жирні кислоти та три класи фітогормонів – ауксини, цитокініни, гібереліни. Комплекс вказаних компонентів характеризується нематодцидною, фітостимулюючою та еліситорною дією на рослини, що підтверджено в промислових умовах на культурі огірка сорту «Анжеліна».

Ключові слова: *Streptomyces avermitilis*, аверком, біологічно активні речовини, амінокислоти, вітаміни, ліпіди, фітогормони, фітонематоди, рослини.

*L.O. Biliavska, V.E. Kozyrtska, E.V. Valaghurova, G.A. Iutynska*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PREPARATION AVERCOM**

### **S u m m a r y**

The preparation avercom created on the basis of ethanol extracts from the biomass of *Streptomyces avermitilis* UCM Ac–2179, contains an antiparasitic antibiotic avermectin, as well as a complex of biologically active substances: amino acids, lipids, including nonsaturated fatty acids, and phytohormones, particularly: auxins, cytokinins, hybberellins. The above mentioned complex is characterized by nematocidal, phytostimulating and

elicitor effect upon plants which has been confirmed with the results of production experiments on the cucumber variety Angelina.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** *Streptomyces avermitilis*, avercom, biological active compounds, amino acids, vitamins, lipids, phytohormones, phytoneematodes, plants.

**The author's address:** *Bilivska L.O.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP D 03680, Ukraine.

1. Білявська Л.О., Калмикова Н.О., Козиріцька В.Є., Валагурова О.В., Іутинська Г.О. Вплив *Streptomyces avermitilis* та його авермектинового комплексу на мікроорганізми та рослини // Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія, Алелопатія: Зб. наук. праць. – К.: ДАУ, 2005. – С. 252–257.
2. Белявская Л.А., Галаган Т.А., Болтовская Е.В., Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Сигарева Д.Д., Иутинская Г.А. Антинематодные свойства *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 и его авермектинового комплекса – аверкома // Agrarian Science. – 2009. – №1. – P. 29–33.
3. Бурцева С.А. Аминокислотный и липидный составы биомассы стрептомицетов, выделенных из почв Молдовы // Микробиол. журн. – 2000. – 62, № 3. – С. 9–16.
4. Викторов А.В., Пleshков Е.Н., Кругляк Е.Б. и др. Новый метод ВЭЖХ для определения природных авермектинов групп А и В и олигомицина. Приложение – анализ аверсектина С // Биотехнология. – 1999. – № 5. – С. 79–86.
5. ГОСТ Р 1486-99. Получение метиловых эфиров жирных кислот. Введ. 01.01.01. – М.: Гос. станд. Рос. Федерации, 2001. – С. 2–3
6. Зиновьева С.В. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и паразитических нематод: теоретические и прикладные аспекты // Паразитические нематоды растений и насекомых. – М.: Наука, 2004. – С. 50–85.
7. Иванова Т.С., Вялых А.К., Соколов М.С., Монастырский О.А. Эффективность биопрепаратов в борьбе с галловой нематодой в защищенном грунте // Агрохимия – 1990. – №3. – С. 101–106.
8. Ісаснко В.І., Веренко О.В. Розроблення нового покоління антипаразитарних препаратів на основі екстрактів авермектинів // Агроекологічний журнал. – 2003. – №2. – С. 54–57.
9. Методика дослідної справи в овочівництві і баштанництві. – Харків: Основа, 2001.
10. Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н. Гиббереллины: Монография. – М.: Наука, 1984. – 208 с.
11. Петрук Т.В., Білявська Л.О., Козиріцька В.Є., Муквич М.С. Підвищення біосинтетичної активності *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2161 під впливом N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину // Микробиол. журн. – 2004. – 66, № 6. – С. 24–30.
12. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1991. – 23, № 6. – С. 606–614.
13. Сігарьова Д.Д., Болтовська О.В. Методи виявлення та боротьби з головими нематодами у закритому ґрунті // Захист і карантин рослин. – К.: Урожай, 1999. – Вип. 45. – С. 58–63.
14. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швеиц В.И. Физиологически активные липиды. – М.: Наука, 1991. – С. 5–12.
15. Тарчевский И.А. Регуляторная деградация биополимеров и липидов // Физиология растений. – 1992. – 39, №6. – С. 12–23.
16. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов (обзор) // Прикл. биохим. и микробиология. – 2006. – 42, № 3. – С. 261–268.
17. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
18. Augustus A.M., Celaya T., Husain F. et al. Antibiotic – sensitive to IC mutants and their suppressors // J. Bacteriol. – 2004. – 186. – P. 1851–1860.
19. Burg R.W., Miller B.M., Baker E.E. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents, producing organism and fermentation // Antimicrob. Agents and Chemother. – 1979. – N 15. – P. 361–367
20. Kramer R. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids // J. Biotechnol. – 1996. – 45, N 1. – С. 1–12.
21. Rastimesina I.O. Sinteza orientata a substantelor bioactive de catre tulpina *Streptomyces canosus* CNM-71 si perspectivele utilizarii lor // Teza de doctor in stiinte biologice. – Chisinau. – 2001. – P. 29.

Отримано 18.05.2011