

Н. Е. БЕКМАХАНОВА, О. Н. ШЕМШУРА, М. Н. МАЗУНИНА

НЕМАТИЦИДНАЯ И ИНСЕКТИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

(Представлена академиком НАН РК А. Н. Илялетдиновым)

Исследована способность микроскопических грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* продуцировать фенолокси кислоты. С использованием хроматографических методов и стандартных соединений выявлены фракции с высоким содержанием бензойной, галловой, ванилиновой и феруловой кислот. Установлена нематоцидная и инсектицидная активность фенолокси кислот в отношении нематод и личинок колорадского жука.

Физиологически активные вещества ароматической природы обладают широким спектром действия. Используются они в различных областях народного хозяйства: в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве, пищевой и нефтедобывающей промышленности [1–3]. Особенно возрос интерес к соединениям данной группы после установления возможности их применения в качестве модификаторов радиорезистентности и биоксидантов [4].

Полифенолы участвуют в окислительно-восстановительных процессах, в создании иммунитета растений, проявляют антигистаминовый эффект, уменьшают проницаемость капилляров и используются как сосудукрепляющие средства [5–7]. Р-витаминной активностью обладают флавоноиды (фенольные соединения С6-С3-С6-ряда), содержащие 3,4-диоксигруппы – кверцетин, мерицитин, лютеолин и их глюкозиды. Полиметоксифлавоны, присутствующие в листьях и соцветиях некоторых растений, а также в плодах цитрусовых, делают их устойчивыми к фитофторе [8–10].

В том или ином количестве, большем или меньшем разнообразии фенольные соединения встречаются во всех лекарственных растениях, выполняя у многих из них роль основного действующего начала, определяющего терапевтический эффект. Фенольные соединения имеют важное значение в формировании своеобразного букета свойств, которые характерны для лекарственных растений в целом и которые принципиально отличают их от синтетических препаратов с однонаправленным типом фармакологического действия [11, 12].

Вместе с тем, несмотря на огромный интерес к полимерам фенольной природы, сегодня сделаны лишь первые шаги в направлении изучения этих ценных соединений лишь у небольшого числа представителей микробного мира.

Что касается мицелиальных грибов, особенно грибов родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, эти организмы как продуценты фенольных полимеров изучены недостаточно [14].

В литературе встречаются в основном работы по фенольным соединениям, применяющимся в

медицине, при этом практически не затронуто такое не менее важное научное направление, как защита сельскохозяйственных растений от вредителей. Имеются лишь единичные работы, касающиеся нематоцидного действия фенольных соединений, выделенных из растений [15–18]. Аналогичных работ по выделению и исследованию фенолоксилов микробного происхождения, а также инсектицидного действия этих соединений в литературе не обнаружено. Поэтому особый интерес будут представлять работы, связанные с выделением фенольных соединений, обладающих биологической активностью, из микроскопических грибов и использование их в сельском хозяйстве.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования служили микроскопические грибы рода *Penicillium* (штаммы 340, 7N, 947), *Aspergillus* (127, 140, 6M), *Trichoderma* (F-1, TX, ANT), выделенные ранее из ризосферы сахарной свеклы (Жамбылская обл.).

Культуры поддерживали на сусло-агаре, засеив проводили спорами 5–7-суточных культур. В работе использовали соевую среду (г/л): соя – 25; глюкоза – 30; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5 г; NaCl – 1,0; CaCO_3 – 5 г; pH = 6,5–6,8.

Культивирование грибов проводили глубинным способом на качалке при температуре 24–26 °С в течение 10 сут. Полученный глубинным способом мицелий отделяли фильтрованием через нейлоновую ткань, промывали дистиллированной водой, высушивали, разрушали с песком и использовали для получения спиртового экстракта.

Моноциклические фенольные соединения получали путем обработки очищенного 70%-ного спиртового экстракта этилацетатом. К эфирной фракции, содержащей фенолы и фенолоксиловы, добавляли равное количество 5%-ного раствора бикарбоната натрия. После энергичного встряхивания эфир отделяли на делительной воронке, а водный раствор подкисляли соляной кислотой и освобожденные фенолоксиловы переводили в этилацетат. Полученную эфирную фракцию фенолкарбоновых кислот сушили над Na_2SO_4 , повторно растворяли и использовали для хроматографирования.

Анализ экстрактов осуществляли методом бумажной хроматографии, используя бумагу производства England by W&R. Balston Ltd «Whatman Chroma-tography Paper 3M», в системе бензол–метанол–уксусная кислота (45:8:4), и ТСХ на пластинках

«Silufol».

