

**Л.О. Білявська, Т.О. Галаган, Г.О. Іутинська**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

## **АНТИНЕМАТОДНА АКТИВНІСТЬ МЕТАБОЛІТІВ, ЩО ПРОДУКУЮТЬСЯ ГРУНТОВИМИ СТРЕПТОМІЦЕТАМИ**

**Мета.** Дослідити антинематодну активність метаболітів ґрунтових стрептоміцетів та біопрепаратів на їх основі стосовно галових і цистоутворюючих нематод в системі *in vitro*. **Методи.** Дію метаболітів стрептоміцетів та біопрепаратів визначали *in vitro* на личинках 2 віку галової нематоди *Meloidogone incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949 та бурякової цистоутворюючої нематоди *Heterodera schachtii* A. Schmidt, 1871, а також листової нематоди роду *Aphlenchoides* шляхом їх культивування впродовж 24 годин у водних розчинах етанольних екстрактів біомаси, окремих метаболітів та біопрепаратів. Нематицидний і нематостатичний ефект досліджуваних зразків оцінювали за зміною рухової активності нематод. **Результати.** Ґрунтові стрептоміцети *Streptomyces violaceus* IMB Ac-5027, *S. avermitilis* IMB Ac-5015 та метаболітні біопрепарати на їх основі (Віолар, Аверком і Аверком-нова відповідно) проявляли значну нематицидну активність щодо фітопатогенних нематод *M. incognita* та *H. schachtii*, і викликали їх загибель після 24 годин дії на 96,8–100 %. *S. netropsis* IMB Ac-5025 і біопрепарат на його основі Фітовіт проявили низьку нематицидну активність до обох видів нематод. **Висновок.** Ґрунтові стрептоміцети *S. violaceus* IMB Ac-5027 і *S. avermitilis* IMB Ac-5015 є перспективними продуцентами сполук для створення біопрепаратів з нематицидною дією щодо фітопаразитичних нематод *M. incognita* та *H. schachtii*.

*К л ю ч о в і с л о в а:* ґрунтові стрептоміцети, метаболіти, біопрепарати, фітонематоди, нематицидна активність.

Аналіз існуючих систем захисту сільськогосподарських культур від хвороб і шкідників свідчить, що успіхи у застосуванні пестицидів, які спостерігалися у середині ХХ століття, у нинішніх умовах суттєво зменшилися через негативні їх наслідки на навколишнє середовище. Це спонукало науковців на пошуки альтернативних екологічно безпечних заходів, серед яких все більше уваги приділяється засобам біологічного контролю патогенів і шкідників сільськогосподарських рослин.

Препарати мікробного походження зарекомендували себе як такі, що не викликають звикання шкідників, крім того, вони індукують захисні реакції і підвищують стійкість рослин до біотичних і абіотичних стресів [1]. Ця стійкість зумовлена функціонуванням декількох систем захисту, що перешкоджає виникненню адаптації у патогенів.

Одним з розповсюджених і шкодочинних факторів для рослин є нематоди, які призводять до зменшення врожайності зернових, овочевих та технічних культур. Згідно всесвітнього маркетингового аналізу глобальний ринок нематицидних препаратів зростатиме у середньому на 3,2 % до 2019 р. [2]. Проте деякі хімічні нематициди, як наприклад, бромистий метил, з 2005 року заборонені до використання у багатьох країнах. У зв'язку

з цим прогнозується зростання виробництва і продажу біологічних нематодів випереджуваними темпами – на 4,2 % до 2019 р. [2].

Голова нематода *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949 – збудник мелойдогінозу – захворювання кореневої системи рослин, широко розповсюджена в тепличних господарствах України та спричиняє значні втрати врожайності і товарності продукції [3, 4]. Слід відзначити, що голова нематода *M. incognita* відноситься до шкідників з г-стратегією репродукції (вибуховим ростом чисельності). Для самок цієї нематоли характерна середня плодючість у 700 яєць за середній 75-добовий репродуктивний період [5].

Бурякова цистоутворююча нематода *Heterodera schachtii* A. Schmidt 1871 є також не менш шкочинним об'єктом, що зумовлює гетеродероз цукрових буряків (*Beta vulgaris* L. spp. *saccharifera*) у майже 40 країнах світу. Втрати врожаю від цього фітогельмінта в усьому світі та Україні становлять 95 % від усього комплексу шкідливих організмів цієї культури [6, 7]. В останні роки виникає ризик підвищення шкідливості паразитичної нематоли *H. schachtii* для важливих сільськогосподарських культур родини *Brassicaceae*, підвид ріпи *Brassica rapa* L., до яких належать ріпак *Brassica rapa* ssp. *oleifera*, капуста городня *Brassica oleracea* та пекінська капуста *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* (*Chinese cabbage*) [8].

Боротьба з фітопаразитичними нематодами є складним завданням, оскільки, на відміну від інсектицидів та фунгіцидів хімічного походження, які широко використовуються для захисту рослин від шкідливих комах та грибних хвороб, хімічно синтезовані нематодциди в Україні не дозволені до застосування у зв'язку з їх небезпечністю для організму людини і навколишнього середовища та високими нормами витрат. Тому пошук нових ефективних та екологічно безпечних нематодцидів біологічного походження є надзвичайно актуальним.

Важливим напрямком у біологічному захисті рослин від фітогельмінтів є використання мікробів-антагоністів і продуктів їх життєдіяльності. Вони ефективні в дуже малих концентраціях, і для захисту рослин потрібна невелика кількість діючої речовини [7, 9].

Активними продуцентами метаболітів для біоконтролю чисельності фітопатогенів, у тому числі нематод, є представники роду *Streptomyces* – перспективні об'єкти біотехнології, оскільки синтезують антибіотики різної хімічної природи і широкий спектр біологічно активних речовин [10].

