

NOVÝ ZPŮSOB PRODLOUŽENÍ DOBY POUŽITELNOSTI BIOPREPARÁTŮ NEMACID A AURIN S VYUŽITÍM PREPARÁTU LIGNOHUMÁT

I. N. Feklistova¹, D. B. Maslak¹, N. P. Maximova¹,
¹ Běloruská státní univerzita

Jedním z aktuálních biotechnologických úkolů současné doby je vytváření efektivních a bezpečných biologických prostředků ochrany rostlin v boji proti onemocněním zemědělských plodin během jejich pěstování. Je třeba říci, že biopesticidní preparáty mají ve srovnání s chemickými pesticidy na základě živých bakteriálních kultur řadu předností: jsou polyfunkční (efektivní ve vztahu k širokému spektru fytopatogenů a nematod, schopné stimulovat růst rostlin a zlepšovat jejich minerální výživu a rovněž u nich indukovat systémovou stabilitu k původcům nemoci). Kromě toho, mají biologické preparáty prodlouženou dobu působení, protože v nich obsažené mikroorganismy jsou schopny osidlovat rhizosféru a fylosféru rostlin a aktivně se rozmnožovat během jejich vegetace; jsou považovány za ekologicky bezpečné (patří mezi preparáty bakteriálních antagonistů, jsou přirozenými obyvateli rhizosféry a fylosféry rostlin), nemění složení agrobiocenózy, nejsou škodlivé pro člověka, zvířata ani rostliny. Analogické vlastnosti mají rovněž preparáty, získávané jako produkty při zpracování rašeliny, které ve vztahu k rostlinám mají vysokou růstovou stimulační aktivitu a rovněž plní ochrannou funkci před některými patogeny.

Jako základ pro vytváření biopesticidních preparátů jsou zvláště perspektivní rhizosférické bakterie rodů *Pseudomonas*, syntetizující, jak je známo, antibiotika, siderofory, hydrolytické fermenty atd., určující schopnost bakterií efektivně potlačovat rozvoj původců tak nebezpečných onemocnění zemědělských plodin jako jsou hniloby kořenových krčků obilovin i dalších plodin, cévní a parenchymatické poškození brambor a zelí, popáleniny listů, skvrnitost plodů, bakteriální rakovina, nekrózy kůry atd. [1, 2]. Kromě toho, některé kmeny *Pseudomonas* mají akaricidní účinek – jsou schopny potlačovat rozvoj nematod *Ditelenchus destructor*, *Globodera rostochiensis* a *Aphelenchoides asterocaudatus*) [3].

Nedávno jsme na základě bakterií rodu *Pseudomonas* vyvinuli nové biopesticidní preparáty Nemacid (TU VU 300042160.011-2009), Aurin (TU VU 300042160.012-2009), určené jak pro ochranu zemědělských plodin před fytopatogeny, tak ke stimulaci růstu rostlin. V průběhu zkoušek uvedené biopreparáty vykazovaly vysokou efektivitu použití, avšak jejich podstatným nedostatkem je, krátká doba použitelnosti (2-3 měsíce při pokojové teplotě), což omezuje objem výroby a délku realizace produkce.

Je známo, že sloučení biopreparátů na základě živých kultur mikroorganismů a preparátu „Lignohumát“ (huminové hnojivo s mikroprvky v chelátové formě s vlastnostmi regulátoru růstu a antistresoru) vede k prodloužení doby použitelnosti biopreparátů (<http://www.amagro.com>).

Výraznou předností technologií založených na využívání bakteriálních a huminových preparátů, je snížení nákladů na chemické prostředky pro ochranu rostlin, a jejich přihnojování. Nemálo důležité je, že přitom je řešen komplex ekologických problémů, podmíněný rozvojem intenzivního zemědělství. Převedení jednotlivých odvětví zemědělské výroby na nezávadnou úroveň, která předpokládá, že do praxe jsou zaváděny nové technologie pěstování a ochrany zemědělských plodin s využitím biologických metod, je základním postupem pro zlepšení ekologické situace a získávání ekologicky čisté produkce.

