

INFLUENCE OF AMBIENT TEMPERATURE ON INTENSITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES MOVEMENT

Summary

*There were made an analyze of a mobility changes of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* at ambient temperatures from 4 to 39°C. In order to make estimation of number of moved nematodes a computer program for image analyzes was used. The computer program based on series of a photos of containing nematodes liquid samples. The photos were made by means of a numeric camera mounted on microscope. The values of nematode relative mobility did not differ significantly in the range of temperature from 4 to 30°C and were middle 65,5%. At the temperatures upper than 30°C values of the relative mobility dropped significantly. It was caused by death of nematodes.*

WPLYW TEMPERATURY OTOCZENIA NA INTENSYWNOŚĆ PORUSZANIA SIĘ OWADOBÓJCZYCH NICIENI

Streszczenie

*Przeprowadzono analizę zmian aktywności ruchowej owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae* w zakresie temperatury otoczenia od 4 do 39°C. Do obliczania liczby poruszonych nicieni zastosowano program komputerowy do analizy obrazu. Do programu wprowadzano serie zdjęć cieczy zawierającej nicienie, które wykonane zostały za pomocą kamery cyfrowej zamontowanej na mikroskopie. Obliczano wartość względnej ruchliwości nicieni, która w obszarze temperatury od 4 do 30°C nie zmieniała się istotnie i wyniosła przeciętnie 65,5%. Przy temperaturach powyżej 30°C aktywność ruchowa spadła istotnie. Było to spowodowane śmiercią nicieni.*

1. Wstęp

Owadobójcze nicienie są komponentem wielu biologicznych środków ochrony roślin stosowanych w rolnictwie ekologicznym [5, 7]. Wykorzystywane są przeważnie do zwalczania larw pasożytniczych owadów oraz ślimaków [3, 5]. Skuteczność zwalczania pasożytów roślin przez owadobójcze nicienie może zależeć od temperatury otoczenia. Temperatura ma wpływ na zdolność do rozmnażania nicieni oraz zdolność do infekowania szkodników. W badaniach przeprowadzonych na ćmach barciaka, jako przykładowym pasożycie, dla różnych gatunków owadobójczych nicieni, zebranych z rozmaitych klimatycznych regionów świata, określono najodpowiedniejsze zakresy temperatur, przy których nicienie mają najwyższą zdolność do infekowania szkodników [2]. Wyniosły one dla nicieni *Steinernema riobravisi* 10-39°C, *Steinernema feltiae* 8-30°C, a dla *Steinernema glaseri* 10-37°C. Ustalono również optymalne zakresy temperatur dla rozrodczości owadobójczych nicieni, które wynoszą dla *Steinernema glaseri* 12-32°C, dla *Steinernema carpocapsae* 20-30°C, *Steinernema scapterisci* 20-32°C, *Steinernema riobravisi* 20-35°C, *Steinernema sp.* 20-32°C, a dla *Steinernema feltiae* 10-25°C. Temperatura otoczenia ma wpływ na przeżywalność i śmiertelność owadobójczych nicieni podczas ich przechowywania i zależy od gatunku. Maksymalną przeżywalność dla *Heterorhabditis indica* uzyskano przy temperaturze przechowywania 15°C, a największa śmiertelność przy 5°C. Dla gatunku *Heterorhabditis bacteriophora* najwięcej nicieni przetrwało w temperaturze 7,5°C, a najmniej w 25°C [6]. Wysoka temperatura może pozbawić życia wszystkich nicieni i zależy również od gatunku nicieni [4].

Na skuteczność działania owadobójczych nicieni ma wpływ również ich zdolność do przemieszczania się i docierania do pasożytów roślin, która jest wynikiem ich ak-

tywności ruchowej. Założono, że na aktywność ruchową owadobójczych nicieni ma wpływ temperatura środowiska, w którym się znajdują.

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena aktywności ruchowej owadobójczych nicieni przy różnych temperaturach otoczenia.

3. Materiał i metody

Materiałem użytym w badaniach był biologiczny środek ochrony roślin *Steinernema System*, produkowany przez Biobest N.V., stosowany do zwalczania ziemiórek. Czynnikiem aktywnym tego biopreparatu są owadobójcze nicienie *Steinernema feltiae*. Według producenta zalecane jest stosowanie tego gatunku nicieni przy temperaturze gleby w granicach 15-20°C. Producent zastrzega, że jeśli temperatura spadnie poniżej 10°C lub wzrośnie powyżej 30°C nicienie mogą stać się nieaktywne.