Раніше з південного каштанового ґрунту були виділені ізоляти актинобактерій, що проявляють антагонізм до деяких фітопатогенів. У попередніх наших роботах [4, 11, 12] наведені дані щодо скринінгу та ідентифікації *S. netropsis* IMB Ac-5025 і *S. violaceus* IMB Ac-5027 з високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних грибів *Alternaria alternata* 16814, *Fuzarium oxysporum* 54201 і *F. oxysporum* n 33 та широкого спектру фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Clavibacter* [4, 11, 12]. Зазначені мікроміцети і бактерії є збудниками захворювань зернових, овочевих та бобових стратегічно важливих сільськогосподарських культур. Штами *S. netropsis* IMB Ac-5025 і *S. violaceus* IMB Ac-5027 проявляли, окрім антагоністичних, також і фітостимулювальні властивості [13].

Враховуючи викладене вище, метою даної роботи було визначення в системі *in vitro* антинематодної активності метаболітів, синтезованих

виділеними стрептоміцетами та комплексних біопрепаратів на їх основі, проти гальної *M. incognita*, бурякової цистоутворюючої *H. schachtii* та листкової роду *Aphelenchoides* нематод.

**Матеріали і методи.** Вивчали антинематодну активність виділених нами із південного каштанового ґрунту штамів стрептоміцетів *S. netropsis* ІМВ Ас-5025, *S. violaceus* ІМВ Ас-5027 [11, 12].

Досліджувані культури стрептоміцетів підтримували на картопляно-глюкозному (КГА) і вівсяному (ISP-3) агаризованих середовищах [14].

Для вивчення антинематодної активності досліджувані штами актинобактерій вирощували поверхневим способом на КГА упродовж 10-ти діб та отримували етанольні екстракти, як описано раніше [15], які використовували для первинного скринінгу.

За глибинного культивування стрептоміцети вирощували у рідкому соєвому ферментаційному середовищі [16] упродовж 7-ми діб. Як інокулянти використовували штами *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015, *S. netropsis* ІМВ Ас-5025, *S. violaceus* ІМВ Ас-5027 в експоненційній фазі росту, вирощені на соєвому середовищі. Кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму рідкого живильного середовища. Культивування проводили в колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на роторних качалках ( $t^{\circ} = +28 \pm 1^{\circ} \text{C}$ ;  $n = 240$  об/хв) до стаціонарної фази росту. Біомасу стрептоміцетів відокремлювали центрифугуванням (4000 g) упродовж 20 хв. Супернатант культуральної рідини зберігали при  $+4^{\circ} \text{C}$ . Для отримання етанольного екстракту до осадженої біомаси додавали 10 мл охолодженої до  $+4^{\circ} \text{C}$  дистильованої води, ретельно перемішували і центрифугували 10 хв при 4000 g. Відмивання проводили 3–4 рази. Потім до відмитої біомаси додавали 5 мл 96 %-го етанолу і при періодичному перемішуванні проводили екстракцію за кімнатної температури впродовж 24 годин; біомасу відокремлювали центрифугуванням (10 хв, 4000 g). Отриманий етанольний екстракт зберігали при  $+4^{\circ} \text{C}$  [16]. Отримані таким чином супернатанти культуральних рідин і етанольні екстракти біомаси стрептоміцетів використовували для визначення антинематодної активності та створення відповідних композиційних метаболічних біопрепаратів.

До складу препарату Віолар входять супернатант культуральної рідини і етанольний екстракт біомаси (4:1) *S. violaceus* ІМВ Ас-5027. Препарат Фітовіт складається із супернатанту культуральної рідини і етанольного екстракту біомаси (4:1) *S. netropsis* ІМВ Ас-5025. Аверком є етанольною витяжкою з біомаси *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 з вмістом 100 мг/л авермектину (еталон); з метою підсилення його антипаразитарної дії була розроблена модифікація Аверком-нова з додаванням елісатору хітозану. Отже, Аверком-нова складається із аверкому і супернатанту культуральної рідини (1:1), а також хітозан у 0,01 мМ. Проведені біохімічні дослідження показали, що до складу розроблених метаболічних біопрепаратів окрім антибіотичних субстанцій входить комплекс біологічно активних речовин: амінокислоти, ліпіди, у тому числі фосфоліпіди, стерини, жирні кислоти, а також фітогормони (ауксини, цитокініни, гібереліни, брасиностероїди) [4].

Для виділення та ідентифікації активних компонентів антибіотичного комплексу *S. violaceus* ІМВ Ас-5027 проводили первинну сорбцію як із су-

пернатанту культуральної рідини, так і з екстракту біомаси за допомогою сорбенту Amberlyte XAD-2 з подальшою елюцією сумішшю н-бутанол–ацетон–вода (1:1:1) за рН 6,8–7,5. Отримані елюати випаровували у вакуумі при 37 °С і сухий залишок перерозчиняли у 60 %-у водному розчині етанолу. Подальше їх очищення з отриманих концентратів проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Fertigfolien Alugram SIL G / UV254 Kieselgel 60 (Macherey-nagel) (20×20 см) у різних системах розчинників [17]. Хроматограми аналізували в УФ-світлі на денситометрі «Sorbfil» (Росія). Кожну фракцію, отриману після ТШХ, знімали окремо в епандорфи, елюювали 60 %-м етанолом і випаровували за температури 37 °С до сухого залишку, який зважували. Очищені таким чином фракції використовували у концентрації 5 мкг/мл для визначення їхньої дії на нематоди.

Антинематодну активність етанольних екстрактів біомаси штамів стрептоміцетів, супернатанту культуральної рідини, очищених фракцій та розроблених метаболітних біопрепаратів вивчали в системі *in vitro* на виділених модифікованим методом Бермана [18, 19] інвазійних личинках (2-го віку) галової *M. incognita*, бурякової цистоутворюючої *H. schachtii* та листової роду *Aphlenchoides* нематод шляхом їх культивування в досліджуваних розчинах упродовж 24 годин [15, 20]. Контролем слугувала вода, еталоном – біопрепарат із немадицидною дією Аверком (100 мг/л авермектину) та хімічний системний інсектицид Конфідор Максї, (діюча речовина – імідаклоприд, 700 г/кг) кишечно-контактної дії з тривалим захисним ефектом проти широкого спектру шкідників. Попередні наші тестування виявили антинематодну активність біопрепаратів проти *M. incognita* у таких водних розчинах: Аверком – 1:50, Аверком-нова – 1:25 і 1:50, Віолар – 1:80 і 1:160; Фітовіт був малоактивним у розведенні 1:80. Хімічний інсектицид Конфідор Максї використовували у рекомендованих виробником дозах (1 г на 10 л води). Упродовж 0,5; 1; 2; 3; 4 та 24 годин культивування нематод у зазначених вище розчинах оцінювали їх дію за зміною рухової активності нематод, яка проявлялась у вигляді нематостатичного (що спричиняє загибель нематод) або нематистатичного (що лише пригнічує на певний час рухливість нематод та викликає їх тимчасовий параліч) ефекту. Дослід проводили у чотирьох повтореннях.

