

УДК 573.6

doi: 10.17223/19988591/18/4

В.В. Гулий

Вермонтский университет (Бурлингтон, Вермонт, США)

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕСТИЦИДЫ КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ В США

Приведен краткий анализ основных направлений научных и технологических работ в США в области биотехнологии микробных пестицидов. В числе новых перспективных исследований названы в первую очередь работы по созданию новых экспериментальных штаммов микроорганизмов, активных в отношении вредных для человека видов. Указанные работы ведутся как на основе трансформации генома микроорганизмов, так и с использованием гибридизации штаммов, обладающих различными полезными свойствами. Из традиционных направлений уделяется внимание поиску и идентификации вторичных микробных метаболитов, совершенствованию технологии производства и применения микробных пестицидов.

Ключевые слова: *биопрепараты; гибридизация; метаболиты; технология производства грибов; применение препаратов.*

Мировой рынок микробиологических препаратов, используемых для борьбы с вредными организмами, имеющими значение в сельском хозяйстве, медицине и других сферах человеческой деятельности, стремительно растет, несмотря на глобальные экономические проблемы. За 5 лет с 2005 по 2010 г. продажа микробиологических пестицидов выросла с 672 миллионов до одного миллиарда долларов. Мировым лидером по объему производства и ассортименту препаратов являются США. Причина лидерства не только в экономических и технологических возможностях страны, но и, главным образом, в общественном мнении, которое все в большей степени смещается в сторону борьбы за экологически чистые продукты и сохранение окружающей среды. Общественное мнение отражают средства массовой информации, что обеспечивает внимание правительственных органов и способствует выделению соответствующих ресурсов.

В настоящее время основную долю в общем объеме производства микробных пестицидов в США занимают препараты на основе бактерий и грибов. Весь комплекс работ по созданию и применению микробиологических средств борьбы с вредными организмами включает научные, технологические и коммерческие аспекты. Базовые исследовательские работы в области микробиометода ведутся в США в различных направлениях с широкой международной кооперацией, которой способствует правовое положение университетов, имеющих широкие возможности привлечения в аспирантуру

талантливой молодежи из различных стран мира и замещения должностей в научных и учебных учреждениях на международной основе. Научная часть работ по рассматриваемой проблеме в значительной части переместилась на молекулярный уровень. Успехи молекулярной биологии существенно влияют на развитие микробиологического направления в регуляции численности вредных для человека организмов. Прежде всего идентификация микроорганизмов проводится на основе анализа ДНК на всех этапах исследований от первичного выделения до практического использования. Большое внимание уделяется всесторонней оценке перспективности микроорганизмов для практического использования с позиции активности воздействия на целевой объект и сопутствующие виды, возможности производства, продуктивности, циркуляции в окружающей среде и т.д. Отбор нативных изолятов из природы все в большей степени замещается экспериментальными штаммами. В США впервые были получены и испытаны генетически модифицированные штаммы энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae*, отличающиеся повышенной инсектицидной активностью [1]. Исследования по трансформации генома микроорганизмов, предназначенных для использования в открытых биоценозах, встречают определенные трудности. Общественное мнение в США не готово поддерживать или хотя бы нейтрально относиться к работам по получению генетически модифицированных видов организмов, поскольку еще недостаточно исследованы возможные последствия насыщения природных биоценозов новыми формами живых организмов. Тем не менее ведутся интенсивные исследования генетики микроорганизмов, имеющих значение для микробиологического регулирования численности вредных организмов. Так, в 2010 г. была закончена полная расшифровка генома двух важных для биоконтроля видов энтомопатогенных грибов, включая *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* [1].

В последние десять лет активизировались работы по гибридизации энтомопатогенных грибов и грибов-антагонистов [2–3]. Это стало возможным с появлением на рынке достаточно большого ассортимента ферментов, обеспечивающих получение протопластов грибных клеток без существенного разрушения клеточных структур. Конъюгация протопластов, полученных из микробных клеток, относящихся к разным штаммам или видам, позволяет комбинировать полезные свойства и тем самым достигать нужных результатов в практической работе по регуляции численности вредителей. Конъюгация протопластов рассматривается как наиболее перспективное направление в современной биотехнологии [4]. В числе приоритетных исследований следует особо отметить индукцию иммунитета растений на основе эндофитного сосуществования энтомопатогенных грибов в тканях сельскохозяйственных растений. На примере некоторых видов растений, в частности кофе, было установлено, что присутствие в растительных тканях грибов, относящихся к родам *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* и *Paecilomyces*, обеспечивает устойчивость к фитонематодам, насеко-

мым и фитопатогенным микроорганизмам [5]. Исследования, проведенные на хлопчатнике, показали, что энтомопатогенные грибы *Beauveria bassiana* и *Lecanicillium* spp. обеспечивают защиту растений как от насекомых, так и от возбудителей болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, относящимися к родам *Pythium*, *Rhizoctonia* и *Fusarium* [6]. Это новое направление работ заслуживает особого внимания для развития микробиологического направления в борьбе с вредными организмами.

