

ISSN 0558-1125

УДК 632.937

Т.І. ПАТИКА, доктор с.-г. наук

Інститут садівництва Національної академії аграрних наук (ІС НААН), Київ, Україна

КОНЦЕПТУАЛЬНІ ОСНОВИ МІКРОБІОМЕТОДУ З ВИКОРИСТАННЯМ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Т.І. ПАТЮКА, Doc Agr Sci

Institute of Horticulture, NAAS, Kyiv, Ukraine

CONCEPTUAL FOUNDATIONS OF MICROBIOMETHOD USING ENTOMOPATHOGENIC MICROORGANISMS

Представлено концептуальні основи мікробіометоду та основні групи ентомопатогенних мікроорганізмів з різним рівнем контагіозності. Дано наукове обґрунтування пріоритетних фундаментальних досліджень мікроорганізмів-симбіонтів комах, особливостей взаємовідносин «патоген-хазяїн» та методологічних підходів до розробки засобів контролю чисельності фітофагів за участю різних препаративних форм.

Представлены концептуальные основы микробиометода и основные группы энтомопатогенных микроорганизмов с разным уровнем контагиозности. Дано научное обоснование пріоритетных фундаментальных исследований микроорганизмов-симбионтов насекомых, особенностей взаимоотношений «патоген-хозяин» и методологических подходов к разработке средств контроля численности фитофагов с участием различных препаративных форм.

The author presents the conceptual foundations of the microbiomethod and main groups of entomopathogenic microorganisms with different level of contagion as well as the scientific substantiation of prior basic researches on microbial symbionts of insects, especially the relationship “pathogen-host” and methodological approaches to control the number of phytophages with the participance of different formulations.

Проблеми захисту рослин включають широкий діапазон — від необхідності забезпечення продовольчої самостійності країни до стабільного екологічного оздоровлення регіонів. Екологічне значення фітозахисту тісно зв'язано з розв'язанням економічних і соціальних проблем. Біологічний захист рослин є пріоритетним напрямком, який включено до переліку критичних технологій у країнах ближнього й дальнього зарубіжжя для отримання безпечної Садівництво. 2014. Вип. 68

©Патика Т.І., 2014

продукції, збереження довкілля, біорізноманіття і здоров'я населення. Перспективним вважається фітосанітарне проектування агроecosystem на основі природної біоценотичної регуляції шкідливих організмів, введення технологій біологічного (у т.ч. мікробіологічного) захисту рослин, а також сортів з комплексною та груповою стійкістю до шкочинної біоти для отримання органічної продукції [1-4]. Встановлення економічних пріоритетів у галузі біозахисту пов'язане з інноваційною оцінкою результатів досліджень та їх застосуванням у практиці рослинництва.

Враховуючи токсичність хімічних засобів захисту, а також екологічні ризики від накопичення, циркуляції небезпечних речовин в екосистемах і формування резистентних рас шкідників, усе більш актуальним стає пошук екологічно безпечних підходів до контролю фітофагів. За даними ФАО, Всесвітньої організації охорони здоров'я відносно повна токсиколого-гігієнічна інформація є тільки по 10% хімічних пестицидів, які використовуються, обмежена щодо токсичності – по 47%. Ще більш 40% широко застосовуваних пестицидів знаходяться у форматі «без інформації» [5]. Щорічно у світі використовується близько 2 млн. тонн цих пестицидів. Їх похідні виявляються в 40% дослідних зразків зерна, ягід, плодів та овочів. Нові пестициди хімічного синтезу з високими витратами виявляються економічно не вигідними для культур з невеликими площами та обсягами виробництва продукції навіть у високорозвинутих країнах. Така тенденція охоплює дедалі більший перелік культур з одночасним залученням все менш розвинутих країн.

Альтернативним, екологічним підходом до управління шкочинними організмами є використання мікробіометоду на основі ентомопатогенних агентів. Ентомопатогенні мікроорганізми з різним ступенем вірулентності постійно персистують у популяціях комах-хазяїв, мають різнопланові зв'язки та відіграють провідну роль в управлінні фітофагами. Отже, основними стратегіями застосування названих мікроорганізмів у біометоді є: 1) інтродукція збудників до популяції комах; 2) використання препаративних форм з новими властивостями для зниження чисельності фітофагів.

На першому плані виникає необхідність комплексного фундаментального вивчення симбіонтних мікробних угруповань комах-шкідників, їх взаємодії та оцінки факторів патогенності, розробки методів біоконтролю чисельності фітофагів за участю створених біопестицидів з відповідним розподілом за типом дії та цільовими об'єктами.

