

# ЭНТОМОФТОРОВЫЕ ГРИБЫ — ПРОДУЦЕНТЫ БИОПРЕПАРАТОВ ЭПИЗООТИЙНОГО И ТОКСИЧЕСКОГО ТИПА ДЕЙСТВИЯ

**Э.Г. Воронина, Всероссийский НИИ защиты растений,  
С.-Петербург**

Совершенствование и внедрение в практику защиты растений микробиологических методов связано с увеличением выпуска и расширением ассортимента биопрепаратов. Их разработка на основе узкоспециализированных паразитов — энтомофторовых грибов (*Zygomycetes; Entomophthorales*) и внесение в те же биоценозы и популяции насекомых, из которых они выделены, практически не вызывает негативных изменений в окружающей среде.

Стратегия использования энтомофторовых грибов в начальный период была ориентирована на разработку биопрепаратов эпизоотийного типа действия. Создание таких биопрепаратов прежде всего зависело от возможности их получения промышленным способом, особенно при переходе к новым прогрессивным биотехнологиям.

В процессе исследования энтомофторозов, из гороховой тли нами были выделены в чистую культуру 5 видов грибов. Проведено сравнительное изучение их культуральных признаков в условиях поверхностного выращивания на разных питательных средах. Было установлено, что из всех изученных стадий развития гриба наиболее перспективной для создания искусственных эпифитотий являются покоящиеся споры, в массе образующиеся в поверхностной и глубинной культуре грибом *Entomophthora thaxteriana*. Все выделенные природные изоляты оказались низковирулентными (20—30%).

Повышение рентабельности производства биопрепаратов со всей остротой поставило вопрос об использовании высоковирулентных, стабильных и продуктивных форм штаммов-продуцентов. Направленный отбор высокоактивных форм осложнялся слабой изученностью изменчивости гриба.

В результате проведенных исследований разработан биологический метод оценки вирулентности, обеспечивающий минимальное колебание результатов и их воспроизводимость в серии идентичных экспериментов. Данный метод предложен для сравнительной оценки вирулентности разных штаммов и видов энтомофторовых грибов.

Стабильность признака вирулентности зависит от соотношения в популяции высоко- и низковирулентных изолятов. На основании генетической неоднородности изучаемого природного изолята и его моноконидиальных вариантов по вирулентности предложен способ селекции методом моноконидиального ступенчатого отбора. На 3-й ступени селекции из моноконидиального рассева исходной культуры получен стабильный по вирулентности изолят, превышающий в 2 раза активность материнского штамма. Результаты многократных проверок этого изолята показали, что отобранный штамм отличается высокой продуктивностью покоящихся спор и конидий, а также стабильной вирулентностью в отношении тест-насекомого — гороховой тли. По этим свойствам штамм рекомендован в качестве продуцента биопрепарата эпизоотийного типа действия — Микоафидина.

Нами установлены закономерности перехода патогена от вегетативной стадии развития к споруляции, выявлены специфические требования гриба к источникам азотного, углеродного, фосфорного и минерального питания. Независимо от азотсодержащего источника массовое спорообразование происходит при снижении в среде количества аминного азота до 10—15 мг%. Изменяя начальное содержание азота в питательной среде, можно регулировать выход покоящихся спор и продолжительность процесса выращивания. Количество покоящихся спор несколько увеличивается с повышением концентрации сахаров, но не зависит от скорости потребления

углеводов из среды и их количества, оставшегося в культуральной жидкости. Неорганический фосфор, макро- и микроэлементы стимулируют или ингибируют процесс спорообразования в зависимости от состава питательной среды.