Не исчерпали себя и традиционные биотехнологические направления, связанные с оптимизацией массового производства микробиологических пестицидов и технологии их практического применения в полевых условиях. В настоящее время известно приблизительно 22 500 активных микробных метаболитов, продуцируемых бактериями, актиномицетами и грибами. Среди них обнаружены и органические вещества, селективно действующие на определенные группы вредителей и возбудителей болезней растений и животных. Данное направление интенсивно развивается и является весьма перспективным [7–9]. Если в случае бактериальных гетеротрофных бактерий процессы ферментации в значительной степени универсальны и достаточно хорошо отработаны, то для энтомопатогенных грибов и грибов-антагонистов технологии массового производства находятся в стадии совершенствования. Проблема в том, что полноценные грибные конидии мицелиальных грибов могут быть получены только на твердом субстрате. Широко практикуемый метод двухэтапного культивирования грибов нуждается в оптимизации, поскольку затрудняет механизацию и автоматизацию процессов, делает сложной защиту от микробной контаминации, что сказывается на стоимости и качестве конечного продукта. Трудно составить объективное представление о состоянии технического оформления процессов производства микопестицидов в США, как и в любой другой стране, поскольку все нововведения, к сожалению, относятся на определенных этапах к коммерческой тайне.

Нами предложен новый вариант производства мицелиальных грибов, который принципиально отличается от существующих методов. Технологический процесс включает два основных блока. Первый блок обеспечивает глубинное культивирование гриба в ферментере или на качалке. Оригинальность нового технологического процесса заключена во втором блоке, где происходит нанесение жидкой грибной биомассы на бумажный или матерчатый ленточный носитель, который движется совместно с воздушно-пузырчатой лентой. Лента обеспечивает изоляцию и последующую аэрацию каждого инокулированного слоя носителя. Носитель по мере инокуляции грибным материалом укладывается последовательно слоями или формируется в виде рулона. Метод пригоден практически для всех видов мицелиальных грибов как энтомопатогенных, так и грибов-антагонистов. Помимо высокой продуктивности нового метода немаловажное значение для производства имеет и то обстоятельство, что новый метод на порядок

сокращает производственные площади, производственный цикл и упрощает защиту материала от контаминации посторонней микрофлорой в сравнении с традиционным двухэтапным методом с использованием зерна в качестве питательного субстрата. Затраты времени на производство единицы продукции с использованием нового метода и принятого в качестве сравнения сокращаются за счет разной скорости спороношения грибов [10].

Немаловажное значение имеет технология практического применения микробиологических средств, особенно тех, которые в своем составе в качестве действующего начала имеют живые микробные пропагулы. Промышленные штаммы микроорганизмов, попадая в окружающую среду, вступают в конкуренцию с представителями дикой микробиоты и могут быть быстро инактивированы. Необходимо предусматривать специальные меры, чтобы обеспечить длительную циркуляцию полезного организма, входящего в состав микробиопрепарата, после попадания его в окружающую среду. В этом направлении проводятся специальные исследования в Вермонтском университете в северо-восточном регионе США. Эффективным оказалось введение в препаративные формы дополнительных компонентов, обеспечивающих питание микроорганизмов в местах применения. Грибные гранулированные препараты, обеспечивающие дополнительное питание грибов, были проверены в полевых условиях. Оценка количества грибных пропагул *B. bassiana* в 1 г почвы через час после применения препарата показала наличие 46 ± 22 инфекционных единиц. Через две недели этот показатель составил 789 ± 13 . Через два месяца количество грибного материала снизилось до 174 ± 17 , но превышало исходный уровень почти в 4 раза. В случае с *M. anisopliae* увеличение числа инфекционных единиц гриба было не столь значительным: через час после применения – 84 ± 1 и через 2 недели – 200 ± 1 на 1 г почвы. Через два месяца количество грибных пропагул превышало исходный уровень в 2 раза [11]. При обработке надземной части растений грибные конидии смешивались с мелкодисперсным порошком молочной сыворотки, являющимся дешевым побочным продуктом производства сыра и казеина [12–13]. При обработке надземной части растений препаратами на основе сыворотки репродукции грибов не наблюдалось в связи с недостатком влаги, однако жизнеспособность конидий сохранялась более длительное время в сравнении с контролем, где использовался коммерческий микоинсектицид [14]. Гранулированные микоинсектициды, обеспечивающие дополнительное питание грибов, существенно увеличивают циркуляцию этих патогенов в почве, что дает возможность снизить нормы расхода препаратов и одновременно повысить их эффективность. Что касается применения рассматриваемой возможности для борьбы с открытоживущими членистоногими, то препараты на основе сыворотки могут быть полезны с точки зрения продления жизнеспособности грибных пропагул в периоды недостатка влаги.