Живий організм існує в симбіозі з десятками видів мікробіоти. Найчастіше вони локалізуються в органах травлення, допомагаючи розщепленню речовин, які організм хазяїна використовувати не може. Для відповідного виду існує власний набір характерних симбіонтів (мікробіом), який може бути доповнений або збіднений внаслідок інфекційних процесів, що

відбуваються. Мікробіом – необхідний фактор, який обумовлює нормальну життєдіяльність організму. За обсягом закодованої генетичної інформації мікробіоми рослин і тварин багатократно перевершують своїх хазяїв, значно підвищуючи їх адаптивний потенціал.

У світлі розвитку симбіотичних відносин симбіонт може повністю втратити самостійність і трансформуватися в геном хазяїна. Останній теж припиняє бути самостійним і «автономним організмом». Мікроорганізми-симбіонти можуть в цілому впливати на життєздатність близькоспоріднених видів. Вони як активні та ініціюючі агенти напряду чи опосередковано взаємодіють зі своїми господарями (різні реакції та морфофункціональні перетворення на клітинному й субклітинному, організмовому та популяційному рівні).

Вперше клітини тканин комах з симбіонтами (міцетоми) описали Гекслі (*Huxley*, 1858), Бальбіані (*Balbani*, 1866-1871) і Таннрайтер (*Tannreither*, 1907). Вони виявили ці утворення у попелиці (*Aphidae*), а Блохман - в оболонках фолікулів та в яйцях мурашок, бджіл. Бактеріальну природу таких клітин підтвердили Красильщик (1890), Хеннегюї (1904), П'ерантоні (1910), Уйчанко (1924). Глибокі дослідження міцетомів та їх симбіозів з комахами провели Бухнер і його учні (1939), Штейнхауз (1952). Різноманіття ґрунтових мікроорганізмів і комах передбачає найрізноманітніші асоціації між ними, включаючи симбіози. Кишкові бактеріальні симбіонти комах відіграють важливу роль у ферментативній деградації целюлози [6]. Широкого розповсюдження набули дослідження симбіонтів термітів, а також їх цілком можливих функцій [7, 8]. До складу кишкової мікрофлори термітів можуть входити активні N_2 -фіксатори, що дозволяє хазяїну живитися хімічно чистою целюлозою. Досліджуючи склад геному симбіотичних бактерій джгутиконосців, вчені дійшли висновку, що поряд із генами, котрі відповідають за синтез целюлази, в геномі виявилися такі ж самі гени, що кодують ферменти, які відповідають за азотфіксацію – зв'язування вільного азоту атмосфери N_2 і перетворення його у форму, придатну для використання не тільки самими бактеріями, але також джгутиконосцями і термітами. Виявлення генів, відповідальних за азотфіксацію у дослідних ендосимбіонтних бактерій, стало несподіванкою, оскільки раніше у бактерій цієї групи (*Bacteroidales*) азотфіксація ніколи не спостерігалась. Окрім зв'язування молекулярного N_2 і перетворення його в NH_3 , мікроорганізми, вочевидь, здатні до утилізації продуктів азотного обміну, що утворюються в ході метаболізму найпростіших. Це важливий момент, тому що зв'язування N_2 потребує значних енергетичних витрат, і якщо в їжі термітів азоту вистачає, то інтенсивність його фіксації можна знизити.

Відомо, що симбіотична асоціація у природі знаходиться під впливом різних стресів (голодування, зниженої або підвищеної температури та інших), які істотно впливають на особливості взаємовідношень партнерів. Симбіотичні бактерії можуть збільшувати опір

(стійкість) паразитизму, розширювати діапазон теплостійкості [9]. Популяції комах, як правило, пов'язані з кишковими симбіонтами. Але ефект відповідного симбіонту на біологію хазяїна може різнитися також за еколого-географічними показниками розповсюдження виду [10, 11]. Екологічні фактори, котрі можуть вплинути на взаємовідносини «комаха-симбіонт», широко обговорюються так само, як і генетичні особливості симбіонтів.

Для успішного розвитку облігатних паразитів принципово важливим є збереження життєздатності хазяїна та підтримка метаболічної активності інфікованих клітин, щоб забезпечити проліферацію патогена, який володіє мінімальним власним функціональним апаратом. Класичний приклад облігатного паразитизму демонструють збудники ентомофторозів - ентомофторові гриби (*Zygomycota, Entomophthorales*), які паразитують безпосередньо на органах і тканинах хазяїна без проникнення в його клітини (наприклад, на різних видах попелиць). При цьому спостерігається високий ступінь синхронності у динаміці чисельності хазяїна й патогена. Ентомофторози уражують комах більше ніж з 12 рядів, а також павутинних кліщів, представників трьох родин павуків і багатоніжок, причому дане захворювання практично завжди летальне [12].

