

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 595

Академик Э. К. Африкян¹, М. А. Киносян¹, А. К. Окасов²,
Н. Л. Казанчян¹

Специфика энтомогенной микробиоты насекомых

(Представлено 9/IV 2014)

Ключевые слова: *тутовый шелкопряд, энтомогенная микробиота, энтомопатогенные бактерии, патология насекомых.*

Становление и развитие инфекционной патологии насекомых и микробиологического метода борьбы с вредителями. Приоритет в открытии инфекционной роли микроорганизмов у тутового шелкопряда приписывают [1] итальянскому микологу А.Басси (A.Bassi), установившему в 1835 г. грибную природу мускардины – распространенной в то время болезни на шелководческих фермах. Фактически это сообщение можно считать первым указанием в литературе о болезнетворных свойствах микробов вообще.

Тутовый шелкопряд *Bombyx mori* L. – хорошо известное хозяйственно полезное насекомое. Вместе с тем он явился объектом изучения, послужившим основой развития важного научно-практического направления микробиологии и смежных отраслей науки – микробиологической борьбы с вредоносными насекомыми. Именно на изучении болезней тутового шелкопряда основоположник микробиологии Луи Пастер [2] сформулировал основные положения инфекционной патологии и эпидемиологии:

- инфекционные болезни вызываются микробами;
- каждая инфекционная болезнь вызывается отдельным видом микроорганизмов;
- борьба с инфекционными болезнями должна иметь целью борьбу с микробами – их возбудителями.

Пастером был предложен целлюлярный метод борьбы с пембриной – злостным бичом шелководства, являющийся до настоящего времени наиболее эффективным методом против ее распространения. Его предложения об использовании микроорганизмов в борьбе с вредоносными насекомыми и грызунами заложили основы современной патологии насекомых и развития микробиологических методов борьбы с вредителями сельского хозяйства. Идеи Пастера нашли живой отклик: многими сотруниками

Института Пастера в Париже были выделены и описаны различные группы новых энтомопатогенных микробов, которые были предложены для борьбы с вредоносными насекомыми (И.Мечников, К.Туманов (С.Toumanoff), Д'Эрель (D. Herelle), С.Метальников, А. Пейо (A.Paillot)). Было организовано даже производство некоторых инсектицидных препаратов. Так, С.И. Метальников, работавший во Франции в 1940-е гг., организовал производство бактериального препарата, успешно использованного в борьбе с вредителями хлопчатника в Египте.

Существенно важное значение для развития работ в этой области имели открытие инсектицидной активности параспоральных кристаллоидных включений белковой природы у культур *Bacillus thuringiensis* [3], а также установление высокой специфичности для внутривидовой дифференциации *B. thuringiensis*, серотипизации его разновидностей по жгутиковому Н-антигену. Подобный принцип позволил охарактеризовать описанные культуры по отдельным серотипам, отражающим специфику инсектицидного спектра бактерий этого вида (табл. 1).

Таблица 1
Спектр инсектицидного действия разновидностей *B. thuringiensis* и других энтомопатогенных бацилл

Виды и разновидности бацилл	Целевое насекомое
<i>B.thuringiensis</i> (разные разновидности)	<i>Lepidoptera</i>
<i>B.thuringiensis ssp. israelensis</i>	Москиты, черная муха
<i>B.thuringiensis ssp. sd./tenebrionis</i>	<i>Coleoptera</i> , колорадский жук
<i>B.popilliae – lentimorbus</i>	Японский жук
<i>B.sphaericus (Lysinibacillus sphaericus)</i>	Москиты, комары

Как видно из представленной таблицы, спектр инсектицидного действия отдельных серотипов *B.thuringiensis* охватывает строго определенные виды и разновидности/серотипы энтомопатогенных бацилл. Особняком стоит группа *Bacillus popilliae – lentimorbus*, поскольку перспективы практического применения ее культур с помощью современных методов микробиологической ферментации сопряжены с большими трудностями.

Необходимо подчеркнуть существенный вклад в эту область, сделанный специалистами бывшего Союза, обеспечившими внедрение в практику микробиологического метода борьбы со многими вредоносными насекомыми [4-8].