Розрахунки та статистичну обробку отриманих даних виконували за допомогою комп'ютерних програм *Statistica 6.0* і *Microsoft Excel '10*.

**Результати досліджень.** Водні розчини етанольних екстрактів біомаси (у розведенні 1:20) досліджуваних штамів стрептоміцетів за поверхневого їх вирощування вже впродовж 0,5 годин дії викликали *in vitro* загибель 59–83 % інвазійних личинок (2-го віку) галової нематоди *M. incognita* (таблиця). Наступне збільшення тривалості дії на нематоди екстрактів біомаси *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 і *S. violaceus* ІМВ Ас-5027 до 4 годин збільшувало відсоток їх загибелі до 91–100 %, що свідчить про їх нематостатичний ефект; через 24 години культивування екстракти викликали 100 %-у загибель особин нематод. За дії етанольного екстракту біомаси *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 до кінця експозиції спостерігали лише 75 %-у загибель з частковим відновленням рухливості нематод, що свідчить про нематистатичний ефект.

Оскільки серед нововиділених штамів більш високу (100 %-у) нематостатичну активність мали етанольні екстракти біомаси *S. violaceus* ІМВ Ас-5027, у

**Таблиця**

**Антинематодна активність етанольних екстрактів біомаси (1:20)  
стрептоміцетів проти галової нематоди *M. incognita***

Штам стрептоміцету	Кількість нерухомих личинок нематод, (% від загальної) за тривалістю експозиції (год.)					
	0,5	1	2	3	4	24
<i>S. avermitilis</i> IMB Ac-5015	83 ± 2,3	95 ± 2,4	100	100	100	100
<i>S. netropsis</i> IMB Ac-5025	74 ± 2,2	90 ± 3,2	86 ± 3,1	87 ± 3,1	79 ± 2,2	75 ± 2,2
<i>S. violaceus</i> IMB Ac-5027	59 ± 1,9	67 ± 2,7	68 ± 2,7	85 ± 2,3	91 ± 3,2	100
Контроль (вода)	0	0	0	0	0	0

подальших дослідженнях ми проводили очистку, виділення та вивчення нематодної дії окремих субстанцій метаболітів цього продуцента.

Порівняльні дослідження етанольних екстрактів біомаси *S. avermitilis* IMB Ac-5015 та *S. violaceus* IMB Ac-5027 методами тонкошарової хроматографії (рис. 1А) виявили, що нематодцидно діюча речовина останнього є іншої природи, ніж авермектини: на хроматограмі були відсутні плями, що співпадають із стандартом Аверсектином С (див. рис. 1А, трек 1) та етанольним екстрактом біомаси *S. avermitilis* IMB Ac-5015 (рис. 1А, трек 2). Це свідчить про те, що метаболіти *S. violaceus* IMB Ac-5027, які проявляють нематодцидну дію, не є авермектинами.

У *S. avermitilis* IMB Ac-5015 компоненти авермектинового комплексу накопичуються лише в біомасі [21]. У *S. violaceus* IMB Ac-5027 фракції 1, 2, 3, 5 та 6 накопичуються лише в екстракті міцелію продуцента, тоді як фракція 4 виділена як із біомаси, так і з супернатанту культурального середовища. Цей факт дає можливість використовувати для створення біопрепарату як етанольний екстракт біомаси, так і супернатант культуральної рідини.

Дослідження дії на нематоди очищених окремих фракцій антибіотичного комплексу *S. violaceus* IMB Ac-5027 показали, що всі вони негативно впливали на галову нематоду *M. incognita*. Найвищу нематодцидну активність проявляли фракції 4 та 5, оскільки вони перетнули позначку 90 %-ї ефективності, починаючи з 0,5 годин культивування (рис. 2). У перебігу досліду, починаючи з 3-х годин дії фракцій 4 і 5, у трьох з чотирьох повторень спостерігалась повна загибель нематод, і лише в одному повторенні кожного з цих варіантів реєстрували по 1–2 личинки нематод з порушеною рухливістю.

За дії фракцій 1, 2, 3 і 6 упродовж 24 годин спостережень нематодцидна ефективність не досягала стійкої межі 90 %-ї гибелі личинок нематод, а лишалась у межах 72,6–86,2 %.

Зважаючи на те, що фракції 4 та 5 показали найвищу нематодцидну дію, вони були перевірені на активність відносно листових нематод роду *Aphelenchoides* (рис. 2). Виявлено їх високу нематодцидну ефективність на рівні 90–95 % загибелі цих фітогельмінтів, починаючи з 4 годин культивування.