Таким чином, для вищезазначеної групи облігатних паразитів комах характерні вузька спеціалізація та чітка зв'язаність у розвитку патогена й хазяїна. Технологічні труднощі при створенні препаратів на основі вищезгаданих паразитів комах роблять ці групи патогенів не ідеальними кандидатами-агентами класичних біопрепаратів. Але враховуючи циклічний характер епізоотій та корельованість їх з динамікою чисельності комах-хазяїв, їх роль у регулюванні чисельності фітофагів у природних популяціях важко переоцінити, при цьому вплив абіотичних факторів набуває вторинного характеру. Найбільший інтерес при розробленні нових підходів до контролю фітофагів можуть представляти дослідження з інтродукції ентомопатогенних мікроспорідій та ентомофторових грибів у популяції комах-шкідників, а також вивчення динаміки природної зараженості об'єктів в агроценозах з метою прогнозування масових епізоотій та розробки критеріїв їх ефективності і регламентації захисних заходів.

Потенціал ентомопатогенних аско- і дейтероміцетів використовується недостатньо — у прикладних біотехнологічних роботах по створенню мікоінсектицидів поки що задіяні тільки лічені види з родів (р.) *Beauveria* (*Beauveria bassiana*), *Verticillium* (*Verticillium lecanii*), *Metarrhizium* (*Metarrhizium anisopliae*), *Aschersonia* (*Aschersonia* Mont.) та ін. Активною групою за ступенем біо- та некротрофності є патогени-аскоміцети з р. *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Lecanicillium*. Загибель хазяїна від них настає на 3-21-у добу після зараження в залежності від паразитичних властивостей патогену, фізіологічних особливостей комах і умов середовища. Активна колонізація тканин комахи-хазяїна патогеном найчастіше відбувається відразу після її

загибелі. Конкурентні переваги у природі можуть мати середньовірулентні форми, що викликають тривале протікання мікозів з наступним рясним спороношенням на трупах хазяїв. Епізоотії при цьому носять суто локальний характер і у значній мірі залежать від умов середовища (насамперед, від вологості повітря). Завдяки здатності аскоміцетів розвиватися на мертвих субстратах, не потрібно особливих зусиль для ізоляції та культивування їх на штучних поживних середовищах. Тому представники даної групи грибів перспективні з точки зору розробки біологічних препаратів. Загальна кількість мікоінсектицидних препаратів на сьогоднішній день у світі складає близько 170 найменувань (68,0% на основі *B. bassiana* та *M. anisopliae*, 6,0% - *Isaria fumosorosea*). Для інтродукції (створення тривалих інфекційних вогнищ у місцях резервації фітофагів) та акліматизації грибних патогенів використовуються представники р. *Aschersonia* (спеціалізованого паразиту білокрилок).

До групи факультативних паразитів фітофагів відносять спороутворюючі ентомопатогенні бактерії, а також нематодно-бактеріальний комплекс.

Кристалують бактерії *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) трапляються повсюдно і можуть бути ізольовані з комах, ґрунту, мікрофлори рослин. Стратегія взаємовідношень ентомопатогенів *Bt* з організмом комахи характеризується як агресивна, оскільки збереження популяції хазяїна не є обов'язковою умовою існування ентомопатогенних бактерій [4]. Варіанти *Bt* продукують різний набір біологічно активних речовин (δ -ендотоксини, α -, β -, γ - екзотоксини та інші ферменти, метаболіти), які відіграють відповідну роль у патогенезі комах. Овіцидні, антифідантні, ларвіцидні, тератогенні та інші властивості ентомотоксинів *Bt*, викликаючи відповідні ефекти у комах, тим самим не тільки підсилюють дію препаратів, які містять токсини, а й пролонгують терміни цієї дії (включаючи дочірні покоління). Тому вивчення ролі ентомотоксинів різної природи в патогенезі видового складу сприйнятливих комах перспективне у плані розуміння певних механізмів дії біоагентів препаратів і вдосконалення технологій їх високоефективного використання (розробка оптимальних умов виробництва біоінсектицидів, цілеспрямований скринінг продуктивних штамів мікроорганізмів та ін.).