С 60-х годов начинается организация крупнотоннажного производства микробиологических средств защиты растений. Во многих странах была разработана технология выработки различных препаративных форм инсектицидов и эффективного их применения. Лидером в этой области явился Советский Союз, где объем производства бактериальных инсектицидов доходил до 6-8 тыс. т в год.

Армения несомненно имеет определенные заслуги в этой области. В Институте микробиологии АН АрмССР в результате многолетних исследований были выделены и охарактеризованы многие энтомопатогенные бактерии и создана одна из обширных и хорошо охарактеризованных

коллекций энтомопатогенных культур бактерий (Л.Чил-Акопян, М.Киносян, Р.Бобикян, А.Хачатрян, С. Багдасарян и др.). Коллекция содержит около 5 тыс. штаммов энтомопатогенных бацилл, обладающих инсектицидными свойствами против многих вредоносных насекомых и векторов различных инфекций (блохи, комары, клещи и др.).

Следует отметить, что на начальной стадии организации промышленного производства инсектицидных препаратов были значительные трудности, вызванные явлением фаголизиса используемых штаммов. В этой связи исключительно важным явилось выделение в Институте микробиологии АН АрмССР новой разновидности *B. thuringiensis ssp. Caucasicus*, лишенной спонтанного фаголизиса и обладавшей высокой инсектицидностью. На основании этой разновидности был получен и внедрен в производство ряд штаммов для выработки препарата БИП (бактериальный инсектицидный препарат) для борьбы с вредоносными чешуекрылыми. Некоторое время этот препарат ежегодно вырабатывался и применялся на территории около 300 тыс. га в год.

На основе высокоактивного к комарам штамма 2477 новой разновидности *B. thuringiensis* был внедрен в производство mosquitoцидный препарат БЛП (бактериальный ларвицидный препарат), который успешно применялся как в Средней Азии, так и в Тюменской области (В. Меликсетян, Э. Карпов, Э. Африкян). В Армении на базе Абовянского завода биохимпрепаратов было освоено промышленное производство указанных инсектицидных препаратов, а также бактородентицида – бактериального препарата против грызунов (Э. Симонянц, В. Унанян, П. Татевосян).

Современный этап развития микробиологических средств борьбы с вредителями растений характеризуется интенсивным внедрением методов молекулярной генетики для создания новых перспективных штаммов – продуцентов инсектицидных препаратов, и особенно для получения трансгенных растений, резистентных к вредоносным насекомым [9, 10]. В этой области достигнуты исключительно важные результаты: в настоящее время методами современной генетической инженерии получены и внедрены в производство трансгенные кукуруза, хлопок, табак, томат, картофель и другие растения. Чтобы представить значимость этих работ, можно привести официальные данные: внедрение трансгенной кукурузы, устойчивой к злостному вредителю – мотыльку, и внедрение этого сорта в широкую практику обеспечило за 4 года чистую прибыль в размере 3 млрд. Долларов.

Важным и новым направлением является получение из энтомопатогенных бацилл канцеролитических соединений белковой природы, продуцируемых культурами *B. thuringiensis* и названных параспоринами. Работы в этой области, начатые японскими специалистами, расширяются и углубляются с большими перспективами [11].

Роль ауксотрофных бактерий в этиопатогенезе болезней насекомых. Решение поставленной в данном сообщении основной цели – выявление специфики микробиоты насекомых, осуществлялось изучением микрофлоры здоровых и больных гусениц тутового шелкопряда в различных эколого-географических условиях. Осуществлялся систематический сбор

образцов здоровых и больных гусениц и куколок тутового шелкопряда из выкормок различных ферм Армении, Грузии, Ставропольского, Краснодарского районов и Ленкорана (Азербайджан). В результате микробиологических анализов, продолжавшихся несколько лет, были выделены и охарактеризованы многие тысячи образцов энтомогенной микробиоты здоровых, больных и павших гусениц и куколок шелкопряда. В результате анализов испражнений, гемолимфы здоровых, больных и павших гусениц и куколок выделенные культуры бактерий подвергались 3-кратной очистке расеевом на мясопептонном агаре, после чего исследовались морфологические и биохимические особенности выделенных чистых культур для их идентификации.

