

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ У РАЗНЫХ ГРУПП НАСЕКОМЫХ И ИХ МОСКИТОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ

Ж.Х. ОРМАНЯН, П.Е. ТАТЕВОСЯН, А.А. ХАЧАТУРЯН,
М.А. КИПОСЯН, Э.К. АФРИКЯН

Институт микробиологии ИАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучена микрофлора 81 образца 10 отрядов насекомых, собранных в разных экологических зонах 15 стран. Наиболее богатыми патогенной микрофлорой оказались образцы насекомых, собранные в разных экологических нишах Армении. Из общего числа выделенных культур *Bacillus thuringiensis* (49 штаммов), *Bacillus sphaericus* (33 штамма), *Bacillus sp.* (103 штамма) на армянскую популяцию приходится 75,5, 78,8 и 66,0% соответственно. Наибольшее количество москитоцидных штаммов, выделенных из образцов представителей отрядов жесткокрылых (*Coleoptera*), чешуекрылых (*Lepidoptera*) и перепончатокрылых (*Hymenoptera*), также относится к армянской популяции. Установлено, что из испытанных культур высокотоксичными к личинкам комаров родов *Anopheles*, *Culex* и *Uranotaenia* оказались восемь штаммов *B. thuringiensis*, образующих кристаллические эндотоксины шаровидной формы.

Ուսումնասիրվել է միջատների 10 կարգերի 81 նմուշների միկրոֆլորան, հավաքված 15 երկրների տարբեր էկոլոգիական գոտիներից: Առավել հարուստ պաթոգեն միկրոֆլորա դիտվել է Հայաստանի տարբեր էկոլոգիական բնագոտիներից հավաքված միջատների նմուշներում: Հայտնաբերված կուլտուրաների ընդհանուր քվարանալուծ *Bacillus thuringiensis* (49 շտամ), *Bacillus sphaericus* (33 շտամ) և *Bacillus sp.* (103 շտամ) կուլտուրաների 75,5, 78,8 և 66,0 %-ը համապատասխանաբար բաժին է ընկնում հայկական պոպուլյացիային: Մոծակույտին շտամների առավելագույն քանակը, անջատված կարծրաքեղերի (*Coleoptera*), բեփուկաքեղերի (*Lepidoptera*) և քաղանքաքեղերի (*Hymenoptera*) կարգերի ներկայացուցիչների նմուշներից, նմանապես պատկանում է հայկական պոպուլյացիային: Պարզվել է, որ փորձարկված կուլտուրաներից *Anopheles*, *Culex* և *Uranotaenia* ցեղերի մոծակների թրթուրների նկատմամբ խիստ տոքսիկ եղել են *B. thuringiensis*-ի 8 շտամներ, որոնք առաջացնում են գնդաձև բյուրեղային էնդոտոքսիններ:

The microflora of 81 specimens from the 10 genera of insects collected in different ecological zones of 15 countries has been studied. The samples of insects, gathered in different ecological niches of Armenia, had the most rich pathogenic microflora. From the total number of isolated cultures the *Bacillus thuringiensis* (49 str.), *Bacillus sphaericus* (33 str.), *Bacillus sp.* (103 str.) concerned to the armenian population have composed 75,5, 78,8 and 66,0% respectively. The more of all strains with the mosquitocidal activity isolated from the insects of genera *Coleoptera*, *Lepidoptera* and *Hymenoptera*, were belonged to armenian population, too. From the all examined cultures the eight strains of *B. thuringiensis*, producing the spherical crystalline endotoxins, possessed the high toxic activity against larvae of mosquitoes from the genera *Anopheles*, *Culex* and *Uranotaenia*.

Энтомопатогенные бактерии - параспоральные кристаллы - эндотоксины - москитоциды - кровососущие комары

Несмотря на накопленный в мировой микробиологической литературе большой объем исследований по энтомопатогенным спорообразующим бактериям, интерес к ним не пропадает до наших дней [4,5,9,10,13,14,16,18].