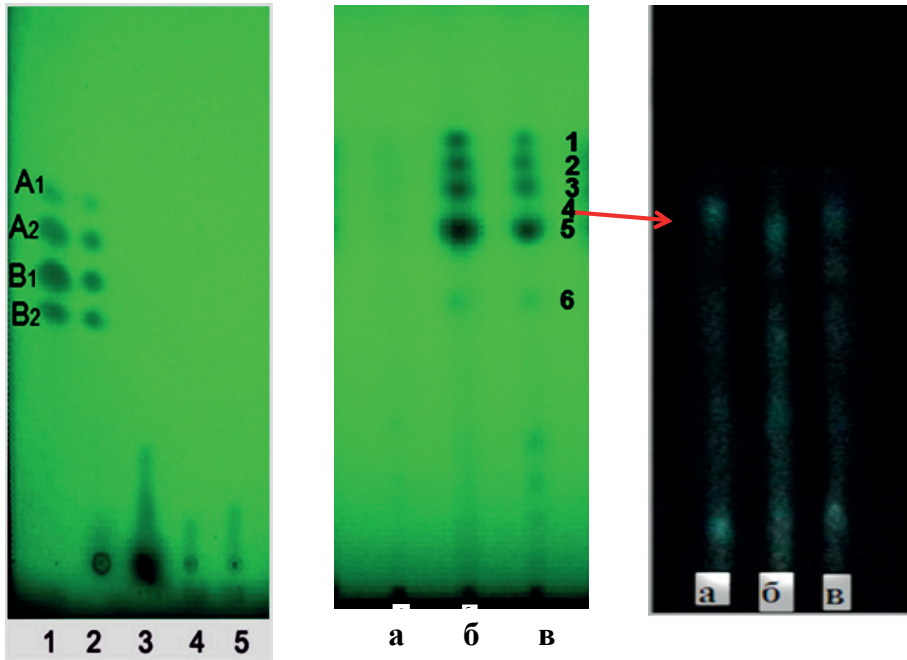


Рис. 1. Розділення (ТШХ) етанольних екстрактів біомаси стрептоміцетів у системі (гексан:ацетон:етанол) для авермектинів (А при УФ 254 – 1 - Аверсектин С (стандарт) із фракціями А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, 2 – *S. avermitilis* IMB Ac-5015, 3-5 – *S. violaceus* IMB Ac-5027) та відповідно підібраний (бутанол:оцтова кислота:вода) (Б при УФ 254, В при УФ 365 – 1, 2, 3, 4, 5, 6 фракції антибіотичного комплексу *S. violaceus* IMB Ac-5027: а-супернатант культуральної рідини, б і в - етанольні екстракти біомаси)

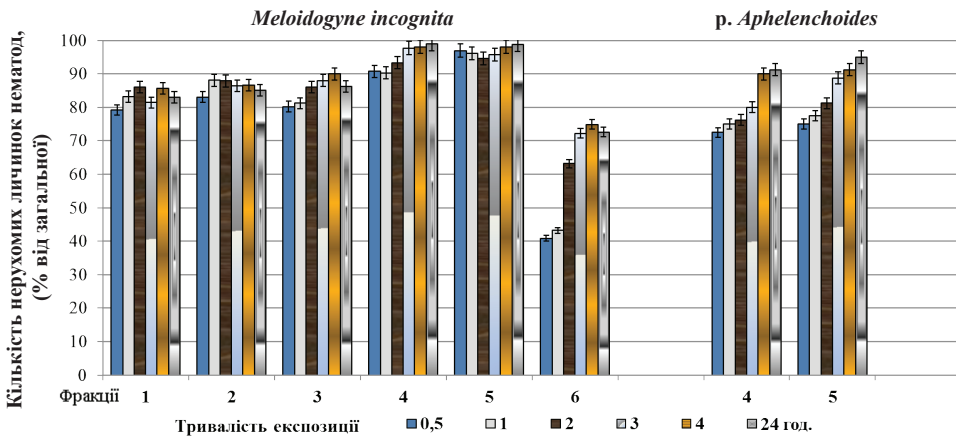


Рис. 2. Антинематодна активність очищених компонентів антибіотичного комплексу *S. violaceus* IMB Ac-5027 (1, 2, 3, 4, 5 та 6 фракції)

За результатами перевірки антинематодної дії розроблених нами комплексних метаболітичних біопрепаратів проти нематод *M. incognita* та *H. schachtii* найбільш активним виявився Аверком-нова у розведеннях 1:25 і 1:50 (рис. 3).

Не зважаючи на те, що вміст антибіотику авермектину в цьому препараті був меншим (50 мг/л) порівняно з еталонним (100 мг/л), його нема-

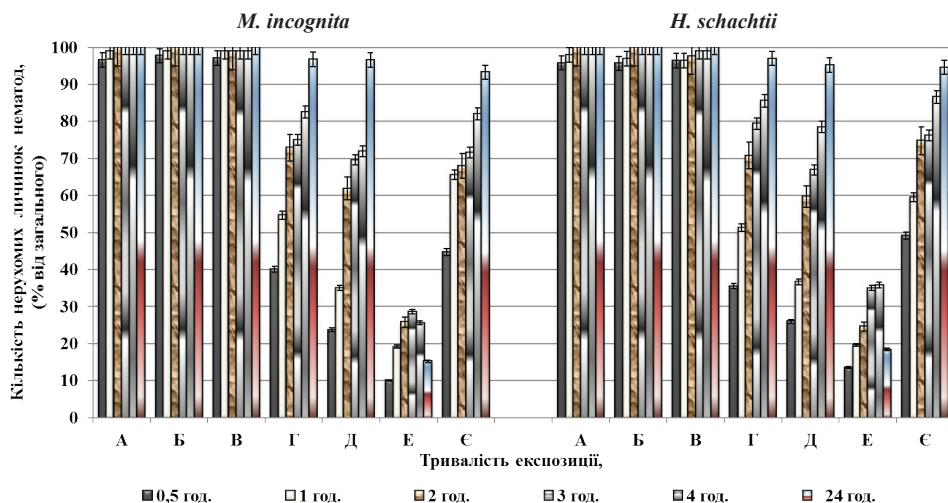


Рис. 3. Дія комплексних метаболітичних біопрепаратів на основі стрептоміцетів проти галової та цистоутворюючої нематод: А - Аверком-еталон (1:50), Б - Аверком-нова (1:25), В - Аверком-нова (1:50), Г - Віолар (1:80), Д - Віолар (1:160), Е - Фітовіт (1:80), Є - Конфідор Максі хім. (1:10)

тицидна активність щодо *M. incognita* та *H. schachtii* була на рівні еталону (Аверком) та впродовж 0,5–4 годин обліків складала 97,1–100 %, а після 24 годин культивування всі личинки були нерухомими.