Cílem této práce je vývoj nového způsobu prodloužení doby použitelnosti biopesticidů Nemacid a Aurin s využitím preparátu Lignohumát.

Materiály a metody

Schopnost bakterií *Pseudomonas aurantiaca* B-162 a *Pseudomonas putida* U potlačovat růst fytopatogenních mikroorganismů byl zkoumán s použitím metody „odloženého antagonizmu“ [5].

Výzkumy k vyhodnocení efektivity preparátu Aurin při ochraně okurek před nemocemi byly provedeny ve středisku skleníkového hospodářství republikového unitárního experimentálně-zkušebního zemědělského podniku „Voschod“ v Minském okrese, na odrůdě „Kompanist“. Testování bylo čtyřikrát opakováno, testovací plocha – 15 m². Preparát byl použit dle následujícího schématu: postřik sadby ve fázi 2-3 pravých listů 1 % suspenzí preparátu (spotřeba pracovního roztoku - 3 l/m²); při objevení prvních příznaků nemoci byl proveden 3 krát postřik v intervalu 7-10 dnů 1% suspenzí preparátu (spotřeba pracovního roztoku - 1000 l/ha).

Hodnocení efektivity preparátu Aurin při ochraně rajčat před šedou hnilobou (stonková forma) bylo provedeno v minském oblastním unitárním podniku „Staro-Borisov“, Borisovského okresu v Minské oblasti na rajčeti odrůdy Brooklyn. Testování bylo čtyřikrát opakováno, testovací plocha – 15 m². Schéma použití preparátu zahrnovalo postřik sadby ve fázi děložních listů a za 3 dny po pikýrování 1% suspenzí preparátu (spotřeba pracovního roztoku - 3 l/m²) při objevení prvních příznaků šedé hniloby byl proveden 3 krát postřik v intervalu 7-10 dnů 1% suspenzí preparátu (spotřeba pracovního roztoku - 1000 l/ha).

Schéma k vyhodnocení biologické efektivity biopreparátu Nemacid: semena okurek se vysazují do sterilní půdy a pěstují do stádia 1-2 pravých listů, po té jsou přenesena do půdy nakažené nematodou. Během výsadby se rostliny ošetřují preparátem Nemacid v ředění 1:100 zaléváním do jamky. Ve vegetačním období se rostliny dvakrát ošetří preparátem Nemacid zaléváním ke kořenům v ředění 1:1000 v intervalu 2 týdnů. Vyhodnocení efektivity preparátu je prováděno za 30 dní ode dne výsadby rostlin do půdy nakažené nematodou.

Jako hodnotící kritérium životaschopnosti bakterií při uskladnění s preparátem Lignohumát posloužil titer buněk – to jest množství buněk stanovené standardní metodou. Výsevy ze směsi se prováděly na povrch agarizovaného substrátu na základě hydrolyzátu šprotů, inkubovaly při 28° C po dobu 24 hod. Zkoušky se prováděly s trojím opakováním.

Výsledky a jejich posouzení

V sérii předběžných výzkumů bylo stanoveno, že bakterie *P. aurantiaca* B-162 jsou schopny potlačovat vegetativní a generativní funkci fytopatogenních hub patřících k rodům *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* a *Botrytis* (kmen 21), a rovněž růst všech fytopatogenních kultur bez výjimky: *E. aroideae*, *E. carotovora*, *P. atrofaciens*, *P. glycinea*, *P. lachrymans*, *P. lupine*, *P. pisi*, *P. syringae*, *P. vignae*, *P. xanthochlora* (kmen 42) [5].