Представители энтомоцидных бактерий видов *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus sphaericus* широко используются для борьбы с вредителями растений

и гнусом (комары, москиты). Обнаружены штаммы *B. thuringiensis*, токсичные для чешуекрылых, двукрылых, жесткокрылых, прямокрылых и др. [16]. Наиболее перспективные из них явились основой для производства микробиологических средств борьбы с вредными насекомыми [1,4,11]. Основным токсикологическим компонентом бациллярных инсектицидов являются белковые токсины (дельта-эндотоксин) в виде внутриклеточных параспоральных кристаллов разных форм, образующиеся в процессе споруляции. Описаны кристаллы бипирамидальные (крупные и мелкие), овальные, квадратные, сферические, неравномерно округлые, прямоугольные с неровными краями [18]. Мутантные подвиды *subsp. Kurstaki* образуют вытянутые бипирамидальные кристаллы с заостренными концами, в которых электронномикроскопически выявляются включения сферической и кубондной формы [5]. Кристаллы подвида *tenebrionis* имеют тетрагональную форму различной величины и электронной плотности [10,17].

Основным источником получения продуцентов дельта-эндотоксина являются насекомые. Многие авторы отмечают определенную приуроченность тех или иных подвидов (серотипов) *B. thuringiensis* к различным эколого-географическим зонам и отдельным отрядам насекомых [3,7,8,9,12].

Целью нашей работы явилось изучение экологии энтомоцидных бацилл в разных отрядах насекомых из разных регионов мира с поиском новых перспективных штаммов, вирулентных против комаров, а также выявление корреляции между токсичностью штамма и формой образуемых им кристаллических эндотоксинов.

Материал и методика. Объектами исследования служили в основном погибшие насекомые, собранные в Армении (Абовян, Анкалан, Бюракан, Гегарт, Гохт, Лукасян, Джрвез, Иджеван, Ереван, Мегри, Саркисандж), а также из Вьетнама, Заира, Индонезии (острова Сулавеси и Бали), Италии, Канады, Китая, Колумбии, Мозамбика, Новой Гвинеи и Соломоновых островов, Сингапура, Средней Азии, Филиппин и Франции.

Всего было обследовано 81 образец различных видов насекомых, принадлежавших к отрядам стрекоз (*Odonoptera*), таракановых (*Blattoptera*), богомоловых (*Mantoptera*), палочников (*Phasmoptera*), прямокрылых (*Orthoptera*), полужесткокрылых (*Heteroptera*), жесткокрылых (*Coleoptera*), перепончатокрылых (*Hymenoptera*), двукрылых (*Diptera*), чешуекрылых (*Lepidoptera*).

Для выделения бактерий образцы насекомых после растирания в воде и их последующей пастеризации при температуре 70° в течение 20 мин высевали на поверхность среды в чашках Петри. Рост бактерий учитывали на 2-3 сутки инкубации при 30°. Культуры бактерий разных видов после микроскопии световым микроскопом с фазовым контрастом выделяли и очищали. Инсектицидные свойства новых культур изучали по методу Карпова [6] в отношении личинок комаров рода *Anopheles*, *Culex* и *Uranotaenia*, собранных в водоемах южных районов Армении. Москитоцидную активность новых бактериальных культур устанавливали путем инфинирования воды, предназначенной для подопытных личинок, помещенных в химические стаканы емкостью 100 мл. Изучаемую культуру микроорганизма, снятую с поверхности твердой питательной среды, сначала суспендировали в пробирке в 1 мл воды, затем вливали в стакан с 19 мл деклорированной воды, куда вносили 10 личинок комаров природной популяции. В контроле использовать стерильную воду. Температурный режим 26-27°. Учет погибших личинок проводили в первые часы после постановки опыта и через 24-48 ч.

Таблица 1. Распространение культур спорообразующих бактерий в микрофлоре насекомых