Нематицидна активність препарату Віолар підвищувалася поступово. Так, щодо *M. incognita* у розведенні 1:80 протягом 0,5–1 годин досліду його нематицидна активність не перевищувала 54,7 %, через 2–3 години зросла до 74,97 %, а на 4-ту годину – досягла 82,6 %. У розведенні 1:160 після 0,5–1 годин його активність була близько 35,0 %, упродовж 2–4 годин – зросла до 69,6 %. Після 24 годин культивування нематицидний ефект обох розведень досягнув 96,6–96,8 %.

Подібні показники отримані нами й у варіантах із *H. schachtii*. У розведенні 1:80 нематицидна активність Віолару впродовж 0,5–1 годин досліду досягала 51,3 %, через 2–3 години – 79,4 %, а через 4 години – досягла 85,6 %. У розведенні 1:160 впродовж 0,5–1 годин відмічено нематицидну активність на рівні 36,7 %, 2–4 годин – у межах 59,7–78,5 %. Після 24 годин дії нематицидна активність обох розведень становила 95,2–97,0 %.

Препарат Фітовіт на основі *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 проявив низьку нематистатичну активність до обох видів нематод, яка на 24-ту годину культивування не перевищувала 15,2–18,4 %.

Стосовно хімічного інсектициду системно-контактної дії Конфідору Максі, відмічено нематицидну активність до *M. incognita* на рівні 93,28 %, до *H. schachtii* – 94,6 % на 24-у годину експозиції. Тобто, комплексні метаболітичні біопрепарати на основі стрептоміцетів не поступалися хімічному за ефективністю, а в окремих випадках навіть перевищували його.

**Обговорення.** В останні роки виявлені активні штами мікроміцетів і бактерій-антагоністів, у тому числі актинобактерій, що проявляють комплексну активність (фунгіцидну, бактерицидну і нематицидну). Вони характеризуються високою біологічною, господарською та економічною ефективністю у боротьбі з комплексом фітопаразитів, включаючи нематоди [22, 23, 24, 25].

Ґрунтові стрептоміцети є активними продуцентами різноманітних за хімічною будовою і спектром дії біологічно активних речовин, зокрема антипаразитарних антибіотиків [26]. Серед 23000 зареєстрованих біологічно активних вторинних метаболітів, що продукуються мікроорганізмами, більш 10000 сполук синтезують актиноміцети, що становить 45 % всіх біологічно активних метаболітів мікробного походження [24]. Більшість речовин, синтезованих актиноміцетами, мають антибіотичні властивості. Крім того, ці мікроорганізми синтезують й інші фізіологічно-активні метаболіти: амінокислоти, ферменти, вітаміни, фосфоліпіди, стерини, ненасичені жирні кислоти, фітогормони та інші, багато з яких виявляють ріст-стимулюючу дію [22, 23]. Вони здатні активно колонізувати коріння рослин, що дозволяє їм не тільки успішно захищати рослини від паразитів, але й стимулювати ріст і розвиток рослин.

Серед біологічних антипаразитарних засобів особливий інтерес становлять препарати на основі авермектинового антибіотичного комплексу (продуцент *Streptomyces avermitilis*), які у наш час визнані найбільш ефективними проти паразитичних нематод, кліщів і шкідливих комах. На основі авермектину створено ряд препаратів, які використовують як біопестициди для регуляції чисельності екзо- і ендopаразитів рослин, у тому числі і нематод. Це – Фітоверм, Формации (Аверсект-2), Аверсектин С, Універм, Еквісект (Росія); Івермектин, Івомек, Еквалан, Дорамектин, Аба-мектин, Зімактрин (США) та інші [27]. На основі українського штаму *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 – продуценту авермектину нами розроблено новий препарат Аверком, який, на відміну від існуючих комерційних препаратів, характеризується не тільки антипаразитарною, але й фітостимулювальною дією [13, 16].

Відомо, що для підвищення стійкості рослин до патогенів використовують еліситори. До них відносять метаболіти паразитів або їхніх рослин-господарів (полісахариди, білки, поліпептиди, глікопротеїни, ліпідвмісні сполуки та ін.); вони виявляють свою активність у дуже малих концентраціях [13, 28]. Як еліситори можуть виступати також органічні кислоти – арахідонова, ацетил-саліцилова, жасмонова, ізо-нікотинова, та хітозан з молекулярною масою 5 кДа. Наразі еліситори використовують для захисту від хвороб багатьох овочевих, зернових і технічних культур [13, 29]. На їхній основі створено широко відомі препарати Імуноцитофіт (діюча речовина – арахідонова кислота) і Агрохіт (діюча речовина – хітозан, 5 кДа) [25, 27]. Застосування еліситорів, отриманих на основі *Phytophthora infestans*, позитивно впливало на стійкість томатів до галової нематоди *M. incognita*. Арахідонова кислота і водорозчинний хітозан ефективно підвищували стійкість томатів і огірків до *M. incognita*, а також картоплі – до цистоутворюючої нематоди *Globodera rostochiensis* [29]. Оскільки еліситори підвищують стійкість рослин до фітопатогенів, з'являється унікальна можливість обробляти ними не тільки саму рослину, але й насіння [13, 29].

Як показали результати наших досліджень, ефективним виявилось поєднання Аверкому з еліситором хітозаном, що підсилює антинематодну дію препарату Аверком-нова.

На часі у світі також ведеться активний пошук серед стрептоміцетів різних штамів – антагоністів нематод [22, 24, 30]. Наприклад, в Япо-



нії з ґрунту виділений штамп *S. lavendulae* SANK 64297, який синтезував водорозчинний макроциклічний антибіотик з молекулярною формулою  $C_{31}H_{56}N_6O_{15}P_2$ . У вегетаційних дослідках було показано, що обробка цим антибіотиком личинок *Meloidogyne* другого віку впродовж 24 годин повністю інгібувала їхню здатність уражувати рослини огірка. Встановлено, що механізм антагоністичної дії цієї субстанції полягає у пригніченні біосинтезу протеїнів на транскрипційному рівні [31, 32].

