



Od badań szczegółowych do preparatu grzybowego

Cecylia Bajan

Zakład Agrocenologii

Instytut Ekologii

Polska Akademia Nauk, Dziekanów Leśny k. Warszawy

From detailed study to entomopathogenic preparation

Summary

The aim of this paper is the presentation of research carried out in Agroecology Department of Ecology Institute Polish Academy of Sciences on the ecology and biology of several species of entomopathological fungi (*Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *P. fumosoroseus* and *Verticillium lecanii*) and attempts of their application in the biological fight against plant pests.

Problems including the occurrence of entomopathogenic fungi in Poland, their activities in relation to insects, the choice of the most profitable culture media, the methods of fight against the pest, the reactions to antropogenic pollutions and repellent properties of the fungi have been discussed. The laboratory (semi – technical) and industrial methods of the production of fungal preparations have been discussed.

Key words:

entomopathogenic fungi, antropogenic impact, pest control, practical utilization, biological preparation.

Adres do korespondencji

Cecylia Bajan,
Zakład Agrocenologii,
Instytut Ekologii,
Polska Akademia Nauk,
Dziekanów Leśny
k. Warszawy,
05-092 Łomianki;
e-mail:
ekolog@warman.com.pl

biotechnologia

3 (50) 58–64 2000

Grzyby owadobójcze jako czynnik ograniczający liczebność owadów są obiektem badań na świecie od wielu lat. Na temat wykorzystywania ich w zwalczaniu biologicznym istnieje pokaźna literatura w postaci oryginalnych prac eksperymentalnych i monografii. Dla przykładu wymienić można klasyczne opracowania(1-7). Te i wiele innych opracowań posłużyły zespołowi w Instytucie Ekologii PAN zajmującemu się grzybami owadobój-

czymi ustalić kolejność i zakres tematów badawczych dotyczących entomopatogenów grzybowych najczęściej występujących w warunkach Polski.

Prace rozpoczęto od określenia składu grzybów owadobójczych infekujących stonkę ziemniaczaną. W latach sześćdziesiątych stonka ziemniaczana była nowym, groźnym szkodnikiem naszych agrocenoz zajmującym wciąż nowe obszary. Celowe zatem było, jak się wydawało, rozpoczęcie badań mających na celu określenie gatunków grzybów owadobójczych występujących w polskich agrocenozach. W badaniach naszych prowadzonych w centralnej Polsce wykazano, że najczęściej spotykanymi gatunkami grzybów owadobójczych są *Paecilomyces farinosus* i *Beauveria bassiana* (8). Ich aktywność była zróżnicowana i zależała od miejsca występowania oraz od pory roku. Dla przykładu, w okresach jesienno-zimowych, w latach 1966-1968 w badanych agrocenozach dominantem był gatunek *P. farinosus*, zaś jego aktywność w porażeniu stonki ziemniaczanej w różnych rejonach badawczych wahała się w granicach 20-100%. W tych samych próbach gatunek grzyba *Beauveria bassiana* był rzadziej spotykany, a porażenie stonki wynosiło 2-34% (8-11).

W późniejszych prowadzonych badaniach potwierdzono wpływ środowiska na strukturę dominacyjną grzybów. W badanych środowiskach leśnych dominującym głównym grzybem owadobójczym izolowanym ze ściółki leśnej, gleby i owadów był gatunek *B. bassiana*, a gatunek *P. farinosus* występował jako subdominant. Występujące również w środowisku leśnym gatunki *P. fumosoroseus* i *Metarhizium anisopliae* częściej izolowane były z gleby niż ściółki (12).

Poddane szczegółowemu badaniu uzyskane izolaty grzybów unaocznily, że w obrębie każdego gatunku występują pewne formy grzyba charakteryzujące się różną reakcją na to samo podłoże hodowlane i temperaturę (13). W przypadku form *P. farinosus* było to różne zabarwienie kolonii (od białego do kremowego), zróżnicowanie zabarwienia podłoża od żółtego poprzez pomarańczowe do karminowego. Kolonie przybierały różny kształt, różne było tempo wzrostu. Zmieniało się zabarwienie i liczba powstałych koremiów. Odmienne były czas zarodnikowania i wymiary zarodników. Miało miejsce również zróżnicowanie patogeniczności tych form grzyba w stosunku do poszczególnych stadiów rozwojowych stonki ziemniaczanej. Wymienione różnice morfologiczno-fizjologiczne utwierdziły nas w przekonaniu, że mamy do czynienia z odmiennymi szczepami lub ekotypami grzyba (14).