Специфічність механізму дії *Bt* дозволяє зберігати нецільові об'єкти, гарантує безпеку людині та навколишньому середовищу. Скринінг штамів *Bt* і вивчення їх варіабельності з ентомоспецифічними токсинами триває у всьому світі [13, 14]. Вибіркова специфічність патогенів даної групи щодо кола комах безпосередньо пов'язана з функціональними характеристиками ендотоксину та певною біохімічною структурою як самого токсину, так і інфікованої комахи. Генетична різноманітність токсинів *Bt*, безсумнівно, відіграє найважливішу екологічну та еволюційну роль: вона сприяє розвитку високої адаптивної можливості і виживанню підвидів ентомопатогенних бактерій у різних біоценозах. Серед цих бактерій

найбільш вивченими є *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*, *B. laterosporus*. Здатність ентомопатогенних бактерій до продукування токсинів не обмежується представниками р. *Bacillus*. Виявлено, зокрема, інсектицидну активність у бактерій, ізольованих з ентомопатогенних нематод (наприклад, р. *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*).

Для більшості ентомопатогенних бактерій і нематод характерний типово некротрофний тип паразитизму. Спряженість розвитку паразита і хазяїна в даному випадку мінімальна. На відміну від інших бактерій, симбіонти нематод секретують у навколишнє середовище не тільки низькомолекулярні антибіотики, але й широкий набір білкових токсинів, багато з яких ще на стадії відкриття науковцями. На основі нематодно-бактеріального комплексу у світі розроблено досить великий набір біопрепаратів широкого спектру дії для зниження чисельності ґрунтових шкідників [15].

«Факультативні збудники хвороб» представлені бактеріями з р. *Pseudomonas*. Вони здатні проникати в організм комах і викликати септицемію, виділяючи продукти обміну, які вважаються аналогами ентомотоксинів (накопичення токсинів в організмі комахи у великих кількостях призводить до пошкоджень кишечника). Активно проникаючи в епітелій кишечника бактерії інтенсивно розмножуються і викликають загибель хазяїна [11, 12]. *Pseudomonas aeruginosa* продукує позаклітинну протеазу, токсичну для великої воскової вогнівки *Galleria mellonella*. Патогенна дія *P. aeruginosa* для останньої, у першу чергу, обумовлена утворенням речовин, які проявляють властивості екзотоксинів, і вивільненням ендотоксинів при загибелі та розпаді бактеріальних клітин. *P. aeruginosa* виявлено у корисних комах - бджіл (*Apis mellifera*). *P. chlororaphis* викликає септицемію капустяної совки (*Mamestra brassicae*), сибірського шовкопряда (*Dendrolimus sibiricus*). Іноді спостерігаються випадки трансваріального зараження та загибелі комах нової генерації.

До детермінантів вірулентності належать фактори, що сприяють адгезії, інвазії, цитотоксичності. Для *Pseudomonas* характерна різноманітність вельми тонких механізмів регуляції експресії вірулентності. Активність механізмів регуляції спрямована на швидку адаптацію мікроорганізму до мінливих умов проживання та забезпечення максимальної економічності з енергетичної точки зору. Під час перебування його в зовнішньому середовищі фактори вірулентності не синтезуються. При потрапленні в організм хазяїна починається інтенсивний синтез білків, що сприяють розвитку інфекційного процесу. Сигналами для мікроорганізму про потраплення у внутрішнє середовище можуть бути зміни температури, рН середовища, контакт з мембраною еукаріотичних клітин. Розпізнавання таких сигналів здійснюють специфічні рецептори, локалізовані у клітинній стінці мікроорганізму. Передача сигналу, що забезпечує початок синтезу фактора вірулентності, від рецептора до гену, котрий

кодує білок, здійснюється двокомпонентними системами передачі сигналу, які діють за принципом послідовної активації ферментів у реакції фосфорилування та є універсальними в регуляції вірулентності мікроорганізмів.

В різні часи були описані облигатні анаеробні бактерії *Clostridium brevifaciens*, *C. malacosomae*, *C. perfringens* як ентомопатогенні види. Представлено численні матеріали про виділення з комах і різних субстратів дуже багатьох інших видів мікроорганізмів, значна частина яких володіє в тій чи іншій мірі ентомопатологічними функціями (*Bacillus: pumilus, brevis, badius, mycoides, megatherium, firmus, circulans, pantothenicus, stearotherophilus; Achromobacter: stenohalis, iophagus, liquefaciens; Proteus: mirabilis, bombycis; Micrococcus: conglomeratus, roseus; Brevibacterium lipolyticum; Aerobacter cloacae; Alcaligenes: faecalis, bookeri; Erwinia: aroideae, cassavae; Flavobacterium ferrugineum; Bacteroides succinogenes*).