Культуральна рідина *S. sampsonii* KK1024, виділеного з панциру краба, проявляла високу хітинолітичну, протеазну і ліпазну активності. За використання її 50 %-го розчину на третю добу дії спостерігали 81,67 % загибелі личинок галової нематоди *M. incognita*. Тоді як за використання лише очищених вищенаведених ферментів у концентрації 183,7 мкг/мл загибель нематод на третю добу становила 96,00 % [33]. Порівнюючи ці результати з отриманими нами даними, слід зазначити, що за дії водних розчинів етанольних екстрактів біомаси *S. avermitilis* ІМВ Ас-5015 та *S. violaceus* ІМВ Ас-5027 вже на 24 годину спостерігалась 100 % загибель нематод *M. incognita*, що свідчить про їх більш високу нематидидну ефективність.

За літературними даними, штамп *S. netropsis* SD-07 синтезує полієновий макролідний антибіотик з антифунгальною активністю [34], а *S. netropsis* AN 110065 проявляє також антагонізм відносно фітопаразитичних нематод [35]. У наших дослідженнях виділений штамп *S. netropsis* ІМВ Ас-5025 проявляв лише незначну нематистатичну активність.

Іншими вченими при аналізі 25 ізолятів актиноміцетів було виділено штамп *Streptomyces* sp. KPS-K004, за використання спорової суспензії якого знижувалось ураження тепличних рослин мелойдогінозом на 55,8 %, а за використання культурального фільтрату – на 62,4 %, при цьому знижувалась здатність галових нематод *M. incognita* проникати в корені рослин [36].

У закритому та відкритому ґрунтах показана антинематодна дія культуральних фільтратів *S. fradiae* та *S. nigrifaciens*, отриманих на оптимізованих живильних середовищах, як потенціальних агентів біоконтролю галових нематод *M. incognita* на томатах [37].

Роботами багатьох дослідників показано, що метаболіти стрептоміцетів є досить перспективним джерелом нових хімічних речовин для регуляції чисельності фітонематод [38, 39, 40]. Так фервенулін 1, відомий також як планоміцин, є кристалічною речовиною жовтого кольору, яка раніше була виділена із *S. fervens*, *Streptomyces* sp. СМУ-МН021 [41] та проявляє широкий спектр біологічної активності: антибактеріальну, протигрибкову, протипухлинну, антипаразитарну. Остання проявляється у значному зниженні чисельності личинок нематод 2-го віку *M. incognita* та кількості яєць [41].

Інша сполука із *Streptomyces* sp. СМУ-МН021 була ідентифікована як 6,8-дигідрокси-3-метил ізокумарин, раніше була виділена також із *Streptomyces* sp. GT06J089 та *Streptomyces* sp. TN97 [41]. Ця сполука проявляла значну противірусну, антимікробну активності та слабкий нематидицидний ефект. Із *Streptomyces* sp. СМУ-МН021 було виділено дві сполуки, які проявляють різні антинематодні ефективності. Тобто один продуцент може синтезувати декілька сполук різноманітних за природою та спектром дії. У Таїланді селекціоновано штамп *S. raseovorticillatus* СМУ-МУ021, здатний

синтезувати фервентулін і ізокумарин, які проявляли антинематодну активність у різній мірі [42].

У наших дослідженнях показано, що із виділених шести фракцій антибіотичного комплексу *S. violaceus* ИМВ Ас-5027 п'ять проявляли антинематодну активність, але найбільш ефективними нематодицидами були 4-а та 5-а фракції, які спричиняли загибель личинок галлової *M. incognita* та листкової роду *Aphelenchoides* нематод більше 90 %.

Таким чином, порівняння антинематодної активності відомих у літературі продуцентів р. *Streptomyces* свідчить, що *S. avermitilis* ИМВ Ас-5015 і *S. violaceus* ИМВ Ас-5027 та метаболітні біопрепарати, розроблені на їх основі – Аверком, Аверком-нова і Віолар – не поступаються за ефективністю своєї дії і мають високий потенціал бути використаними як агенти біологічного контролю проти галлової *M. incognita*, бурякової цистоутворюючої *H. schachtii* та листкової роду *Aphelenchoides* нематод.

**Л.А. Белявская, Т.А. Галаган, Г.А. Иутинская**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

#### **АНТИНЕМАТОДНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПОЧВЕННЫМИ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ**

##### Резюме

**Цель.** Исследовать антинематодную активность метаболитов почвенных стрептомицетов и биопрепаратов на их основе против галловой, цистообразующей и листовой нематод в системе *in vitro*. **Методы.** Действие метаболитов стрептомицетов и биопрепаратов определяли в системе *in vitro* на личинках 2 возраста галловой нематоды *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949 и свекловичной цистообразующей нематоды *Heterodera schachtii* A. Schmidt 1871, а также листовой нематоды рода *Aphelenchoides* путем их культивирования в растворах этанольных экстрактов биомассы, отдельных метаболитов и биопрепаратов в течение 24 часов. Нематодицидный и нематостатический эффекты исследуемых образцов оценивали по изменению двигательной активности нематод. **Результаты.** Почвенные стрептомицеты *Streptomyces violaceus* ИМВ Ас-5027, *S. avermitilis* ИМВ Ас-5015 и метаболитные биопрепараты на их основе (Виолар, Аверком и Аверком-нова соответственно) проявляли значительную нематодицидную активность в отношении фитопатогенных нематод *M. incognita* и *H. schachtii* и вызвали их гибель после 24 часов воздействия на 96,8–100 %. *S. netropsis* ИМВ Ас-5025 и биопрепарат на его основе Фитовит проявили низкую нематодицидную активность в отношении обоих видов нематод. **Вывод.** Почвенные стрептомицеты *S. violaceus* ИМВ Ас-5027, *S. avermitilis* ИМВ Ас-5015 являются перспективными продуцентами для создания биопрепаратов, которые проявляют нематодицидную активность в отношении фитопаразитических нематод *M. incognita* и *H. schachtii*.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** почвенные стрептомицеты, метаболиты, биопрепараты, фитонематоды, нематодицидная активность.