Изучение условий, индуцирующих спорообразование гриба, позволило нам подобрать ряд дешевых питательных сред, содержащих соевую муку и белково-витаминный концентрат (БВК) в качестве азотного питания, глюкозу и гидрол, отходы крахмало-паточного производства — углеводного. Предложенные среды могут быть использованы для промышленного получения биопрепарата. Проведен так же поиск заменителей соевой муки и гидрола, ресурсы которых в настоящее время ограничены. Наиболее эффективным заменителем азотного питания оказалась вытяжка из гриба *Asp. Niger* — отхода производства лимонной кислоты. Однако использование мицелиальных сред пока ограничено отсутствием промышленных способов переработки этих отходов, хотя в целом по стране их запасы огромны. Принципиально доказана возможность применения в качестве углеводного питания зеленой патоки и гидролизатов древесины.

С целью безотходного производства возможно повторное использование фильтрата культуральной жидкости, содержащего до 3% не утилизованных сахаров и других ростовых веществ, что позволяет значительно улучшить споруляцию гриба, а также сократить сроки культивирования и расход углеводов почти в 2 раза.

Многолетние исследования позволили разработать экономически выгодные лабораторные технологии получения опытных образцов биопрепарата Микоафидин на основе покоящихся спор (схема), а также изучить механизмы образования, активации и их прорастания.

Полученные образцы Микоафидина испытывали в мелкоделяночных опытах с целью создания очагов заболевания. Показано, что развитие эпизоотии энтомофтороза в популяции гороховой тли наблюдалось на неделю раньше, чем в естественных условиях. При этом зараженность популяции увеличивалась в 1,5—2,0 раза по сравнению с контролем через 30—40 дней после внесения микоафидина в период сева и всходов и в 2—3 раза — через 16 дней при обработке посевов в фазе цветения и массового формирования бобов. Таким образом, покоящиеся споры, полученные *invitro*, могут служить в качестве инфекционного начала для интродукции патогена в биоценоз и создания искусственных эпизоотии энтомофтороза в популяции гороховой тли. При этом необходимо отметить, что покоящиеся споры, полученные *invitro*, способны прорасти и образовывать конидии, вызывающие заражение тлей. Однако создание искусственных эпизоотии энтомофтороза от покоящихся спор, полученных *invitro*, требует всестороннего изучения механизмов образования, созревания, активации прорастания спор, а также индуцирования ими эпизоотии.

После получения и испытания лабораторных образцов Микоафидина было обнаружено, что гибель основной массы тлей происходила уже через 24 ч. При этом не наблюдали типичных признаков энтофтороза у погибших насекомых. Трупы быстро высыхали и приобретали коричнево-черную окраску. При микроскопическом анализе не обнаружено развитие гриба в полости тела тли. Стало очевидным, что гибель тлей происходит в результате опережающего токсического действия, меняющего патогенез и влияющего на характер взаимоотношений паразита и хозяина.

Обнаружение опережающего токсического эффекта у Микоафидина обусловило возможность использования его в качестве афидоцидного препарата, вызывающего 50—70%-ную гибель гороховой тли при 2—3%-ной концентрации. Однако, как показали наши наблюдения, наличие в препарате крупнодисперсной фазы, состоящей из разрушенной биомассы, слипшихся спор и остатков питательной среды, затрудняет его применение.

С целью изыскания улучшенной токсической препаративной формы Микоафидина были проведены совместные исследования с Всероссийским ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии. В процессе выполнения этой работы показано, что переработка влажной биомассы на дезинтеграторах приводит к полному разрушению гифенных тел гриба и позволяет получить сухой продукт с повышенной стабильностью рабочей суспензии, но биологическая эффективность таких образцов не превышала 50—70% при 1—2%-ной концентрации (схема).

Таким образом, выявленные особенности развития гриба *E. Thaxteriana* при питании его *in vitro* и *in vivo* требуют переосмысления тактики использования, которая кроме эпизоотийного направления, может быть ориентирована на применение вторичных метаболитов в качестве биопрепаратов токсического типа действия.