В качестве проявляющих агентов использовали 0,2%-ный раствор железо-аммонийных квасцов Вильсона (0,5 г лимонной и 0,5 г борной кислот в 20 мл безводного метанола), диазотированную сульфаниловую кислоту (ДСК) и 1%-ный раствор хлорного железа в этаноле. Хлорное железо – специфический реактив на фенольные соединения.

В работе использовали стандартные соединения фирмы Sigma: пропионовую, гентиизиновую, феруловую, галловую, ванилиновую, резорциловую, вератровую, бензойную, сиреневую кислоты.

Выявленные фракции элюировали этанолом, выпарены и переведены в 2,5%-ный этанол для дальнейшего тестирования на нематодах.

В качестве тест-объектов использовали свободноживущие нематоды *Caenorhabditis* sp. из прикорневой зоны томатов и фитопаразитические стеблевые нематоды *Ditylenchus destructor*, поражающие картофель. Исследования проводились *in vitro* на часовых стеклах.

Нематоды выделяли непосредственно из пораженных клубней перед началом эксперимента. В исследуемый раствор вносили нематоды в количестве 30 особей на каждую повторность. Для сравнения в опыте использованы стандартные соединения фенолоксилов фирмы «Sigma». В качестве контроля использовали дистиллированную воду и 2,5%-ный этанол. Количество повторов 3.

За жизнеспособностью нематод в растворах фенолоксилов наблюдали в течение 72 ч. О гибели нематод судили по остановке движения, которое не восстанавливалось в течение суток после переноса в воду, а также по изменению цвета кутикулы, после окраски нематод красителями.

Выявление инсектицидных свойств исследуемых штаммов грибов проводилось в лабораторных условиях в чашках Петри на личинках колорадского жука 1–4-го возраста. Растворы метаболитов вводились в личинки 4-го возраста шприцом в ротовую полость. Личинки 1–3-го возраста и листья картофеля в качестве корма опрыскивали испытуемыми растворами. За жизнеспособностью насекомых наблюдали в течение 96 ч после начала обработки. О гибели насекомых судили по остановке движения личинок и изменению их цвета от желто-оранжевого до темно-коричневого, серого или черного.

Результаты и их обсуждение

Таблица 1. Наличие фенолокислот в экстрактах мицелия микроскопических грибов

| Штаммы | Пропионовая кислота | Гентизиновая кислота | Феруловая кислота | Галловая кислота | Ванилиновая кислота | Резорциловая кислота | Вератровая кислота | Бензойная кислота | Сиреневая кислота |
|--------|---------------------|----------------------|-------------------|------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| F-1 | + | - | + | ++ | ++ | - | - | + | - |
| 127 | + | - | + | - | + | - | + | ++ | - |
| ВВ | - | - | + | - | + | - | + | ++ | - |
| ANT | + | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 6M | - | - | + | + | + | - | - | + | + |
| 140 | - | - | ++ | + | - | - | - | - | + |
| TX | + | - | ++ | + | - | - | + | - | + |
| 7N | - | - | ++ | - | - | - | - | - | - |
| 340 | - | - | ++ | - | - | - | - | - | - |
| 947 | - | - | - | + | + | - | - | - | + |

Примечание. (++) – высокое содержание, (+) – следовые количества, (-) – отсутствует.

В результате в экстрактах мицелия грибов было выявлено высокое содержание галловой и ванилиновой кислот (штамм F-1), феруловой кислоты (штаммы 140, TX и 340), бензойной кислоты (штаммы 127 и ВВ). Такие фенолокислоты, как пропионовая, вератровая и сиреневая, обнаружены в следовых количествах. Наиболее часто встречающаяся фенолокислота – феруловая, присутствующая в восьми штаммах из десяти исследуемых. Гентизиновая и резорциловая фенолокислоты в экстрактах данных грибов не обнаружены (табл. 1).

Для исследования биологической активности

выделены фракции с высоким содержанием фенолокислот.

Нами установлено, что через 72 ч после воздействия все выявленные фенолокислоты при концентрации от 0,52 до 2,15% вызывали гибель 52–98% как свободноживущих, так и паразитических нематод.

Наибольшее нематотическое действие на *Ditylenchus dipsaci* отмечено в вариантах с использованием стандартов галловой, ванилиновой и бензойной кислот, смертность нематод в этих случаях составила 60, 8% и 100% соответственно (табл. 2).