Je známo, že antimikrobní aktivita bakterií rodu *Pseudomonas* je podmíněna schopností syntetizovat antibiotika různé struktury: acyklická, aromatická, beta-laktamová antibiotika, deriváty chinolinu, aminoglykosidy a další. Při tom více než polovinu z celkového počtu antimikrobních sloučenin syntetizovaných bakteriemi *Pseudomonas* a majících široké spektrum účinnosti ve vztahu k patogenním bakteriím a houbám, tvoří antibiotika fenazinové řady [1, 6]. V následující etapě bylo s využitím HPLC-analýzy stanoveno, že komplex fenazinových antibiotik bakterií *P. aurantiaca* B-162 je představován fenazinem, 1-oxifenazinem a jejich společným předchůdcem je fenazin-1,6- dikarboxylát [7]. Dále s využitím NH⁻¹ mutagenese a následným odběrem na toxických analozích aromatických metabolitů byly získány regulační analogorezistentní mutanty kmene B-162, schopné hyperprodukce antibiotik fenazinové řady. Nejvyšší úroveň syntézy fenazinových sloučenin byla zaregistrována u mutanta B-162/498,

¹ poznámka překladatele: ruská písmena „HI“ přepsána transkripcí přepis do latinky je možný buď jako „NH“ nebo jako „NG“

činila $205,32 \pm 1,91$ mg/l, což převyšuje úroveň syntézy výchozího kmene 2,8–3 krát a 10 krát u bakterií *P. chlororaphis* a *P. aeruginosa* v tomto směru známých. Na základě mutantních bakterií *P. aurantiaca* B-162/498 byl vytvořen polyfunkční preparát Aurin, určený k ochraně rostlin a stimulaci jejich růstu. [5].

Byly provedeny zkoušky biologického preparátu Aurin při ochraně okurek a rajčat před nemocemi ve skleníku. Analýza fytopatologické situace během vegetace okurek ukázala, že rostliny byly napadány hnilobou kořenů, bílou hnilobou a alternariózou. Použití preparátu napomáhalo snížení výskytu hniloby kořenů o 24-31 % a rozvoje nemoci o 14-30 %. Ve variantách s použitím Aurinu se výskyt a rozvoj bílé hniloby plodů snížil o 10 a 42 % [8]. Poněkud nižší byla efektivita preparátu u alternariózy - výskyt a rozvoj nemoci se snížil o 10 a 12,8 %.

Vyhodnocení fytopatologické situace ukázalo, že preparát Aurin vykazoval ochranné působení na rajčatech, co se týče šedé hniloby (stonková forma) (tabulka 1). Biologická efektivita preparátu Aurin při ochraně rajčat před šedou hnilobou činila 45,7–45,9 %.

Tabulka 1 Vliv preparátu Aurin na rozvoj šedé hniloby u rostlin rajčat

Varianta	Rozšířenost v %	Rozvoj nemoci v %
Kontrola	29	15
Brooklyn - exper.	16	8

Je třeba konstatovat, že kromě antagonistické aktivity je preparát Aurin schopen rovněž stimulovat růst a vývoj rostlin: při jeho aplikaci do půdy je pozorována stimulace růstu výhonů 1,45 krát a kořenového systému 1,19 krát (věk rostlin 2 měsíce) [9]. Je známo, že stimulace růstu rostlin může být vyvolána syntézou bakteriemi gibberellinů, auxinů a cytokininů a rovněž vitaminů skupiny B. Bylo stanoveno, že úroveň syntézy gibberellinů bakteriemi *P. aurantiaca* B-162/498 je $13,2$ $\mu\text{g/ml}$ a auxinů – $6,54 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$. Kromě toho, bakterie *P. aurantiaca* B-162/498 jsou schopny aktivní kolonizace kořenů a jsou charakteristické vysokou schopností přežití v rhizosféře. Takže kromě antifungální aktivity je preparát Aurin rovněž schopen stimulovat růst a vývoj rostlin.

Kromě Aurinu jsme vyvinuli vysoce aktivní fytoprotektorový biopreparát Nemacid, určený k ochraně zeleninových plodin před háčkovou (Cecilovou) nematodou. Základ preparátu tvoří fluoreskující rhizosférické bakterie *P. putida* U.