## ANTINEMATICIDAL ACTIVITY OF METABOLITES PRODUCED BY SOIL STREPTOMYCETE

### Summary

**Goal.** To study *in vitro* the antinematode activity of soil streptomycetes metabolite and bioformulations based on them against root-knot, cyst and leaf nematodes of species. **Methods.** Action of streptomycetes metabolites and their bioformulations were determined *in vitro* against larvae at two age of root-knot nematode *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949 and sugar beet cyst nematode *H. schachtii* A. Schmidt 1871, and leaf nematodes of *Aphelenchoides* genus by cultivation them in solutions of biomass ethanol extracts separate individual components metabolites and bioformulations during 24 hours. Nematicide and nematostatic effects of the substances were evaluated by the change in the motility activity of the nematodes. **Results.** Soil streptomycetes *S. violaceus* IMV Ac-5027, *S. avermitilis* IMV Ac-5015 and metabolite bioformulations based on them (Violar, Avercom and Avercom-nova, respectively) showed significant nematicidal activity against plant pathogenic nematodes *M. incognita* and *H. schachtii*. The biomass extracts of *S. avermitilis* IMV Ac-5015 and *S. violaceus* IMV Ac-5027 caused 100 % death of nematodes, and *S. netropsis* IMV Ac-5025 caused only 75 % mortality during 24 hours of action. Using an antibiotic complex from *S. violaceus* IMV Ac-5027 was divided on six fractions that were different from the avermectin complex. Purified fractions of individual antibiotic complex of *S. violaceus* IMV Ac-5027 have a negative impact against the root-knot nematode *M. incognita*. The highest nematicidal activity showed fractions #4 and #5 since their efficiency was over 90 % after a 0.5 hours of action. Nematicidal efficiency of fractions ## 1, 2, 3 and 6 remained between 72.6–86.2 % during 24 hours of action. Fractions 4 and 5 showed high nematicidal effectiveness against leaf nematodes of *Aphelenchoides* genus where 90–95 % level of helminthes death was observed after 4 hours of action. Among created complex metabolite bioformulations Avercom-nova was the most effective which caused 100 % mortality of nematodes *M. incognita* and *H. schachtii* after 24 hours of action. Bioformulation Violar caused 96.6–96.8 and 95.2–97.0 % of death of nematodes *M. incognita* and *H. schachtii*, after 24 hours of action. Phytovit based on *S. netropsis* IMV Ac-5025 showed low nematicide activity against of nematodes, which did not exceed 15.2–18.4 % of their death after 24 hour of action. Bioformulations based on streptomycetes metabolites did not inferior to chemical insecticide Konfidor Maxi, which caused the death of 93.3–94.6 % nematodes at doses recommended by the manufacturer. **Conclusion.** Soil streptomycetes *S. violaceus* IMV Ac-5027 and *S. avermitilis* IMV Ac-5015 are promising producers for creation of bioformulations with nematicidal activity against plant-parasitic nematode of *M. incognita* and *H. schachtii*.

*Key words:* soil streptomycete, metabolites, bioformulations, phytonematodes, nematicide activity.

1. Collange B., Navarrete M., Peyre G., Mateille N. Tchamitchian M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop protection*. 2011; **30**: 1251–1262.

2. Ford C. Market Research Head at Marketsandarkets. 2014. <http://www.marketsandarkets.com/pdfdownload.asp?id=193252005>.
3. Chubachi K., Furukawa M., Fukuda S., Matsumura S., Yanagisawa T., Itagawa H., Nakagawa A. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol science*. 2002; 7: 25–29.
4. Biliavska L.O., Pidlypska V.A., Kozyriska V.Y., Iutynska G.A. Biosynthetic activity of soil streptomycetes – antagonists of plan-parasitic nematodes and phytopathogens. *Proceedings of the 4th European Conference on Biology and Medical Sciences. «East West» Association for Advanced Studies and Higher Education GmbH. Austria, Vienna*. 2015: 10–17.
5. Hussey R.S., Janssen G.J.W. Root-knot nematodes *Meloidogyne* species. In: Plant Resistance to Parasitic Nematodes. Eds.: J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge. United Kingdom: CAB International, 2002: 43–70.
6. Stevens M., May M.J. Pests, diseases and weeds review 2009. *British Sugar Beet Review*. 2010; 78 (1): 7–10.
7. New plant growth regulators: basic research and technologies of application. Ed. S.P. Ponomarenko, G.O. Iutynska. Kyiv: Nichlava, 2011. 211 p.
8. Warwick S.I. Brassicaceae in Agriculture. Chapter 2. In: Genetics and Genomics of the Brassicaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 9 / Eds. R. Schmidt, I. Bancroft. XII, (680 p.), (2011): 33–65. DOI 10.1007/978-1-4419-7118-0\_2, Springer Science+Business Media, LLC 2011. <http://www.springer.com/978-1-4419-7117-3>
9. Krechel A., Faupel A., Hallmann J., Ulrich A., Berg G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential toward plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid&White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*. 2002; 48: 772–786.
10. Genilloud O., Ganzalez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2011; 38 (3): 375–389.
11. Biliavska L.A., Efimenko T.A., Efremenkova O.V., Koziriska V.Ye., Iutynska G.A. Identification and antagonistic properties of the soil streptomycete *Streptomyces* sp. 100. *Microbiologichny zhurnal*. 2016; 78 (2): 27–38.
12. Tsygankova V.A., Andrushevich Ya.V., Biljavskaya L.A., Kozyriska V.E., Iutynska H.O., Galkin A.P., Galagan T.O., Boltovskaya O.V. Growth Stimulating, Fungicidal and Nematicidal Properties of New Microbial Substances and Their Impact on si/miRNA Synthesis in Plant Cells. *Microbiologichny zhurnal*. 2012; 6: 36–46.
13. Biliavska L.A., Kozyriska V.E., Kolomiets Y.V., Babich A.G., Iutynska G.O. Phytoprotective and growth-regulatory properties of bioformulations on the base of soil streptomycetes metabolites. *Dopovidi NANU*. 2015; 1: 131–37.
14. Valagurova E.V., Kozyriska V.E., Iutynska G.A. Actinomycetes of *Streptomyces* genus. Description of species and computer program of their identification. Kyiv: Naukova dumka, 2004. 648 p.
15. Biliavska L.A., Galagan T.A., Boltovskaya E.V., Kozyriska V.E., Valagurova E.V., Sigareva D.D., Iutynska G.A. Antinematicidal properties of *Streptomyces avermitilis* – UCM Ac-2179 and it's avermectin complex of Avercom. *Stiinta Agricola*. 2009; 1: 29–33.