Микробиота погибших от характерных поражений *B. thuringiensis* использовалась лишь для выделения штамма данного вида, для характеристики состава микрофлоры она не учитывалась.

Изучению природы бактериозов тутового шелкопряда во многом способствовала работа Э. Африкяна в течение одного года в Институте Пастера в Париже (1964-1965). Он имел возможность ознакомиться на месте в деталях со многими работами, включая экспонаты и записи Луи Пастера в его музее.

Уже на ранних этапах на обследованных фермах Кавказского региона было установлено наличие выкормок шелкопряда с отставанием в росте гусениц, а в дальнейшем и их куколок. На этих выкормках отмечались слабая поедаемость шелковицы, отставание в развитии и гибель гусениц, что хорошо известно со времен Пастера.

Проведенные микробиологические анализы этих выкормок выявили наличие в кишечнике гусениц массового размножения одноклеточных энтерококков и спорообразующих бактерий. Подробная характеристика физиолого-биохимических свойств этих бактерий выявила, что исследованные штаммы специфически нуждаются в дополнительных ростовых факторах, а именно: в витаминах группы В – тиамине и биотине, а также в некоторых аминокислотах, особенно лейцине и изолейцине.

Надо отметить, что ознакомление с оригинальными иллюстрациями 2-го тома классического труда Луи Пастера «Исследования болезней шелкопряда» (1870) с большой очевидностью доказывает аналогию с наблюдениями Пастера над больной партией гусениц, пораженных «фляшерией», в бытность его работы на ферме в Лез Але (Les Ales).

Уже при одном наблюдении подобных выкормок бросались в глаза сравнительно мелкие размеры гусениц и куколок (рис. 1, 2). Выделенные и подробно охарактеризованные бактерии нуждались в качестве дополнительного ростового фактора в витаминах и аминокислотах. Они были идентифицированы как *Enterococcus sp.*, зависимый от тиамина, *Bacillus biotini*, *Candida sp.*, *Brevibacterium sp.*, зависимые от биотина. Ряд выделенных штаммов нуждался в отдельных аминокислотах.



Рис. 1. Гусеницы тутового шелкопряда 5-го возраста: 1 – нормальная, 2 – вскормленная биотинзависимой культурой *B. biotini*, шт. 273.

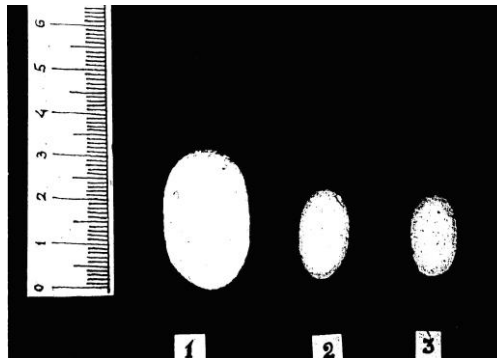


Рис. 2. Коконы тутового шелкопряда: здоровый (1); полученный после вскармливания штаммом тиаминзависимой *Enterococcus sp.* (2); полученный после вскармливания биотинзависимой культурой *B. biotini*, шт. 273 (3).

В лабораторных условиях с использованием синтетической диеты, разработанной в Японии, были проведены испытания в стерильных условиях на гусеницах тутового шелкопряда с дополнительным вскармливанием культурами микроорганизмов, нуждавшихся в витаминах и аминокислотах. Полученные результаты полностью подтвердили роль аукотрофных бактерий, обитающих в микрофлоре кишечника гусениц, в развитии нарушений их роста, а также куколок с нарушениями метаболизма (рис. 3).