Среди микробных фракций следует отметить

Таблица 2. Нематотическая и инсектицидная активность микробных фракций, содержащих фенолокислоты

| Фракция | Штамм | Концентрация, % | Смертность особей | | | | | |
|-----------------|--------|-----------------|--------------------|------|------------------------------|------|-----------|------|
| | | | нематод через 72 ч | | колорадского жука через 76 ч | | | |
| | | | | | возраст 1–3 | | возраст 4 | |
| | | | М±m | % | М±m | % | М±m | % |
| S-ph (галлов.) | F-1 | 1,47 | 5,33±0,7 | 53,3 | 4,5±0,65 | 45 | 6,7±0,52 | 67 |
| B-ph (бензойн.) | 127 | 1,35 | 5,5±0,5 | 55 | 4,8±0,49 | 48 | 8,5±0,29 | 85 |
| R-ph (ферулов.) | 340 | 2,15 | 9,9±0,63 | 99 | 5,15±0,49 | 51,5 | 7,4±0,51 | 74 |
| K-ph (бензойн.) | ВВ | 0,9 | 9,5±0,65 | 95 | 5,33±0,42 | 53,3 | 7,33±0,52 | 73,3 |
| Z-ph (ферулов.) | 140 | 0,52 | 8,4±0,4 | 84 | 4,0±0,63 | 40 | 6,0±0,84 | 60 |
| E-ph (ферулов.) | 7N | 1,0 | 8,3±0,75 | 83 | 4,9±0,34 | 49 | 8,0±0,82 | 80 |
| X-ph (ферулов.) | TX | 1,3 | 5,2±0,49 | 52 | 3,5±0,65 | 35 | 6,8±0,48 | 68 |
| Бензойная к-та | Станд. | 1,0 | 10,0±0 | 100 | 5,8±0,48 | 58 | 9,0±0,91 | 90 |
| Галловая к-та | « | 1,0 | 6,0±0,84 | 60 | 5,5±0,5 | 55 | 6,0±0,58 | 60 |
| Ванилин. к-та | « | 1,0 | 8,0±0,71 | 80 | 5,0±0,71 | 50 | 5,0±0,71 | 50 |
| Ферулов. к-та | « | 1,0 | 5,6±0,51 | 56 | 3,5±0,65 | 35 | 6,0±0,41 | 60 |
| Контроль-1 | Вода | - | 0,9±0,17 | 9 | 1,1±0,24 | 11 | 1,9±0,34 | 19 |
| контроль-2 | Этанол | 2,5 | 1,0±0,29 | 10 | 1,2±0,2 | 12 | 2,9±0,26 | 29 |

Примечание. М – среднее арифметическое (количество погибших особей); m – ошибка среднего арифметического.

аналоги феруловой и бензойной кислот, выделенных из штаммов 340 и ВВ. В результате их воздействия гибель нематод составила 99 и 95% соответственно. При 100%-ной гибели нематод под действием стандарта бензойной кислоты, являющейся химическими, следовательно, достаточно токсичным веществом, 95%-ная смертность нематод в варианте с использованием микробного аналога этого вещества, которое представляет собой природное, а значит, более безопасное соединение, дает возможность в дальнейшем рассматривать фракцию ВВ-ph как перспективное средство защиты растений от нематод. Фракция R-ph, аналогичная стандарту феруловой кислоты, вызывает гибель 99% нематод при 56% смертности в варианте с химическим стандартом. С учетом того, что концентрация этой фракции приблизительно в 2 раза выше, чем у стандарта, нематодцидный эффект обоих веществ можно считать одинаковым. Микроскопическое исследование погибших особей в варианте с бензойной кислотой выявило сильные поражения, затрагивающие все органы. Так, у личинки *Cervidellus* spp. все внутренние органы отошли от кутикулы, наблюдалось их сжатие, поражены все части тела, в особенности



Рис. 1. Нематодцидное действие бензойной кислоты

пищевод (рис. 1).

В контроле 1 и 2, где процент гибели нематод составил 9 и 10% соответственно, у погибших нематод изменений во внутренних органах не обнаружено.

Следует отметить, что данные, полученные при тестировании выделенных фракций фенолокислот на свободно живущих нематодах, подтвердились при тестировании их и на стеблевых нематодах картофеля.

