

Восприимчивость личинок *Anopheles messeae* Fall. и *Culex pipiens pipiens* L. к энтомопатогенным грибам *Metarhizium*

В. П. ХОДЫРЕВ, И. М. ДУБОВСКИЙ, В. Ю. КРЮКОВ, В. В. ГЛУПОВ

Институт систематики и экологии животных СО РАН
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11
E-mail: vhodyrev@inbox.ru

Статья поступила 17.12.2013

АННОТАЦИЯ

Исследована динамика смертности личинок комаров *Anopheles messeae* Fall. и *Culex pipiens pipiens* L. под действием энтомопатогенных грибов *Metarhizium brunneum* и *Metarhizium robertsii* в лабораторных условиях. Показано, что *C. pipiens* более восприимчивы к внесению конидий в виде водной суспензии, тогда как *A. messeae* – к внесению сухих конидий. Смертность личинок комаров под действием наиболее вирулентной культуры и дозы 2×10^6 конидий/см² составила 87,5–92,5 %. Обсуждены перспективы использования грибов для подавления численности кровососущих комаров.

Ключевые слова: восприимчивость, личинки *Anopheles messeae*, *Culex pipiens pipiens*, энтомопатогенные грибы *Metarhizium*.

Существенным компонентом водных ценозов являются личинки кровососущих комаров, которые в Сибирских водоемах представлены довольно обширной группой видов [Кухарчук, 1980]. Личинки комаров, с одной стороны усиливают круговорот веществ, потребляя большое количество микроорганизмов (бактерии, водоросли, простейшие и т. п.), с другой стороны, выступают в качестве кормовой базы для организмов, обитающих в водной среде: рыб, хищных беспозвоночных и др. [Сазонова, 1984]. Среди многих представителей комаров на территории Сибири следует выделить роды *Culex* и *Anopheles*, которые составляют существенную долю фауны и могут быть переносчиками опасных инфекций [Розендал, 1998; Goddard, 2002; Sutherland et al., 2010].

На численность комаров значительное влияние оказывают хищники и болезнетвор-

ные микроорганизмы. Среди последних большое внимание привлекают кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* и энтомопатогенные грибы родов *Tolypocladium*, *Coelomomyces* и др. Последние два десятилетия активно проводились исследования по использованию бактерий *B. thuringiensis* против личинок кровососущих комаров. Кроме того, в качестве агентов контроля численности личинок кровососущих комаров стали рассматривать энтомопатогенные грибы рода *Metarhizium* (Ascomycota, Нурочеалес). Эти грибы широко известны как обитатели наземных биоценозов, для которых характерно проникновение в организм насекомых через кутикулу, однако показано, что в водной среде данные грибы могут инфицировать комаров не характерным для них способом – через кишечник [Miranpuri et al., 1991; Butt et al., 2013].

Показано, что уровень смертности личинок может зависеть от вида и штамма патогена [Ansari et al., 2010], ряда средовых факторов [Hegedus, Khachatourians, 1995; Koenraad et al., 2004], способов внесения конидий грибов в водоем. Основными способами данного внесения являются обработка водной суспензией грибов (опрыскивание), когда конидии находятся в толще воды и постепенно оседают на дно, и обработка сухими конидиями (опыливание), когда грибы длительное время находятся на поверхности воды. Следует отметить, что личинки кровососущих комаров обладают различными поведенческими, анатомическими и физиологическими приспособлениями к питанию в различных слоях водной толщи и к различным субстратам. Так личинки *Anopheles* питаются с поверхности воды, а личинки *Culex* относятся к фильтраморам, питающиеся взвешенными частицами из более глубоких слоев воды [Тарасов, 1996]. Таким образом, способ внесения патогена может иметь важное значение, так как сказывается на том, в каком виде и где будет присутствовать патоген и, соответственно, определять уровень инфекционной нагрузки по отношению к личинкам комаров.

Отметим, что в России влияние грибов *Metarhizium* на комаров практически не изучалось. Имеется лишь одна работа [Кальвиц, Кухарчук, 1974], где показано, что опыливание водной поверхности конидиями *M. anisopliae* приводило к 60 %-ной гибели личинок *Culex pipiens*. Открытым остается вопрос о наиболее эффективном способе внесения грибов в среду обитания комаров.

Цель настоящей работы – анализ выживаемости личинок *C. pipiens* и *A. messeae* при разных способах внесения в воду энтомопатогенных грибов *Metarhizium*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы грибов из коллекций микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН и ИПЭЭ РАН. Конидиальную массу грибов нарабатывали на автоклавированном пшене [Kryukov et al., 2009]. Личинок комаров *C. pipiens* и *A. messeae* собирали в водоемах Новосибирской области. Эксперименты проведены на личинках второго возраста. Садками для личинок служили пластиковые контей-