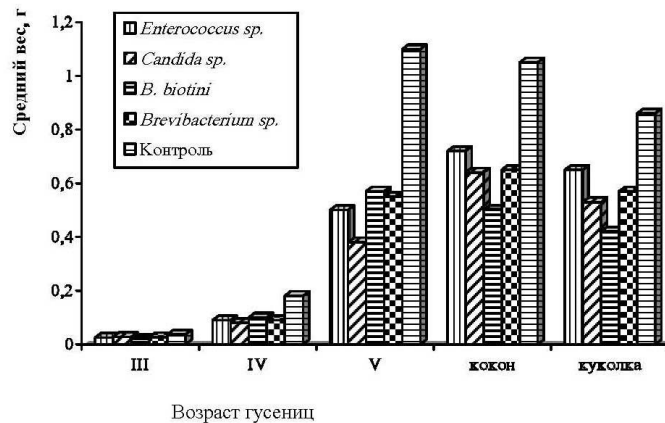


Рис. 3. Влияние подкормки витаминзависимыми культурами бактерий на развитие тутового шелкопряда. Смертность гусениц, %: *Enterococcus sp.* (тиамин) – 20, *Candida sp.* (биотин) – 60, *B. biotini* (биотин) – 66, *Brevibacterium sp.* (биотин) – 52, контроль – 0. Знак ⁻ в конце слова указывает на дефицитность от данного витамина.

Как представлено на рис. 3, при обильном развитии в кишечной микрофлоре отдельных витаминзависимых штаммов отмечается значительная гибель гусениц – в пределах 20-60%.

Подобная картина отмечается в опытах со скормливанием бактериями, нуждающимися в аминокислотах – глутаминовой кислоте, аланине, метионине, лейцине и изолейцине (табл. 2).

Таблица 2

**Содержание аминокислот в гемолимфе гусениц шелкопряда
(с и без бактериальной подкормки, содержание аминокислот
в 5-м возрасте, мг/мл)**

Бактериальная подкормка	Glu	Ala	Meth	Leu+Ileu
<i>Bacillus cereus</i> , шт. 600 (Glu ⁻ , Meth ⁻)	0.8	0.4	0.05	0.8
<i>B. megaterium</i> , шт. 422 (Ileu ⁻)	0.6	0.5	0.02	0.02
<i>B. megaterium</i> , шт. 430 (Leu ⁻ , Ileu ⁻)	0.4	0.6	0.01	0.02
<i>B. licheniformis</i> , (Ala ⁻)	1.3	0.2	0.04	0.6
Контроль, без подкормки бактериями	3.2	0.3	0.15	2.2

Обобщающая схема по характеристике энтомопатогенного действия микроорганизмов, обитающих в кишечнике, представлена на рис.4.

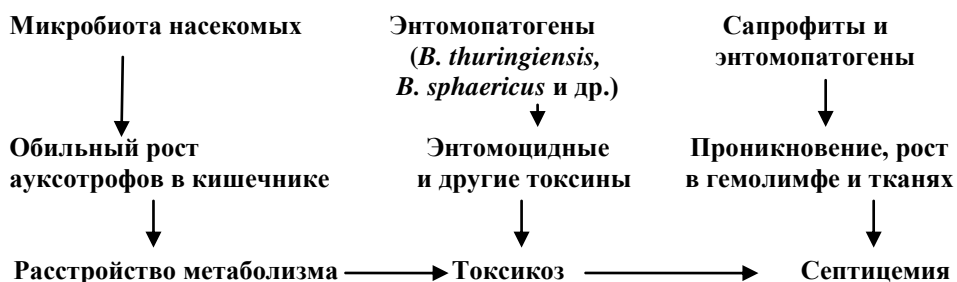


Рис. 4. Характеристика энтомопатогенного действия микроорганизмов.

Согласно договору о содружестве с Институтом медико-биологических проблем РАН в 2013 г. штамм 837 *B.thuringiensis* в рамках космической программы БИОН, руководимой проф. В.К.Ильиным, был экспонирован на Международной космической станции (МКС) в течение одного месяца. Затем этот штамм и его аналог на Земле были изучены для выявления различий в инсектицидной активности и морфо-физиологических свойств. Проведенные исследования выявили отсутствие каких-либо значительных различий между указанными штаммами. Исследования в этом направлении продолжаются.

¹Центр депонирования микробов н/п центра «Армбиотехнология» НАН РА
e-mail: microbio@sci.am

²Научный центр противинфекционных препаратов, Алматы, Казахстан

Академик Э. К. Африкян, М. А. Киносян,
А. К. Окасов, Н. Л. Казанчян

Специфика энтомогенной микробиоты насекомых

Обобщены результаты многолетних исследований по изучению кишечной микрофлоры насекомых, в частности тутового шелкопряда, в различных эколого-географических условиях, а также в лабораторных условиях на синтетической диете. Установлено распространение в кишечной микрофлоре тутового шелкопряда бактерий, нуждающихся в витаминах группы В и незаменимых аминокислотах. Их обильное развитие в кишечной микрофлоре приводит гусениц к метаболическим расстройствам, вплоть до их гибели.