W dalszych eksperymentach wykazano, że różne szczepy grzyba charakteryzują się zróżnicowaną wydajnością produkcji grzybni. Wśród badanych 15 szczepów *P. farinosus* ciężar suchej biomasy grzybni wahał się od 0,20 do 0,48 g. Różna była również produkcja zarodników i siła kiełkowania. Liczba produkowanych zarodników z 1 cm² podłoża w zależności od formy grzyba wynosiła od 333 000 do 8 092 000. Siła kiełkowania po 48-godzinach wynosiła 1-88% (15).

Między badanymi gatunkami grzybów owadobójczych zaobserwowano również zróżnicowaną wrażliwość na warunki hodowli i źródła pokarmu. Przykładem może być reakcja poszczególnych gatunków grzybów owadobójczych na ilość azotu podanego w innych związkach i produktach lub węgla podanego w różnych cukrach. Re-

dukcja ta widoczna była w szybkości wzrostu kolonii grzybów, produkcji biomasy grzybni i w zarodnikowaniu. W badaniach wykazano, że najkorzystniejsze warunki dla rozwoju gatunku *B. bassiana* istnieją, wówczas gdy grzyb ma dostępną laktozę. Natomiast dla dobrego rozwoju gatunku *P. farinosus* potrzebne są laktoza i sacharoza. Gatunek *P. fumosoroseus* dla dobrego rozwoju wymaga obecności w podłożu hodowlanym maltozy (15). Oprócz źródła azotu dużą rolę w reakcji grzybów odgrywa jego ilość.

Brak jakichkolwiek źródeł azotu w podłożu obniża wytwarzanie biomasy grzybni, zaś bardzo wysoka dawka powoduje całkowite zahamowanie wzrostu grzybni. Dobrymi związkami azotu dla badanych grzybów są drożdże, bulion, pepton, kukurydza. Obecność ich w podłożu zwiększa 10-krotnie produkcję biomasy w porównaniu z produkcją biomasy na podłożu z zawartością nieorganicznych związków azotu. Różne związki azotu lepiej wykorzystywane są przez gatunek *P. farinosus* niż *B. bassiana* (15).

Wyniki badań dotyczące wpływu nawozów mineralnych (NPK) na grzyby owadobójcze świadczą również o zróżnicowaniu reakcji na poszczególne składniki. Nawozy z dużą względną zawartością azotu stymulują wzrost 2 gatunków grzybów owadobójczych: *B. bassiana* i *P. fumosoroseus*. Względnie duża zawartość fosforu w nawozie zwiększa wzrost gatunków *B. bassiana*, *P. farinosus* i *P. fumosoroseus*, podczas gdy obecność zwiększonej ilości potasu najkorzystniej wpływa na wzrost gatunku *P. farinosus* (16).

Wyniki tych badań, jak się wydaje, mogą być wykorzystane w procesie opracowywania biotechnologii produkcji preparatu grzybowego.

Na zmianę aktywności grzybów owadobójczych oprócz nawozów mineralnych mają także wpływ pestycydy i zanieczyszczenia przemysłowe.

Grzyby owadobójcze stanowiące część mikroflory glebowej są bezpośrednio narażone na ich działanie ponieważ, jak wiadomo, wszystkie środki chemiczne i ich produkty rozpadu są gromadzone w glebie. Wiele przeprowadzonych przez nas badań wskazuje również na różnorodną reakcję poszczególnych gatunków i ich ekotyposów na rodzaj i koncentrację pestycydów i zanieczyszczeń przemysłowych (17-20).

Zanieczyszczenia antropogeniczne znajdujące się w atmosferze i ich sedymentacja w agrocenozach i lasach ma wpływ na różnorodność gatunkową mikroorganizmów w tym również grzybów owadobójczych. Negatywne oddziaływanie tych wpływów może wyrażać się, np. w zaburzeniach w korzystaniu z bazy pokarmowej środowiska co może mieć bezpośredni wpływ na osłabienie aktywności mikroorganizmów.

Prowadzone przez nas badania nad występowaniem i strukturą dominacyjną grzybów owadobójczych w środowisku lasów sosnowych różnie skażonych przez SO_2 i NO_x pozwoliły stwierdzić, że grzyby owadobójcze posiadają dość dobrze rozwinięte właściwości adaptacyjne w stosunku do czynników antropopresyjnych. Czynniki te nie eliminują badanych grzybów ze środowiska choć odpowiednio do stopnia zanieczyszczenia środowiska w którym występują zmieniają ich strukturę

dominacyjną. W miejscach o niższym skażeniu najczęściej występuje gatunek *Metarhizium anisopliae*, w strefie skażenia średniego gatunek *B. bassiana*, a w strefie skażenia silnego gatunek *P. farinosus* (21).