Již dříve bylo ukázáno, že bakterie *P. putida* jsou rhizosférickými mikroorganismy s vyjádřenou antibakteriální, antifungální a antinematodní aktivitou, a že mají rovněž stimulační působení na růst a vývoj hostitelských rostlin. [10]. Bylo zjištěno, že tyto bakterie jsou schopny syntetizovat a vylučovat do prostředí zelenožlutý fluoreskující pigment pyoverdin P_m , jenž plní funkci sideroforu [11]. Při tom pyoverdin P_m může vytvářet pevný komplex s ionty železa a převádět je, na pro jiné mikroorganismy (bakterie a houby), nedostupnou formu a tímto způsobem rostliny chránit před infikováním fytopatogeny. Antimikrobní aktivitu pyoverdinu P_m jsme zkoumali metodou "odloženého antagonizmu" Provedené výzkumy ukázaly, že mutantní kmeny *P. putida*, nesyntetizující pyoverdin P_m neprojevují antibakteriální aktivitu.

Za pomoci NH-mutageny a následujícího výběru v prostředích obsahujících EDTA byl získán mutantní kmen *P. putida* U, u níž je zvýšená produkce pyoverdinu P_m v přítomnosti iontů železa. [12].

K analýze účinnosti preparátu na snížení invaze háčkové (Cecilové) nematody na rostlinách okurek byla provedena zkouška v podmínkách fytotronu. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tabulce č. 2. Registrační zkoušky provedené v KSUP² „Světlogorskaja ovoščajnaja fabrika“ v Gomelské oblasti a v DP³ „Svisločskaja selchozťechnika“ v Grodněnské oblasti, potvrdily dříve obdržené údaje.

² pozn. překl. КСУП = коммунальное сельскохозяйственное унитарное предприятие = KSUP = Komunální zemědělský unitární podnik

³ pozn. překl. ДП = дочернее предприятие = Dceřiný podnik = DP

Tabulka 2

Vliv preparátu Nemacid na rozvoj hálkové (Cecilové) nematody⁴

Varianta *	Výskyt v %	Intenzita nákazy v bodech	Rozvoj nemoci v %
Rodniček exper.	33	1,4	23,3
Rodniček K1	-	-	-
Rodniček K2	100	2,3	58,3
Elize exper.	40	1,3	26,7
Elize K1	-	-	-
Elize K2	100	2,6	65

*Poznámka: Kontrola 1 (K1) – rostliny byly pěstovány v půdě bez nematody a ošetřovány odpovídajícím množstvím vody. Kontrola 2 (K2) – rostliny byly pěstovány v půdě s nematodou a ošetřovány odpovídajícím množstvím vody. Exper. - rostliny byly pěstovány v půdě s nematodou a ošetřovány preparátem Nemacid.

Z výsledků provedeného experimentu uvedených v tabulce č. 2 je vidět, že ošetření preparátem Nemacid v laboratorních podmínkách dovoluje snížit napadení rostlin okurek hálkovou (Cecilovou) nematodou o 60% u odrůdy Elize a o 67 % u rostlin odrůdy Rodniček. Při tom se snížila jak intenzita napadení rostlin - 2 krát a 1,6 krát podle odrůdy, tak rozvoj nemoci o 38,3 % a 35 %.

Preparáty Nemacid a Aurin (podle TU VU) se skladují v suchých prostorech chráněných před atmosférickými srážkami, při maximální teplotě +10° C a minimální teplotě +4° C, jako stabilizátor se používá 0,5 % natrium-benzoát. Avšak skladování velkých objemů preparátů v chladících boxech je neúčelné a v důsledku toho vznikla nutnost prodloužení doby použitelnosti biopreparátů v teplotním režimu od + 10° C do +22° C.

Byly provedeny zkoušky životaschopnosti bakterií *P. aurantiaca* B-162/498 a *P. putida* U, které jsou základem biopreparátů Aurin a Nemacid, při skladování ve směsi s Lignohumáty. V práci byly použity preparáty Lignohumátu následujících značek: B a BM draselný, B a BM sodný a VM-NPK draselný, hodnota pH byla před tím upravena na 6,5-7,0 a sterilizovali jsme v autoklávu při 0,5 atm po dobu 30 min. Lignohumáty značek B představují 20% vodní roztok sodných nebo draselných solí huminových látek, Lignohumáty značky BM představují vodní roztok sodných nebo draselných solí huminových látek s mikroprvky, Lignohumát značky VM-NPK představuje 12% vodní roztok draselných solí huminových látek s mikroprvky a makroprvky – dusíkem, fosforem a draslíkem. Lignohumát má v Bělorusku státní registraci č. 11-07-0006, osvědčení č. 740. Pro skladování biopreparátu jsme Aurin a Nemacid mísili s preparáty Lignohumátu (konečná koncentrace 0,5 % a 1,5 %).