Экспонирование в течение одного месяца на Международной космической станции в апреле 2013 г. культуры 837 *B.thuringiensis ssp. caucasicus* в рамках космической программы БИОН не оказало существенного влияния на его инсектицидную активность и физиолого-биохимические свойства.

Ակադեմիկոս Է. Գ. Աֆրիկյան, Մ. Ա. Կինոսյան,
Ա. Կ. Օկասով, Ն. Լ. Դազանչյան

Միջատների բնածին միկրոֆլորայի յուրահատկությունը

Ամփոփվել են միջատների, հատկապես թթենու շերամորդի, աղիքային միկրոֆլորայի ուսումնասիրման բազմամյա հետազոտությունների արդյունքները էկոլոգա-աշխարհագրական տարբեր պայմաններում, ինչպես նաև լաբորատորիայում սինթետիկ դիետայի օգտագործմամբ: Հաստատվել է թթենու շերամորդի աղիքային միկրոֆլորայում բակտերիաների լայն տարածումը, որոնք իրենց աճի համար պահանջում են В խմբի վիտամիններ և անփոխարինելի ամինաթթուներ: Նրանց առատ զարգացումը աղիքային միկրոֆլորայում հանգեցնում է շերամորդի մետաբոլիկ խանգարումների, ընդհուպ մինչև նրանց մահանալը:

2013 թ. ապրիլին մեկ ամսվա ընթացքում ԲԻՈՆ տիեզերական ծրագրի շրջանակներում *B. thuringiensis ssp. caucasicus* 837 շտամը փորձարկվել է Միջազգային տիեզերական կայանում: Նշված շտամի մոտ միջատասպան և այլ ֆիզիոլոգա-կենսաքիմիական հատկությունների փոփոխություն չի նկատվել:

Academician E. G. Afrikian, M. A. Kinosyan,
A. K. Okasov, N. L. Ghazanchyan

Specificity of Entomogenic Insect Microbiota

The results of long-term researches on intestinal microbiota of insects, particularly silkworm larvae in various ecological and geographical conditions as well as in laboratory conditions with synthetic diet have been summarized. High rate distribution of bacteria requiring vitamins and essentially important amino acids has been revealed in the microflora of larvae intestine. Abundant growth of such bacteria may cause the metabolic disorders and mortality of larvae.

Within the framework of the space program BION the strain 837 of *B.thuringiensis ssp. caucasicus* has been incubated for one month in April 2013 at the International Space Station. No changes in insecticidal activity or physiological and biochemical properties have been noted.

Литература

1. *Steinhaus E.A.* ed. Insect Pathology. AP. 1963.
2. *Pasteur L.* Etudes sur la maladie des vers a soie. Tome 2. Gauthier – Villars, Paris. 1870. 378 p
3. *Hannay C.L., Fitz-James P.* - Canadian J. Microbiol. 1955. 1(8). P. 694-710.
4. *Теленга Н.А.* Биологический метод борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур и лесных насаждений. М. 1958. 15 с.
5. *Талалаев Е.В.* Бактериологический метод борьбы с сибирским шелкопрядом. Иркутск. 1961.
6. *Красильников Н.А.* Микроорганизмы почвы и высшие растения. М. 1958.
7. *Полтев В.И.* Микрофлора насекомых. Новосибирск. Наука. 1969. 272 с.
8. *Африкян Э.К.* Энтомопатогенные бактерии и их значение Ереван. Изд-во АН Арм.ССР. 1973. 420 с.
9. *Burges H.D., Hussey N.W.* Eds. Microbial control of insects and mites. AP. 1971.
10. *Khetan S.* Microbial pest control. CRC Press, 2000.
11. *Kuroda S. et al.* - Curr Microbiol. 2013. V. 66. P. 475-480.