Интенсивность исследовательских и технологических работ по созда-

нию новых и совершенствованию существующих микробиологических пестицидов дает основание сделать заключение, что использование конвенциональных ядохимикатов будет продолжать сокращаться с каждым годом. Препараты, обладающие универсальным биоцидным действием, будет целесообразно использовать исключительно в закрытых помещениях, где требуется полное уничтожение вредного вида. В открытых био- и агробиоценозах регуляция численности вредных для человека видов будет осуществляться на основе селективно действующих биологических средств.

Результаты исследования были представлены автором на Международной молодежной научной школе «Пищевые технологии и биотехнологии» (Томск, 18–22 июня 2012 г.), организованной ФГБ ОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (ГК № 12.741.11.0112 от 14 мая 2012 г.).

Литература

1. Leger R.J.St., C. Wang. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests // Applied Microbiology. 2010. № 85. P. 901–907.
2. Leger R.J.St., Screen C.S. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds // Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential / eds. by T.M. Butt, C. Jackson, N. Morgan. CABI, Oxfordshire, 2001. P. 219–238.
3. Federici B.A., Bonning B.C., St. Leger. Improvement of insect pathogens as insecticides through genetic engineering // PathoBiotechnology / eds. by C. Hill, R. Sleator. Landes Bioscience, Austin, 2008. P. 15–40.
4. Verma N., Bansal M.C., Kumar V. 2008. URL: www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/96Verma.pdf
5. Vega F.E., Posada F., Aime M.C. et al. Entomopathogenic fungal endophytes // Biological Control. 2008. № 46. P. 72–82.
6. Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // The ecology of fungal entomopathogens / ed. by Helen Roy. 2010. P. 113–128.
7. Porter N., Fox F.M. Diversity of microbial products – discovery and application // Pesticide Science. 1993. Vol. 39. P. 161–168.
8. Donadio S., Monciardini P., Alduina R. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites // Biotechnology. 2002. Vol. 99. P. 187–198.
9. Berdy J. Bioactive microbial metabolites // Antibiotics. 2005. Vol. 58. P. 1–26.
10. Гулий В.В., Гулий С., Паркер Б. и др. Новый метод массового производства энтомопатогенных грибов // Интегрированная защита растений: стратегия и тактика : материалы междунар. конф. Минск, 2011. С. 211–217.
11. Гулий В.В., Прищона Л.И. Оптимизация практического применения микопестицидов в защите растений от вредных членистоногих // Интегрированная защита растений: стратегия и тактика : материалы междунар. конф. Минск, 2011. С. 201–205.
12. Mawson A.J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement // Bioresource Technology. 1994. № 47. P. 195–203.

13. Kassa A., Brownbridge M., Parker B.L. et al. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* // Mycological Research. 2008. № 112. P. 583–591.
14. Skinner M., Parker B.L., Gouli S.Y. et al. Survivability of Fungal conidia on the plants after application of mycopesticides in greenhouse. IOBC, Collected Articles: Plant Protection in Green House Conditions – XXI century outlook, Institute of Plant Protection. National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2010. P. 83–88.

Поступила в редакцию 29.05.2012 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 2 (18). P. 35–40

doi: 10.17223/19988591/18/4

Vladimir V. Gouli

University of Vermont, Burlington, Vermont, USA

MICROBIAL PESTICIDES AS OBJECT OF BIOTECHNOLOGICAL RESEARCH IN THE USA

The short information related specific features and future prospect of biotechnological research linked with microbial pesticides are summarized. The genetic manipulation with microbial strains, search of active secondary metabolites, new approaches to mass-production and application of formulations for control of pests are discussed. Particular attention is spared to the new technology of production of mycelial fungi and special formulations with nutrient substrata providing long term circulation of the useful fungi in surroundings. Based on intensive development of biotechnological work associated with microbial pest control author is made the conclusion that in the future application of conventional chemical pesticides with universal biocide activities will be intensive decreased. Pest control in the open natural and agricultural communities will be realized based on selective biological formulations. Chemical conventional pesticides will be irreplaceable only in closed facilities where is necessary to do completely destruction of the pests.

Key words: biopreparation; gibridization; metabolites.

Received May 29, 2012