Действие фенолокислот и их природных аналогов на насекомых было слабее, чем на нематод. Смертность личинок 1–3-го возраста после обработки корма и их самих не превышала 55% при 11–12% в контроле. Инъекция метаболитов и стандартных соединений в ротовую полость личинок 4-го

возраста вызвала более сильный эффект, при котором смертность наступила от 50 до 90% насекомых в зависимости от варианта (см. табл. 2). Как и в случае с нематодами, наибольшим токсическим действием обладали бензойная кислота и микробные фракции, содержащие ее. Частичное оцепенение личинок 4-го возраста наступало уже через 1–2 сут. Личинки не двигались, лежали на спинке лапками вверх или на боку. В дальнейшем оцепенение проходило или на 3–4 сут наступала их гибель, при этом цвет их менялся от оранжево-желтого (живых) до



Рис. 2. Инсектицидное действие бензойной кислоты

серого, затем черного у мертвых (рис. 2).

Таким образом, установлено, что физиологически активные вещества основного типа, к которым относятся фенолокислоты, выделенные из микроскопических грибов, при воздействии как на нематоды, так и на насекомых могут вызывать серьезные физиологические нарушения, приводящие к гибели вредителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dufuss M.M., Chapela J.N. The Discovery of natural Product with Therapeutic potential, Ed. Gullo // V. P. Berlin-London^Butterworth-Heinemann Press. 1994. P. 49-79.
2. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Олешко В.С. Биологически активные вещества гриба *Coriolus hirsutus* (Fr.) Quel. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30, вып. 3-4. С. 624-631.
3. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. Вещества фенольной природы некоторых базидиомицетов // Микробиология. 1999. Т. 68, №1. С. 70-75.
4. Капич А.Н., Шишкина А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов // Микол. и фитонатол. 1992. Т. 26, вып. 6. С. 486-493.
5. Харборн Д.Б. Биохимия фенольных соединений. М.: Мир, 1968. С. 109-139.
6. Райнхарт Д. Биофлавоноиды и проницаемость капилляров. М.: ИЛ, 1957. С. 85-109.

7. *Максютина Н.П., Литвиненко В.И.* // Фенольные соединения и их биологические функции. М.: Наука, 1968. С. 7-26.

8. *Колесников М.П., Гинс В.К.* Фенольные соединения в лекарственных растениях // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37, №4. С. 457-465.

9. *Максютина Н.П., Комиссаренко П.Ф., Прокопенко А.П.* Растительные лекарственные средства. Киев: Здоровье, 1985. 280 с.

10. *Butt V.S.* The Biochemistry of Plant Phenolics // Oxford: Clarendon Press, 1985. P. 349-366.

11. *Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Климентьева Н.И.* Особенности химизма лекарственных растений (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37, №3. С. 261-273.

12. *Запроматов М.Н.* Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. 272 с.

13. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. М.: Медицина, 1988. Т. 1. 624 с.

14. *Коруткин Д.Ю., Бекмаханова Н.Е., Шемшурова О.Н.* Фенолоксиолиты из грибов рода *Trichoderma* и *Aspergillus* // Вестник КазГУ. Сер. хим. 1999. №2(14). С. 95-96.

15. *Kaplan D.M., Davis E.L.* Mechanism of plant incompatibility with nematodes // Society of nematologist. Hyattsville, Maryland, 1987. P. 267-276.

16. *Singt B., Choudhury B.* The chemical characteristics of tomato cultivars resistant to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. // *Nematologica*. 1973. N19. P. 443-448.

17. *Scheffer F., Kickuth R., Visser J.H.* Die Wurzelabscheidungen von *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees und ihr Einfluss auf Wurzelknoten-Nematoden, Zeitschrift für Pflanzenahrung und Bodenkunde. 1962. N 98. P. 144-120.

18. *Osman A.A., Viglierchio D.R.* Efficacy of biologically active agents as non-traditional nematocides for *Meloidogyne javanica* // *Revue de Nematologie*. 1988. N11. P. 93-98.

Резюме

Penicillium, *Aspergillus*, *Fusarium* микроскопиялық саңырауқұлақтарының фенолқышқылын түзу қасиеті зерттелді. Хроматографиялық әдісін қолдану арқылы бензойлық, галл, ванилин және ферул қышқылдарының мөлшері мол фракциялар анықталды. Осы қышқылдардың нематод пен колорад қонғызына қарсы инсектицидтік белсенділігі көрсетілді.

Summary

The capacity of microscopic fungi from kinds *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* to produce phenolic acids was investigated. With usage of chromatographic method of testings and standard bonds, the fractions high in of benzoic, gallic, vanilinic and ferulic acids were revealed. Nematocide and nsecticide activity of phenolic acids concerning nematodes and larvas of the potato beetle was established.

*Институт микробиологии
и вирусологии,
г. Алматы*

Поступила 3.03.06г.