Omówione właściwości przystosowawcze wymienionych grzybów owadobójczych do stopnia zanieczyszczenia środowiska przez SO_2 i NO_x mogą być pomocne przy wyborze odpowiedniego grzyba do zastosowania go jako czynnika regulacyjno-zwalczającego w danym środowisku leśnym. Właściwy wybór entomopatogena stwarza szansę na jego utrzymanie się przez dłuższy czas w danym środowisku dzięki odnawianiu się jego form aktywnych w kolejnych pokoleniach owadów.

Grzyby owadobójcze, jak wiele organizmów glebowych, reagują na zanieczyszczenia wywołane metalami ciężkimi. W stosunkowo niedawno rozpoczętych przez nas badaniach nad wpływem miedzi, cynku i ołowiu na wybrane szczepy 23 i 58 *B. bassiana* wykazano, że wymienione metale mają istotny wpływ na procesy życiowe tych szczepów. Wpływają na wzrost kolonii grzybów, biomasę i patogeniczność.

W badaniach Barabasza i wsp. (22) oraz przez nas (23) wykazano, że grzyby glebowe, w tym owadobójcze, są zdolne do bioakumulacji metali ciężkich. W wyniku przeprowadzonej przez nas analizy suchej masy grzybni dwóch badanych szczepów *B. bassiana* stwierdzano znaczną kumulację miedzi, cynku i ołowiu. Kumulacja metali była zróżnicowana i zależała od badanego szczepu. Cynk kumulowany był na podobnym poziomie przez oba szczepy *B. bassiana*. Poziom kumulacji był wyższy 55 razy w stosunku do kontroli. Zróżnicowane właściwości kumulacyjne miały miejsce także w przypadku miedzi i ołowiu. Zdecydowanie większa kumulacja obu metali stwierdzona została w suchej masie grzybni szczepu 23 *B. bassiana*.

Z danych literaturowych wynika, że proces biokumulacji związany jest m.in. z pH środowiska, które w trakcie rozwoju kolonii grzyba ulega obniżeniu (22). W przypadku naszych szczepów szybciej zakwaszał podłoże szczep 58 *B. bassiana* niż szczep 23 *B. bassiana*. Być może ta różnica we właściwościach badanych szczepów *B. bassiana* objaśnia różnice w biokumulacji miedzi i ołowiu (23).

W przeprowadzonej analizie zarodników badanych szczepów zebranych z hodowli skażonych poszczególnymi metalami ciężkimi wykazano, że zarodniki te nie zawierały zwiększonej ilości metali ciężkich w porównaniu z kontrolą. Również w analizie owadów infekowanych tymi zarodnikami nie wykazano podwyższonej zawartości metali ciężkich w porównaniu z kontrolą (23,24).

Zjawisko to można tłumaczyć stwierdzeniem Cervantesa i wsp. (25) według których metale ciężkie wychwytywane są przez niektóre składniki ściany komórkowej grzybni oraz metalotioniny i fitochelatyny. Według tych samych badaczy to one odpowiedzialne są za unieruchamianie metali ciężkich w cytoplazmie blokując w ten sposób przemieszczanie się ich do zarodników.

Intensyfikacja rolnictwa pociąga za sobą wzrost ilości stosowanych pestycydów pochodzenia chemicznego i biologicznego, co może wpływać na zmianę interakcji w środowisku i zmianę biologicznej aktywności mikroorganizmów. Znane są fakty, że pestycydy lub produkty ich rozpadu mogą wchodzić w relacje z poszczególnymi

organizmami, wpływając na nie w momencie wprowadzenia do środowiska lub w ciągu całego sezonu wegetacyjnego.

W wieloletnich badaniach dotyczących wpływu wybranych czynników antropopresyjnych na reakcje grzybów owadobójczych wykazano, że różnorodność ich przebiegu zależy od gatunku i ekotypu grzyba owadobójczego oraz od rodzaju i koncentracji tych czynników znajdujących się w środowisku. Przykładem tego m.in. może być reakcja grzybów owadobójczych na działanie insektycydów. Wyniki naszych badań świadczą o tym, że stosowane w Polsce insektycydy nie eliminują grzybów owadobójczych ze środowiska choć niektóre z nich mogą ograniczać ich wzrost lub osłabiać zdolności infekcyjne. Inny przykład adaptacji grzybów owadobójczych w skażonym środowisku to ich reakcja na działanie SO_2 i NO_x . Przeprowadzone badania świadczą o tym, że grzyby owadobójcze nie są eliminowane ze środowiska, a ich ilość niewiele różni się od notowanych na terenach nieskażonych (26-29, 19, 30, 12).