W badaniach użyto 30 ml cieczy, w której średnia koncentracja nicieni w wodzie wynosiła ok. 500 sztuk w 1 ml płynu. Przed rozpoczęciem badań wyznaczono ilość martwych nicieni w biopreparacie przyjętym do badań. Wyniosła ona przeciętnie 9,7 sztuk na 100 nicieni.

Do oceny aktywności ruchowej nicieni zastosowano program do komputerowej analizy obrazu, opracowany w środowisku LabView firmy National Instruments [1]. Do komputera zawierającego program podłączona była kamera cyfrowa do wykonywania zdjęć nicieni rozdzielczości 3.0 megapikseli, która zamontowana była na mikroskopie stereoskopowym (rys. 3).

Aby określić ruch obiektów, do programu wprowadzano zawsze kilka zdjęć tej samej cieczy zawierającej nicienie, wykonanych po kolei z przerwą czasową. Działanie pro-

gramu polegało na przetworzeniu zdjęć na obrazy binarne, następnie identyfikacji obiektów uznanych za nicienie oraz obliczeniu liczby nicieni uznanych za poruszone. Identyfikacja obiektów uznanych za nicienie odbywała się na podstawie ustalonych w programie minimalnych i maksymalnych wartościach powierzchni nicieni na obrazach binarnych. Obliczanie liczby poruszonych na podstawie zmiany położenia nicieni pomiędzy ich lokalizacją na pierwszym a drugim zdjęciem.

Przed wykonaniem eksperymentu program został wykalibrowany. Wyznaczono wartości progowe rozmiaru obiektu, który program uznawał za pojedynczego nicienia, był to zakres 100-600 pikseli. Wartości progowe ustalono na podstawie wstępnych zdjęć nicieni (rys. 1).

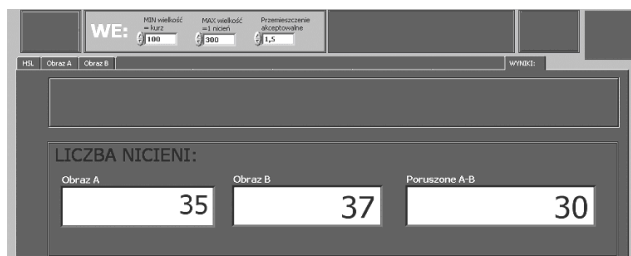


Rys. 1. Fotografia owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae*

Fig. 1. Photo of entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*

Następnie wyznaczono zakres przemieszczenia akceptowanego dla obiektów poruszonych. Przemieszczeniem akceptowanym było to dopuszczalne przemieszczenie się obiektów pomiędzy ich położeniem na zdjęciu pierwszym i drugim, które program uznawał za nieruchome. Konieczność wyznaczenia wartości dopuszczalnego przemieszczenia akceptowanego wynikała głównie z faktu, że rozmiary tych samych obiektów na kolejnych zbinaryzowanych zdjęciach cyfrowych mogą różnić się nieznacznie. Może to powstać w wyniku delikatnych zmian oświetlenia lub nałożenia się drobnych zanieczyszczeń na obiekty, co w ostatecznym wyniku program uzna za ruch obiektu będącego rzeczywiście nieruchomym. Wartość zakresu przemieszczenia akceptowanego określono na podstawie porównania sumy obiektów poruszonych otrzymanych z programu z wynikami obliczania sumy obiektów poruszonych, dla tej samej pary zdjęć, obliczonej przez obserwatora na ekranie komputera. Wartość wyznaczonego przemieszczenia akceptowanego wynosiła 1,5 piksela, co oznaczało, że program uznawał za poruszone i zliczał tylko te obiekty, których położenie pomiędzy pierwszym a drugim zdjęciem zmieniło się powyżej 1,5 piksela. Po wprowadzeniu pary zdjęć, w oknie programu z wynikami pomiaru ilości poruszonych obiektów ukazywała się ilość obiektów uznanych za nicienie na zdjęciu pierwszym oznaczonym jako „Obraz A”, oraz na zdjęciu drugim oznaczonym jako „Obraz B”, a następnie w oknie „Poruszone” otrzymywano wartość sumy obiektów uznanych za nicienie i poruszonych (rys. 2). Rozbieżność liczby obiektów na pierwszym i drugim zdjęciu wynikała z faktu, że niektóre nicienie, położone blisko