Vzorky jsme skladovali při pokojové teplotě po dobu 7 měsíců.

Výsledky zkoušek jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

⁴ v ruš.: мела́йдогиноз, správněji zřejmě мелойдогиноз“. Další názvy: *Meloidogyne marioni*, *Meloidogyne marioni* Corni, *Meloidogyne inkognita*, *Meloidogyne spec*, *Meloidogyne spp*

Tabulka 3 Životaschopnost bakterií *P. putida* U ve směsi s Lignohumáty

Způsob uskladnění	Procento životaschopných buněk						
	1 měs.	2 měs.	3 měs.	4 měs.	5 měs.	6 měs.	7 měs.
+ voda 0,5 %	2	4,6	2,9	5,5	1,8	0,4	0,9
+ B draselný 0,5 %	5,8	5,4	4,8	3,7	2,9	1,1	0,9
+ B draselný 1,5 %	20,0	19,4	17,8	15,5	14,6	9,2	3,5
+ BM draselný 0,5 %	7,3	7,0	5,5	4,4	3,5	2,1	1,4
+ BM draselný 1,5 %	22,4	19,9	16,6	16,1	15,5	10,1	5,4
+ B sodný 0,5 %	4,8	4,1	3,6	2,9	2,5	1,5	1,1
+ B sodný 1,5 %	30,1	27,1	24,8	19,9	19,3	18,7	10,0
+ BM sodný 0,5 %	2,7	2,4	2,1	1,9	1,5	1,1	0,7
+ BM sodný 1,5 %	24,4	23,5	22,8	21,9	20,3	16,2	10,1
+ VM-NPK draselný 0,5%	4,7	7,4	4	3,9	2,5	0,1	1,1
+ VM-NPK draselný 1,5%	19,0	17,1	14,8	15,9	17,3	0,12	0,5

Poznámka: Výchozí titr činil $7,6 \times 10^9$ buněk/ml.

Tabulka 4 Životaschopnost bakterií *P. aurantiaca* B-162/498 ve směsi s Lignohumáty

Způsob uskladnění	Procento životaschopných buněk						
	1 měs.	2 měs.	3 měs.	4 měs.	5 měs.	6 měs.	7 měs.
+ voda 0,5 %	17	20	15,7	16,8	11,0	13	1,62
+ B draselný 0,5 %	82,1	81,4	69,9	53,1	39,5	10,5	1,63
+ B draselný 1,5 %	40,0	33,3	28,4	27,7	25,7	12,1	9,8
+ BM draselný 0,5 %	65,3	59,1	47,8	39,7	26,9	17,5	10,5
+ BM draselný 1,5 %	39,4	34,4	28,8	23,3	21,5	11,1	6,8
+ B sodný 0,5 %	71,1	69,3	57,4	49,9	39,5	21,1	11,6
+ B sodný 1,5 %	33,3	31,1	29,5	27,7	22,2	16,1	1,9
+ BM sodný 0,5 %	55,5	47,7	39,3	31,8	24,5	13,7	2,4
+ BM sodný 1,5 %	31,9	28,5	22,6	18,4	15,1	9,9	3,1
+ VM-NPK draselný 0,5%	90,1	83,3	77,2	63,2	49,4	14,4	1,6
+ VM-NPK draselný 1,5%	40,2	35,1	29,1	27,4	25,5	6,8	0,8

Poznámka: Výchozí titr činil $7,2 \times 10^9$ buněk/ml.