Poza działaniem na grzyby owadobójcze czynników antropopresji wpływ również mają różne czynniki biologiczne. Do nich zaliczyć można grzyby saprofityczne. W doświadczeniach naszych wykazano, że na porażonych przez grzyby owadobójcze owadach występują również grzyby saprofityczne. Zachodzące między nimi interakcje nie powodowały na ogół wzajemnego wyniszczania się, chociaż niekiedy wpływały na zahamowania rozwoju. Fakt ten zwiększa szansę skutecznego działania dla grzybów owadobójczych introdukowanych do gleby i utrzymania się ich przez dłuższy czas w większych ilościach w stosunku od naturalnie występujących w danym środowisku (31).

Przedstawione informacje dotyczące możliwości przystosowania się grzybów owadobójczych i ich reakcji do zmieniających się warunków pozwoliły na rozpoczęcie prac nad grzybowym preparatem biologicznym. Pierwsze prace dotyczyły półtechnicznej produkcji biopreparatu grzybowego. Opublikowane wyniki mogą być wykorzystywane także obecnie w półtechnicznej produkcji (32).

Wprowadzone według tej metody do gleby grzyby zachowują swoją wysoką aktywność infekcyjną w stosunku do owadów przez dwa okresy wegetacyjne. Oprócz bezpośredniego działania redukującego na ilość szkodników wykazują również wpływ na liczbę następnych pokoleń. Świadczą o tym wyniki uzyskane przez nas po introdukcji do gleby grzybów *B. bassiana* i *Paecilomyces farinosus* przeciwko stoncy ziemniaczanej. U stonki ziemniaczanej, która przeżyła kontakt z tymi grzybami zaobserwowałyśmy zmniejszenia liczebności kolejnych pokoleń, i ich biologicznej aktywności (33).

Opracowano również we współpracy z Pabianickimi Zakładami Farmaceutycznymi „Polfa” metodę produkcji materiału infekcyjnego na skalę przemysłową. Dotyczy to zarówno biopreparatu opartego na bazie zarodników konidialnych grzyba *B. bassiana* jak i *Verticillium lecanii*. Przemysłowa technologia wytwarzania tych preparatów jest opanowana i reproduktywna. Metody produkcji przemysłowej dwóch preparatów zostały opatentowane (34,35).

Istotą tego osiągnięcia jest opracowanie metody hodowli wglębnej grzybów dzięki której uzyskuje się duże zagęszczenie zarodników konidialnych w stosunku do blastospor w preparacie. Proces produkcyjny trwa kilka dni, a zarodniki konidialne są aktywne przez ponad 3 lata. W związku z tym produkcja biopreparatu nie musi być korelowana z pojawem szkodnika (27).

Grzyby owadobójcze *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. farinosus* i *P. fumosoroseus* oprócz zdolności do porażania i uśmiercania owadów posiadają również właściwości repelentne. Właściwości te stwierdzone w warunkach eksperymentalnych i polowych zostały opublikowane i opatentowane (36).

Od dwóch lat badania nad możliwością wykorzystania grzybów owadobójczych w praktyce rolniczej koncentrują się nad zwalczaniem pędraków chrabąszcza.

Przytoczone tu wyniki badań uzyskane w IE PAN, jak się wydaje, stanowią określony wkład do znajomości niektórych mechanizmów odpowiedzialnych za skuteczność działania omawianych grzybów owadobójczych w regulacji populacji owadów, a także poszerzają bądź potwierdzają wyniki innych badaczy z zakresu biologii, ekologii i możliwości stosowania ich jako regulatorów populacji szkodników roślin.