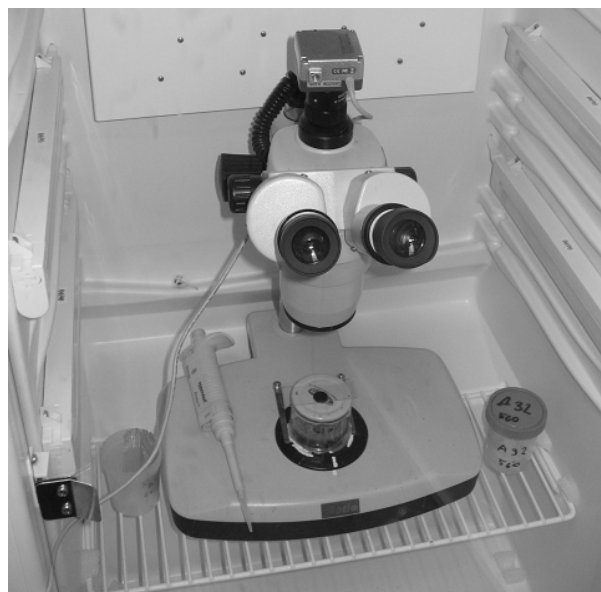
siebie, w wyniku poruszenia stykały się lub krzyżowały, albo w wyniku ruchu rozłączały się. Program na obrazie binarnym identyfikował je zawsze tylko jako jeden obiekt. Zliczał takie nicienie jako pojedyncze w obliczeniach ich liczby.



Rys. 2. Okno programu z wynikami pomiaru ilości poruszonych obiektów

Fig. 2. Application window with measurement results of a moved objects

Do ustalania temperatury otoczenia zastosowano szafę termostatyczną ST 3 pojemności komory 195 dm³. W szafie umieszczono mikroskop z kamerą, pojemnik z cieczą zawierającą nicienie, szkiełka mikroskopowe i pipetę do nakładania cieczy z nicieniami na szkiełka (rys. 3). Założono, że w ten sposób wszystkie obiekty będą miały tę samą temperaturę.



Rys. 3. Stanowisko pomiarowe wewnątrz szafy termostatycznej

Fig. 3. Test bench inside the cabinet thermostat

Następnie obniżono temperaturę panującą we wnętrzu szafy do 3,5°C, to jest do minimalnej, którą udało się uzyskać. Po 6 godzinach przystąpiono do badań. Temperaturę badawczą uzyskiwano poprzez podnoszenie temperatury w szafie do ustalonych wartości. Po ustawieniu kolejnej temperatury w szafie odczekano około 30 minut by preparat i wyposażenie szafy nagrzały się do nowej temperatury. Następnie otwierano na chwilę szafę i za pomocą pipety ciecz z nicieniami w objętości 50 ml nanoszono na szkiełko mikroskopowe, które układano pod mikroskopem. Po zamknięciu szafy odczekano 4 minuty, by temperatura wyrównała się do ustawionej uprzednio wartości, a następnie

próbkę cieczy fotografowano. Dla każdej próby wykonywano po 5 zdjęć. Po zrobieniu pierwszego zdjęcia kolejne wykonywano po 15 sekundowej przerwie od momentu zrobienia poprzedniego. Porównując ze sobą tylko kolejne zdjęcia otrzymano po 4 powtórzenia pomiaru dla jednej próbki cieczy. Dla każdej ustawionej temperatury wewnątrz szafy wykonano zdjęcia dla 2 próbek cieczy. Fotografowanie rozpoczęto od temperatury otoczenia równej 4°C, następne wartości to: 7, 11, 15, 20, 25, 30, 35 i 39°C.

Ocenę aktywności ruchowej owadobójczych nicieni wykonano wyznaczając i porównując względną ruchliwość nicieni, którą obliczano jako procentowy stosunek liczby poruszonych nicieni do średniej liczby nicieni znalezionych na pierwszym i drugim zdjęciu, według wzoru 1:

$$\eta = \frac{2 \cdot i_p}{i_A + i_B} \cdot 100, \quad (1)$$

gdzie:

η – względna ruchliwość nicieni, %,

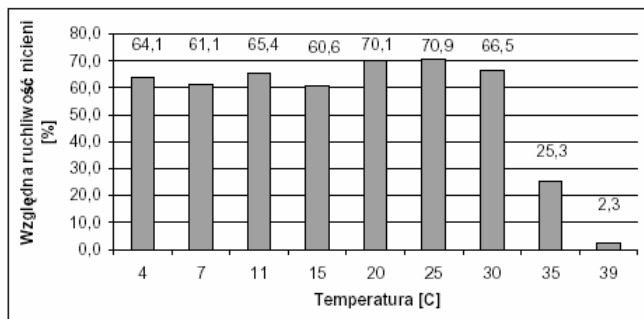
i_p – liczba nicieni poruszonych, sztuki,

i_A – liczba nicieni na pierwszym zdjęciu, sztuki,

i_B – liczba nicieni na drugim zdjęciu, sztuki.