Таким чином, особливості основних груп ентомопатогенних мікроорганізмів представлені декількома аспектами паразитування патогену в організмі живого хазяїна. По-перше, підсилюється метаболічна залежність паразиту від комахи-хазяїна з можливим тимчасовим відключенням ряду власних метаболічних процесів, по-друге, виробляються спеціальні механізми протидії паразиту захисним системам хазяїна.

Ефективність використання природних ентомопатогенів як засобів захисту рослин, тварин і людини від комах-шкідників залежить не тільки від їх функціональних біологічних особливостей, але й від технологій застосування препаративної форми в конкретних еколого-географічних регіонах, оскільки частота та інтенсивність масового розвитку шкідників сильно варіюють по регіонах, зонах, місцевостях через різноманіття ґрунтово-кліматичних і технологічних умов, за ступенем відповідності в системі «рослина - хазяїн - паразит - середовище».

Мікроорганізми з їх природним розмаїттям та набором біологічно активних речовин і функцій володіють багатьма цінними для практики властивостями, що дозволяє на їх основі створювати нові препаративні форми різного призначення. Сучасне уявлення та розкриття механізмів дії біоагентів базуються на симбіотичних взаємовідносинах мікроорганізмів і комах, характер яких залежить від фізіологічних, біохімічних та інших факторів і може змінюватися в умовах стресу. Ентомопатогенні організми з різним рівнем контагіозності привертають все більш пильну увагу як засоби не тільки разового пригнічення чисельності шкідливих видів, але й як такі, що служать для створення штучних вогнищ епізоотій у популяціях видів, які стримують масове розмноження, наростання чисельності і шкідливості. Володіючи вибірковою дією, ентомопатогенні мікроорганізми забезпечують активну участь

інших природних регуляторів чисельності в контролі фітофагів, а також збудників хвороб і бур'янів.

Список використаної літератури

1. Павлюшин В.А. Особенности биологической защиты растений в адаптивно-ландшафтном и интенсивном земледелии //Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2006. – Вып. 4. – С. 30 - 31.
2. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты //Сельскохозяйственная биология: сер. «Биология растений». – 2011. – №3. – С. 3-9.
3. Землеробство з основами екології, ґрунтознавства та агрохімії /Петриченко В.Ф., Бомба М.Я., Пати́ка М.В. та ін. – К.: Аграрна наука, 2011. – 492 с.
4. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* /Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. – Санкт-Петербург – Пушкин: Инновационный центр защиты растений, 2009. – 254 с.
5. Монастырский О.А. Нужны ли биопрепараты и биологическая защита растений в России? //Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2006. – Вып.4. – С. 60 - 70.
6. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage /G. Lo N. Tokuda, H. Watanabe, G. Arakawa //Mol. Ecol. – 2004. – Vol. 13(10). – P. 3219-28.
7. König H., Varma A. Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. – Springer, 2006. – 508 p.
8. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants /Adrián A. Pinto-Tomás, Mark A. et. all. //Science 20. – Vol. 326. – 2009. – P. 1120-1123.
9. Oliver K. M., Russell J. A., Moran N. A., Hunter M. S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003.— Vol. 100. – P. 1803-1807.
10. Hosokawa T., Kikuchi Y., Nikoh N. et all. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria //PLoS. Biol. – 4. – 2006. – P. 1841-1851.
11. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты /Под ред. В.В. Глупова. – М.: Круглый год, 2001. – 736 с.
12. Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми (Болезни насекомых) /под ред. М. С. Гилярова. – М.: Колос, 1972. – 640 с.
13. Baum J.A., Johnson & B.C. Carlton. *Bacillus thuringiensis* natural and recombinant bioinsecticide products. In: F.R. Hall & J.J. Mean (ed-s). Method in Biotechnology. – 1999. – Vol. 5. Biopesticides: use and delivery. Humano Press. Inc. Totowa N.J. – P. 189-209.
14. Hofte H., Whitely H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* //Microbiol. Rev. – V. 53. – 1989. – P. 242-255.
15. Данилов Л.Г. Научно-методические основы изучения энтомопатогенных нематод (*Rhabditidae*: *Steinernematidae*) и создания промышленных производств препаратов на их основе //Биологические средства защиты растений, технологии их изготовления и применения. – СПб, 2005. – С. 282-293.

Одержано редколегією

04.02.14