Образующийся в процессе клеточной дифференциации токсин имеет внутриклеточную природу, не растворяется в воде и не выделяется в культуральную жидкость. Токсинообразование совпадает с началом споруляции. Изучены токсические свойства 11 природных изолятов и динамика токсинообразования гриба *E. Thaxteriana*. Подобраны эффективные растворители для экстракции токсинов, которые после извлечения из биомассы остаются в липидной фракции и представляют собой основу биопрепарата, названного нами Микоафидин Т (схема). Он представляет собой маслянистую жидкость темно-коричневого цвета со специфическим запахом, действует контактно и избирательно по отношению к разным видам тлей, вызывая их 70—100%-ную гибель. Наиболее чувствительными видами к Микоафидину Т в лабораторных и полевых условиях были бахчевая, большая хлопковая, зеленая яблонная и злаковые тли. Более устойчивой оказалась персиковая тля, 1%-ная концентрация препарата вызывала 50—60%-ную ее гибель.

Данные опытов показали, что Микоафидин Т обладает избирательностью действия не только в отношении тлей. Он не вызывал гибели личинок колорадского жука, гусениц капустной белянки, яблонной моли, лугового мотылька, яблонной медяницы, червецов ни при вскармливании, ни при контакте.

Микоафидин Т при применении образовывал в воде нестабильную эмульсию, что требовало введения эмульгаторов или специальных мешалок, обеспечивающих постоянное перемешивание рабочей жидкости.

С целью уменьшения содержания гидрофобных веществ липидной природы и улучшения препаративной формы был проведен гидролиз биомассы гриба *E. Thaxteriana*, в результате которого получен концентрат эмульсии — новый хорошо эмульгирующийся препарат, названный Энтоксом (схема).



Омыление липидов увеличивало выход токсических метаболитов в 2—3 раза по сравнению с Микоафидином Т. По биологической эффективности новый биопрепарат не отличался от Микоафидина Т.

Микоафидин, Микоафидин Т и Энтокс безвредны для энтомофагов и пчел, не фитотоксичны. Первичная токсикологическая оценка этих препаратов свидетельствует о их безопасности для теплокровных животных. LD50 Микоафидина Т — 4625 мг/кг, Энтокса — 2300 мг/кг. Указанные

биопрепараты не имеют аналогов в мировой практике.

На основании проведенных исследований показано, что массовое получение биомассы и спор возможно по технологии и на типовом оборудовании, которые применяются в микробиологической промышленности.

Используемые для выращивания гриба возобновляемые природные ресурсы, вторичное сырье, а также остатки биомассы от предыдущего цикла получения биопрепаратов и фильтраты культуральной жидкости позволили разработать регламенты получения биопрепаратов и технические условия Микоафидин, Микоафидин Т и Энтокс, а также замкнутые циклы их производства, безопасные для окружающей среды.

Задачи, связанные с лабораторными технологиями получения биопрепаратов (выбор оптимизированных питательных сред, селекция штаммов-продуцентов, ферментация, режимы культивирования, сушка, экстракция и гидролиз), частично решены уже 10 лет назад. Однако реализовать научные и методические решения по созданию этих биопрепаратов в биотехнологической практике до сих пор не представляется возможным осуществить из-за отсутствия специализированных установок по выпуску их опытных партий для широкой производственной апробации.

Вопрос о создании универсальных опытных установок для наработки первичных образцов биопрепаратов ставится на протяжении трех десятилетий, но до сих пор остается открытым. Потребность в опытных образцах биопрепаратов для их первичной проверки эффективности небольшая, а следовательно, требуется организация небольших универсальных опытных установок, которые способны быстро переключаться с производства одного вида продукта микробиологического синтеза на другой.

Получение первичных опытных партий препаратов должно быть оперативным, обслуживаться квалифицированным персоналом микробиологов и биотехнологов. В ходе наработки опытных образцов необходимо создание опытно-промышленной технологии, позволяющей в короткие сроки перейти к серийному производству биопрепаратов. XXI