Jak je vidět z výsledků uvedených v tabulkách 3 a 4, životaschopnost buněk bakterií *P. putida* U a *P. aurantiaca* B-162/498 v přítomnosti Lignohumátů je vyšší, než při skladování ve standardních podmínkách. Buňky *P. putida* U, tvořící základ biopreparátu Nemacid, se uchovávají po dobu 6 měsíců při aplikaci Lignohumátu v konečné koncentraci 1,5 % – procento životaschopných buněk je od 9,2 do 18,7, kdežto buňky *P. aurantiaca* B-162/498 (základ preparátu Aurin) – při aplikaci Lignohumátu v konečné koncentraci 0,5 % (procento fyziologicky aktivních buněk je 10,5 - 21,1).

Takto byl vypracován nový způsob prodloužení doby použitelnosti biopreparátů Nemacid a Aurin, s použitím preparátu Lignohumát. Nejefektivnější je skladování preparátu Nemacid v přítomnosti Lignohumátu B sodný(1,5 %), pro Aurin je optimální aplikace Lignohumátů značek B sodný a BM draselný (0,5 %).

Seznam použité literatury

1. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Experiment. Botany.– 2001.– Vol. 52, № 1.– P. 487–511.
2. Dwivedi D., B.N. Johri. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation // Current Science.– 2003.– Vol. 85, № 12.– P. 1693–1703.
3. Siddiqui I.A., Haas D., Heeb S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* // Appl. Environ. Microbiol.– 2005.– Vol. 71, № 9.– P. 5646–5649.
4. <http://www.humate.spb.ru/>
5. Feklistova I. N., Maksimova N. P. Bakterie *Pseudomonas aurantiaca* B-162 jako základ biopreparátu pro ochranu rostlin // Zemljárovobstva i ačova raslin (Земляробства і ахова раслін).⁵– 2006.– № 2.– С. 42–44.
6. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. R.J. Cook, L.S. Thomashow, D.M. Weller e.a. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.–1995.– Vol. 92, № 10.– P. 4197–4201.
7. Feklistova I. N., Maksimova N. P. Obtaining *Pseudomonas aurantiaca* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics // Microbiology.–2008. –Vol. 77. – No. 2.– P. 176–180.
8. Prischepa L., Voitka D., Feklistova I., Maximova N. Bioproducts in the control of soil-borne pathogens under cover // Zeszyty problemowe Postępów Nauk Polniczych. – 2008. – Z. 529. – P. 149–154.
9. Feklistova I.N., Maximova N.P. Perspectives of gibberellin-producing *Pseudomonas* rhizobacteria application in agriculture // Plant growth substances: intracellular hormonal signaling and applying in agriculture: Abstracts 2nd international symposium, Kyiv, 8–12 october 2007 г.– P. 123.
10. Pat. 2051586 RF. Kmen bakterií *Pseudomonas putida* – biostimulátor růstu rostlin// Maksimova N. P., Lysak V. V., Ignatovič O.V., Fomičev J. K., č. 2051586. Příhl. 12.07.1991. Publik. 10.01.1996. 5s.
11. Maksimova N. P., Blaževič O. V., Lysak V. V., Fomičev J. K. – Charakteristika fluoreskujícího pigmentu pyoverdinu Pm *Pseudomonas putida* M // Mikrobiologija. 1994. sv. 63 č. 5. Str. 1038-1044. (stará práce, možná vyměnit za novou s Kulešovou).
12. Maksimova N. P. Genetické přístupy vytváření kmenů producentů biologicky aktivních sloučenin na základě rhizosférách bakterií *Pseudomonas* / Maksimova N. P., Chramcova E. A., Feklistova I. N., Kulešova J. M., Žardeckij S.S., Veremenko J.G.//Molekulární a aplikovaná genetika – 2008. –sv.8. – Str. 143–151.

Informace o autorech:

Feklistova, Irina Nikolajevna, CSc. – (kandidát botanických věd), vědecká spolupracovnice Vědecko-výzkumné laboratoře molekulární genetiky bakterií, Běloruské státní univerzity.

Maslak, Diana, Viktorovna - vědecká spolupracovnice Vědecko-výzkumné laboratoře molekulární genetiky bakterií, Běloruské státní univerzity.

Maksimova Natalja Pavlovna, DrSc – (doktor botanických věd), profesorka, vedoucí katedry genetiky Běloruské státní univerzity.

⁵ Pozn. překl.: orig. název je v běloruštině