4. Wyniki

Średnie wartości względnej ruchliwości nicieni, przy ustalonych temperaturach otoczenia, przedstawione są na rys. 4. Wyniki badań poddano jednoczynnikowej analizie wariancji w celu wyznaczenia istotności wpływu temperatury na zmiany ruchliwości badanych owadobójczych nicieni. Wyznaczono najmniejszą istotną różnicę NIR = 10,576 i średnie odchylenie standardowe, które wyniosło 9,4.



Rys. 4. Wpływ temperatury otoczenia na zmiany względnej ruchliwości nicieni

Fig. 4. Influence of ambient temperature on changes in the relative mobility of the nematodes

Wartości względnej ruchliwości wskazują na wzrost ilości poruszonych nicieni w przedziale temperatury 20-25°C. Wzrost nie może być uznany za istotny, gdyż wartości względnej ruchliwości przy tych temperaturach przyrównane do wartości względnej ruchliwości przy temperaturze 15°C mieszczą się w ramach wartości NIR. Z podobnych względów w całym zakresie temperatury otoczenia od 4 do 30°C zmiany wartości względnej ruchliwości nie mogą być uznane za istotne. Przeciętna względna ruchliwość nicieni w tym przedziale wyniosła 65,5%, a ponieważ wyznaczony wstępnie przeciętny udział martwych nicieni w całkowitej

ilości nicieni wynosił 9,7% to średnio 24,8% nicieni nie poruszało się lub wykonywało ruchy poniżej przemieszczenia akceptowalnego przez program. Istotne, przy poziomie istotności poniżej 0,05, okazały się zmiany względnej ruchliwości nicieni przy temperaturach 35 i 39°C. Analiza przeżywalności nicieni w tych próbach wykazała, że nie poruszające się nicienie były martwe. Przekroczenie wartości temperatury otoczenia równej 30°C może spowodować śmierć owadobójczych nicieni [4]. W próbie cieczy poddanej działaniu temperatury 39°C stwierdzono śmierć wszystkich nicieni, jakkolwiek program komputerowy przedstawił dane wskazujące na średnią względną ruchliwość nicieni na poziomie wartości 2,3%. Wartość ta jest wynikiem niedokładności zastosowanej do oceny aktywności ruchowej nicieni metody komputerowej analizy obrazu. Błąd powstał najprawdopodobniej w wyniku nałożenia się drobnych zanieczyszczeń na brzegi obrazów nicieni na niektórych zdjęciach, co spowodowało mylną interpretację wykonaną przez program.

Przyrównując wyniki z przeprowadzonego eksperymentu do zaleceń producenta środka Steinernema System, można uznać, że nicienie po przekroczeniu 30°C stają się nieaktywne ze względu na ich uśmiercanie, a poniżej 10°C mogą być mniej skuteczne w zwalczaniu szkodników, ale nadal mogą być aktywne ruchowo.

5. Wnioski

1. Nie stwierdzono istotnych zmian aktywności ruchowej owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae* w zakresie temperatur od 4 do 30°C.
2. Stwierdzono istotne zmniejszanie się aktywności ruchowej badanych nicieni przy temperaturach otoczenia równych 35 i 39°C, które spowodowane było śmiercią tych osobników po przekroczeniu zbyt wysokiej dla ich przeżycia temperatury.

6. Literatura

- [1] Chojnacki J., Kania M.: Pomiary liczby poruszających się owadobójczych nicieni przy wykorzystaniu komputerowej analizy obrazu. PAK Pomiary Automatyka Kontrola 6, s. 566-568, 2010.
- [2] Grewal P., S., Selvan S., Gaugler R.: Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal of Thermal Biology 4, s. 245-253, 1994.
- [3] Grewal P.: Nematodes as Biocontrol Agents. CAB International, 2008.
- [4] Poinar Jr., G.O.: Entomopathogenic nematodes. In: Franz, J.M. (Ed), Biological Plant and Health Protection. Fischler. Verlag. Stuttgart, 1986.
- [5] Organizmy pożyteczne w środowisku rolniczym. Praca zbiorowa pod redakcją M. Tomalaka i D. Sosnowskiej. IOR Poznań, 2008.
- [6] Strauch O, Niemann I., Neumann A., Schmidt A. J., Peters A., Ehlers R.U.: Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. BioControl 45, s. 483-500, 2000.
- [7] Tomalak M.: Wykorzystanie nicieni owadobójczych w ochronie roślin. Ochrona Roślin, 2000, 9, s. 2-3.