Насекомос (отряд)	Место сбора спрашков	Количество в расщепе Число штаммов		<i>Bacillus thuringiensis</i> Форма кристаллов										<i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus sp.</i>				
				шаровидная, квадратная	ромбическая	ромбоидальная, двойная, ромбовидная, квадратная	ромбовидная, квадратная	ромбовидная, квадратная, многогранная	квадратная	квадратная, многогранная	многогранная	прямоугольная						
													шаровидная			шаровидная, квадратная	ромбическая	ромбоидальная, двойная, ромбовидная, квадратная
Стрекозы <i>Odonoptera</i>	Индонезия (остров Сулавеси)	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	Филиппины	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Гараклиновые <i>Blattoptera</i>	Армения	1	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	Колумбия	1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2
Богомолковые <i>Mantoptera</i>	Армения	1	6	1	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Палочники <i>Phasmoptera</i>	Нокья Гвинея	3	7	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2	1
	Армения	1	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Прямкрылые <i>Orthoptera</i>	Филиппины	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Армения	9	18	-	-	3	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	10
Жесткокрылые <i>Coleoptera</i>	Армения	29	77	6	1	4	1	3	1	-	-	-	1	-	-	-	19	41
	Звир	1	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
	Иран	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Италия	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Канада	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
	Средняя Азия	1	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Франция	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Перепончатокрылые <i>Hymenoptera</i>	Армения	4	7	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	3
Двукрылые <i>Diptera</i>	Армения	1	3	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Чешуекрылые <i>Lepidoptera</i>	Армения	7	14	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2	9
	Вьетнам	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Индонезия (остров Сулавеси)	2	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
	Индонезия (остров Бали)	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Китай	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Мозамбик	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Новая Гвинея (Соломоновы о-ва)	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
	Сингапур	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Филиппины	4	19	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Всего	15	81	195	12	2	15	4	4	3	2	1	2	3	1	1	43	103	

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Таблица 2. Москитоцидная активность новых штаммов *Bacillus thuringiensis* с разными формами кристаллов в отношении личинок комаров рода *Anopheles*, *Culex* и *Uranotaenia* (культуры выращены на Р11, титр бактериальных суспензии 150-250 тыс./мл спор)

Источники выделения (названия видов)	Место сбора насекомых	Количество штаммов	Рабочие номера активных штаммов	Форма кристаллов	Гибель личинок (%) спустя 30-45 мин
<i>Coloptera</i>	Армения, Абовян	1	71-1 (эталон)	пирамидальная	100
<i>Coloptera</i>	Армения, Анкаван	1	321-1	"	100
<i>Coloptera</i>	Армения, Гукясян	1	320-1	"	100
<i>Mantoptera</i>	Армения, Местри	1	313-2	"	100
<i>Coloptera</i>	Заир	1	331-5	"	100
<i>Lepidoptera</i>	Индонезия, остров Сулавеси	1	306-2	"	100
<i>Phasmatoptera</i>	Новая Гвинея	1	324-2	"	100
<i>Coloptera</i>	Средняя Азия	1	322-1	"	100
<i>Idanoptera</i> , <i>Phasmatoptera</i> <i>Hemiptera</i> <i>Mantoptera</i> <i>Coloptera</i> <i>Euphyllota</i>	Армения, Анкаван, Бюракан, Гоху, Дзрвж, Ереван, Иджеван, Новая Гвинея, Филиппины	22		ромбовидная	0
<i>Mantoptera</i> <i>Coloptera</i> <i>Lepidoptera</i>	Армения, Анкаван, Сараландж, Новая Гвинея: Соломоновы о-ва	3		многогранный	0
<i>Mantoptera</i>	Новая Гвинея	1	-	квадратная	0
<i>Euphyllota</i>	Новая Гвинея: Соломоновы о-ва	1	-	прямоугольная	0
<i>Coleoptera</i> , <i>Hemiptera</i>	Армения, Абовян, Ереван	2	-	ромбовидная, шаровидная	0
<i>Phasmatoptera</i>	Новая Гвинея	1	-	ромбовидная, квадратная	0
<i>Lepidoptera</i>	Армения, Абовян	1	-	ромбовидная, многогранная	0
<i>Hemiptera</i>	Армения, Гегарт	1	-	многогранная, квадратная	0
<i>Coloptera</i>	Армения, Бюракан	1	-	квадратная, непрозрачная	0
<i>Mantoptera</i>	Армения, Дзрвж	1	-	квадратная, многогранный	0
<i>Coloptera</i>	Армения, Бюракан	1	-	квадратная, ромбовидная, многогранная	0
<i>Mantoptera</i>	Армения, Абовян	2	-	ромбовидная, многогранная, квадратная	0
Всего					0

Результаты и обсуждение. В результате исследований патогенной микрофлоры погибших насекомых - вредителей сельскохозяйственных культур, проведенных в 1996-97 гг., из 81 образца насекомых выделено 195 культур спорообразующих бактерий, отнесенных к видам *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus* и *Bacillus sp.* В табл.1 обобщены данные по изучению микрофлоры образцов 10 отрядов насекомых, собранных в экологических зонах 15 стран.