Literatura

1. Sachtleben H., (1941), *Biologische Färkämpfungs, Massnahmen*, in: Sorauer P., *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*, Berlin, 6-2, 1-120.
2. Steinhaus E. H., (1956), *Microbial control – the emergence of anidea. A brief history of insect pathology trough the nineteanth century*, Hilgardia, Ri Berkeley, 26, 107-460.
3. Müller-Koegler E., (1965), *Pilzkrankheiten bei Insecten*, P. Parey, Berlin-Hamburg, 444.
4. Sandner H., (1962), Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., Warszawa, 35, 117-131.
5. Lipa J. J., (1963), *Polska analityczna bibliografia chorób owadów*, cz. 1. *Choroby i mikrobialne zwalczanie szkodliwych owadów*, Pr. Nauk. IOR, 1, cz. I, 3-101.
6. Weiser J., (1966), *Nemocihmyz*, Praha, 554.
7. Burges H. D., Hussey D., (1971), *Microbial control of insects and mites*, Academic Press, New York, 861.
8. Bajan C., Kmitowa K., (1968), *Biul. Branż. Hod. Rośl. Nas.*, 5, 49-54.
9. Bajan C., Kmitowa K., (1968), *Nowe Rolnictwo*, 12, 30-32.
10. Bajan C., Kmitowa K., (1968), *Post. Nauk Roln.*, 3(111), 21-25.
11. Bajan C., Kmitowa K., (1970), *Ekol. Pol.*, 25, 521-529.
12. Bajan C., Kmitowa K., Mierzejewska E., Popowska-Nowak E., Miętkiewski R., Górski R., Miętkiewska Z., (1997), *IOB wpr. Bulletin*, 19(9), 208-211.
13. Kmitowa K., Bajan C., Wojciechowska M., (1972), *Ekol. Pol.*, 20, 413-421.
14. Bajan C., Kmitowa K., (1972), *Rola grzybów owadobójczych jako naturalnych czynników ograniczających występowanie owadów szkodliwych* (ekspertyza), wyd. V, Wyd. PAN, Warszawa, 26.
15. Kmitowa K., (1978), *Pol. Ecol. Stud.*, 4, 3, 1-46.
16. Bajan C., (1982), *Pol. Ecol. Stud.*, 8, 3-4, 473-487.
17. Bajan C., Kmitowa K., Wojciechowska M., (1977), *Pol. Ecol. Stud.*, 3, 2, 65-77.
18. Wojciechowska M., Bajan C., Kmitowa K., (1978), *Entomologia a intensyfikacja rolnictwa*, 123-144.
19. Bajan C., Kmitowa K., (1982), *Pol. Ecol. Stud.*, 8, 3-4, 489-497.
20. Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., (1995), *Pol. Ecol. Stud.*, 21, 1, 69-88.
21. Bajan C., Kmitowa K., Mierzejewska E., Popowska-Nowak E., Miętkiewski R., Górski R., Miętkiewska Z., (1995), *Entomopathogenic fungi inhabiting forest litter and soil in pine forests differing in the level*

- of environmental pollution*, Abstract of the 5th European Meeting „Microbial Control of Pests“ (27 August-1 September, 1995, Poznań), 54.
22. Barabasz W., Galus A., Opalińska-Piskorz J., Sepioł J., Tomasiak P., (1997), *Oddziaływanie jonów na mikroorganizmy*, Mat. Konf. Nauk., Kraków, 1997, 3-11.
 23. Bajan C., Tyrawska D., Popowska-Nowak E., Bienkowski P., (1998), *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, 5, 8-9, 685-692.
 24. Tyrawska D., Popowska-Nowak E., Bienkowski P., Bajan C., (1999), *Chemia i Inżynieria Ekologiczna*, 6(5-6), 533-539.
 25. Cervantes C., Gutierrez-Corona F., (1994), *Fems. Microbiol Rev.*, 14, 2, 21-128.
 26. Wojciechowska M., Kmitowa K., Bajan C., (1977), *Pol. Ecol. Stud.*, 3, 2, 43-57.
 27. Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., Mierzejewska E., (1994), *Post. Nauk. Roln.*, 3, 13-21.
 28. Bajan C., Kmitowa K., Wojciechowska M., (1977), *Pol. Ecol. Stud.*, 3, 2, 65-77.
 29. Bajan C., Kmitowa K., Wojciechowska M., (1978), *Ekol. Koop. Bratysława*, 3, 63-64.
 30. Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., (1995), *Pol. Ecol. Stud.*, 21, 1, 69-88.
 31. Bajan C., (1978), *Ecol. Pol. Stud.*, 4, 2, 5-54.
 32. Bajan C., Kmitowa K., Wojciechowska M., (1975), *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II*, 23, 45-47.
 33. Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., (1982), *Pol. Ecol. Stud.*, 8, 3-4, 363-407 (synthesis).
 34. Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., Mierzejewska E., Łubisz K., Szczepaniak J., Trzczińska Z., Majdziak K., Sedlaczek L., Goźlińska H., (1992), *Urząd Patentowy RP*, patent nr 159685.
 35. Bajan C., Fedorko A., Mierzejewska E., Kmitowa K., Łubisz K., Filip A., Szczepaniak J., Goźlińska H., Sedlaczek L., (1996), *Urząd Patentowy RP*, patent nr 169335.
 36. Kmitowa K., Bajan C., Fedorko A., (1986), *Urząd Patentowy PRL*, patent nr 133932.