16. Biliavska L.O., Kozyriska V.E., Valagurova O.V., Iutynska G.O. Biologically active substances of new microbial preparation Avercom. *Microbiologichny zhurnal*. 2012; 74 (3): 10–15.
17. Biliavska L.A., Efremenkova O.V., Zenkova V.A., Koziriska V.Ye., Iutynska G.A. Soil streptomycete *Streptomyces netropsis* as a producer of substances with fungicidal action. *Current Mycology in Russia*. 2015; 5: 175–178.
18. Viglierchio D.R., Schmitt R.V. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann funnel modifications. *J. Nematology*. 1983; 15: 438–444.
19. Coyne D.L., Nicol J.M., Claudius-Cole B. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, IITA, Cotonou, Benin, 2007. 84 p.
20. PM 7/119 (1) Nematode extraction. EPP0 Bulletin 43. 2013; 43 (3): P. 471–495.
21. Patent 69639A Ukraine, C12N1/20 №2003109795 / Iutynska G.O., Kozyriska V.E., Biliavska L.A., Petruk T.V. *Streptomyces avermitilis* strain – producer of avermectins, substances of antiparasitic action. *Bull.* 2004; 9.
22. Pandey A., Ali I., Butola K.S., Chatterji T., Singh V. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from soil and evaluation of antibacterial activities of *Actinomycetes* against pathogens. *J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2011; 2 (4): 384–392.
23. Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G., Nilanjan D. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *Eur. J. Exp. Biol.* 2012; 2 (1): 163–173.
24. Valli S., Suvathi S.S., Aysha O., Nirmala P., Vinoth K.P., Reena A. Antimicrobial potential *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012; 2 (6): 469–473.
25. Tretyakov A.P., Kruchina S.N., Stirmanova N.I., Sodomov V.E. The use of microbiological preparations against root-knot nematodes in greenhouses. *Agrokimiya*. 1997; 6: 67–70.
26. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 71 (3): 495–548.
27. Jayakumar J. *Streptomyces avermitilis* as a biopesticide for the management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato. *Karanka Journal of Agriculture Science*. 2009; 22: 564–566.
28. Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., and Van Wees S.C.M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*. 2009; 5 (5): 308–316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377457>
29. Molinari S. Salicylic acid as an elicitor of resistance to root-knot nematodes in tomato. *Acta Hort.(ISHS)*. 2008; 789: 119–126.
30. Sun M.H., Gao L., Shi Y.X., Li B.J., Liu X.Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females China and their biocontrol potential. *J. Invertebr. Pathol.* 2006; 93: 22–28.
31. Takatsu T., Horiuchi N., Ishikawa M., Wanibuchi K., Moriguchi T., Takahashi S. 1100-50, a novel nematocide from *Streptomyces lavendulae* SANK 6497. *J. of Antibiotics*. 2003; 56 (3): P. 306–309.
32. Samuel B. Orisajo Effect of Plant-Parasitic Nematodes Associated with Tea in Nigeria. *African Journal of Basic & Applied Sciences*. 2013; 5 (4): 184–187.

33. Kim S.S., Kang S.I., Kim J.S., Lee Y.S., Hong S.H., Naing Kyaw Wai, Kim K.Y. Biological Control of Root-knot Nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Han'guk Toyang Biryo Hakhoe Chi*. 2013; 44 (6): 33–39.
34. Jin J.-I., Wang C., Lei T., Gao P.-J. Isolation and classification of *Streptomyces netropsis* strain SD-07 which produces polyene macrolide antibiotics with broad-spectrum and high antifungal activity. *Journal of Shandong University (Natural Science)*. 2009; 5: 34–48.
35. Jang J.Y., Kim J.-C., Choi Y.H., Joo Y.-J., Kim H., Jang K.S., Choi G.J., Kim C.-J., Cha B., Park H.W. Characterization of *Streptomyces netropsis* Showing a Nematicidal Activity against *Meloidogyne incognita*. *Research in Plant Disease*. 2015; 21(2): 50–57.
36. Chubachi K., Furakawa M., Fukuda S., Takahashi S., Matsumura S., Itagawa H., Shimizu T., Nakagawa A. Control of root-knot nematodes by *Streptomyces*: screening of root-knot nematode controlling actinomycetes and evaluation of their usefulness in a pot test. *Nihon Senchu Gakkai Shi*. 1999; 29: 42–45.
37. Rajeswari M., Ramakrishnan S. Influence of *Streptomyces fradiae* against Root knot nematode *Meloidogyne incognita* in Tomato. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*. 2015; 3(1): 6–11.
38. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot*. 2005; 58 (1): 1–26.
39. Tang Y.Q., Sattler I., Thiericke R., Grabley S., Feng X.Z. Parallel chromatography in natural products chemistry: isolation of new secondary metabolites from *Streptomyces* sp. In: Proceeding of the fourth international electronic conference on synthetic organic chemistry. 2000 <http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm>
40. Zhang J., Wang L.M., Li Y.H., Ding S.L., Yuan H.X., Riley I.T., Li H.L. Biocontrol of cereal cyst nematode by *Streptomyces anulatus* isolate S07. *Australasian Plant Pathology First online*. 2015; 29(4): 663–665.
41. Ruanpanun P., Laatsch H., Tangchitsomkid N., Lumyong S. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011; 27: 1373–1380.
42. Ruanpanun P., Tangchitsomkid N., Hyde K.D., Lumyong S. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010; 26: 1569–1578.

Отримано 16.02.2016