В микрофлоре образцов представителей отрядов стрекоз, таракановых, прямокрылых, жесткокрылых и чешуекрылых из зарубежных стран в большинстве случаев культуры *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus sphaericus* не были выделены.

Наиболее богатыми патогенной микрофлорой оказались образцы насекомых, собранные в разных экологических нишах Армении. Так, из общего числа выявленных культур *B. thuringiensis* (49 штаммов), *Bacillus sphaericus* (33 штамма) и *Bacillus sp.* (103 штамма) на армянскую популяцию приходится 75,5, 78,8 и 66,0% соответственно.

Следует отметить, что наибольшее количество штаммов, токсичных для личинок комаров, выделено из образцов представителей отрядов жесткокрылых (*Coleoptera*), чешуекрылых (*Lepidoptera*) и перепончатокрылых (*Hymenoptera*), а также из популяций Армении.

В процессе выделения чистых культур *B. thuringiensis* особое внимание обращалось на форму кристалловидных эндотоксенов (табл.1). В отобранных штаммах обнаружены шаровидные, ромбовидные, квадратные, многогранные, прямоугольные кристаллы, смешанные, с преобладанием какой-либо одной формы или однородные. Здесь особенно важно подчеркнуть, что все работы проводились с использованием одной и той же питательной агаризованной среды с 2% гидролизованной рыбной пасты.

В результате испытаний установлено, что из 45 штаммов с различными формами кристаллов в отношении 7 видов комаров (*Anopheles maculipennis*, *Culex pipiens*, *C. modestus*, *C. hortensis*, *C. territans*, *C. thieleri*, *Uranotaenia unguiculata*) москитоцидную активность проявили лишь штаммы с шаровидными кристаллами - гибель личинок уже спустя 30-45мин достигала 100%, тогда как остальные 37 штаммов не проявили активности и через 48ч наблюдения (табл.2).

Подобная корреляция формы кристаллов с москитоцидной активностью может служить важным дополнительным признаком при поиске энтомоцидных штаммов бацилл с высокими токсичными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э.Г. Успехи микробиологии, 10, 142-172, М., Наука, 1975.
2. Африкян Э.К., Чил-Акопян Л.А. Биолог. журн. Армении, 33, 4, 355-365, 1980.

3. Барайцук Г.В., Кулатин В.С., Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении, 39, 4, 275-284, 1986.
4. Егоров Н.С., Юдина Т.Г. Производство и применение продуктов микробиологических производств. 6, 50, М., ВНИИСНТИ Минмедбиопрома, 1989.
5. Калмыкова Г.В., Бурцева Л.И., Юдина Т.Г. Микробиология, 64, 4, 461-468, 1995.
6. Карпов Э.Г., Игнатъев В.И., Полов А.И. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов - регуляторов численности опасных насекомых и клещей. М., 1984.
7. Ле Тьен Фюнг, Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении, 39, 4, 332-333, 1986.
8. Меликсетян В.Ш. Автореф. канд. дисс., 18, Абовян, 1989.
9. Миненкова И.Б., Акимова М.И., Лин Фу и др. Биотехнология, 1, 17-22, 1996.
10. Солонцов И.Л., Юдин Т.Г. Микробиология, 65, 2, 235-240, 1996.
11. Чилингарян В.А., Орманян Ж.Х., Казарян Б.К. Биолог. журн. Армении, 33, 4, 403-415, 1980.
12. Чилингарян К.О. Биолог. журн. Армении, 33, 4, 398-402, 1980.
13. Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений. Со. научн. тр. ВАСХНИЛ СО, 136, Новосибирск, 1987.
14. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Микробиология, 66, 1, 25-31, 1997.
15. De Lucea A.J., Simonson J.L., Larson A.D. Can. J. Microbiol., 27, 865-870, 1981.
16. Hofte H., Whiteley H. Microb. Rev., 53, 2, 242-255, 1989.
17. Krieg A.Z. angew. Entomol., 96, 5, 500-508, 1983.
18. Meadows M.P., Ellis D.Y., Butt J., Jarret P., Burges H.D. Appl. Environm. Microbiol., 58, 4, 1344-1350, 1992.

Поступила 5.V.1997