неры размером $11 \times 15,5 \text{ см} = 160,5 \text{ см}^2$ с объемом воды 400 мл. Вода использовалась из водоемов, в которых развивались комары. Температура воды в садках на протяжении экспериментов составляла 23–25 °С. Личинок кормили ежедневно сухими пивными дрожжами в количестве 2,5 мг/садок. Внесение грибов в садки с личинками проводили двумя способами: внесение сухих конидий (опыливание) и добавление водной суспензии (опрыскивание). Дозы вносимой инфекции составляли $2 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^6$ конидий/см² на садок. В контрольные садки конидии грибов не вносились. Эксперименты ставились в четырех повторностях с 10 личинками в каждой. Смертность личинок учитывали ежедневно на протяжении 12 сут. Анализ времени выживания личинок проводили с использованием теста Каплана – Маейра (SigmaStat 3). При анализе итоговой выживаемости проводили преобразование процентов в $\sqrt{\arcsin}$ и анализировали с помощью *t*-теста (Statistica. 6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный скрининг трех культур показал, что оба вида грибов вызывали гибель *A. messeae*. Наименьшая активность была характерна для изолята Ram-1 *M. brunneum* (см. таблицу). При обработке данной культурой отмечено длительное время гибели и достоверно ($p < 0,05$) более низкие показатели итоговой смертности по сравнению с изолятами Mali *M. brunneum* и P-72 *M. robertsii*. Гибель от последних двух культур достоверно не отличалась. Однако по всем исследуемым показателям отмечена тенденция к более высокой активности культуры Mali *M. brunneum*. Дальнейшие эксперименты проводили с культурой Mali на двух видах комаров *C. pipiens* и *A. messeae*, используя два способа внесения гриба: опыливание и опрыскивание.

Установлено, что смертность *C. pipiens* при внесении суспензии (опрыскивание) была несколько выше, чем при внесении сухих конидий (опыливание) (рисунок, а). Так, отличия в итоговой смертности (12 сут) при опрыскивании оказались выше на 11–13 % в зависимости от титра, при этом различия оказались достоверными ($t > 3,4$, $df = 6$, $p < 0,015$). Время выживаемости при внесении суспензии также снижалось по сравне-

Показатели выживаемости личинок *A. messeae* после обработки сухими спорами разных культур *Metarhizium*

Вид, штамм	Доза инокулюма и показатели выживаемости			
	$1 \cdot 10^6$		$2 \cdot 10^6$	
	LT ₅₀	выживаемость на 12 сут	LT ₅₀	выживаемость на 12 сут
<i>M. brunneum</i> , Ram-1	–	53 ± 2 ^{bc}	8 ± 0,8 ^b	32 ± 2 ^{bc}
<i>M. brunneum</i> , Mali	7 ± 0,5	27 ± 2 ^a	6 ± 0,2 ^a	8 ± 3 ^a
<i>M. robertsii</i> , P-72	8 ± 0,7	30 ± 2 ^a	6 ± 0,9	12 ± 1 ^a

Примечание. ^a – достоверные ($h < 0,05$) отличия от *M. brunneum*, Ram-1; ^b – от *M. brunneum*, Mali; ^c – *M. robertsii*, P-72.

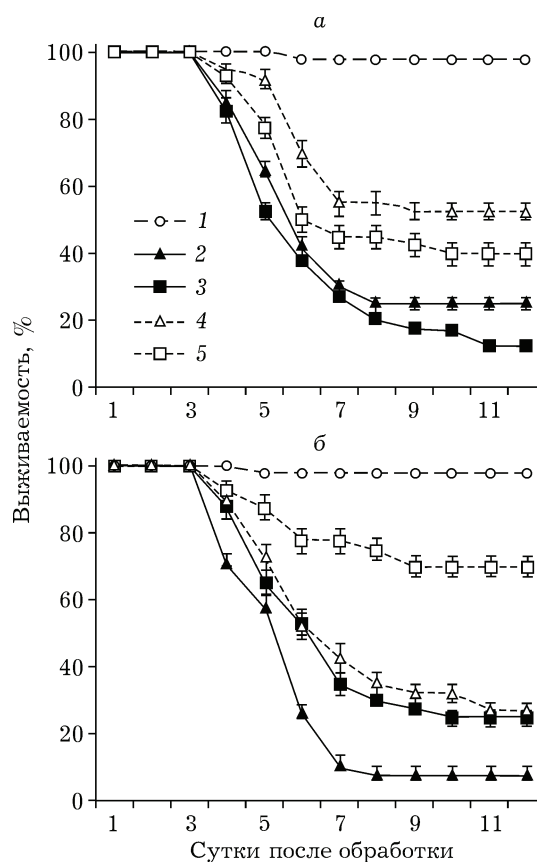
нию с опыливанием, но лишь на уровне тенденции ($p = 0,13-0,15$).

Напротив, для *A. messeae* внесение сухих конидий оказалось более эффективным, чем опрыскивание водной суспензией (см. рисунок, б). Среднее время выживаемости при внесении сухих конидий достоверно снижалось на 1,3 сут ($p = 0,039$) и 2,3 сут ($p < 0,001$) при обработке титрами $2 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^6$ соответственно по сравнению с внесением суспензий. Различия в итоговой гибели составили при высоком титре 20 %, а при более низком – 43 % и также оказались достоверными ($t > 3,7$, $df = 6$, $p < 0,011$).

Таким образом, проведенные эксперименты показали перспективность использования энтомопатогенных грибов *M. brunneum* и *M. robertsii* против личинок *C. pipiens* и *A. messeae*. Оба вида грибов поражают комаров, и их эффективность, вероятно, зависит от штаммовых, а не видовых различий. Доза $2 \cdot 10^6$ конидий/см² демонстрирует высокую эффективность, поэтому может использоваться в качестве нормы расхода в исследованиях, проводимых в естественных и искусственных водоемах.

Различия в эффективности способов внесения грибов для исследуемых видов комаров можно объяснить особенностями поведения и питания личинок. Следует отметить, что личинки комаров *Culex* являются типичными представителями “фильтраторов” в толще воды, а личинки *Anopheles* фильтруют с поверхности водного слоя. Сухие споры могут длительное время оставаться на плаву, что повышает вероятность их контакта с личинками *A. messeae*. Смоченные споры грибов после внесения распределяются во всей толще воды и они, по-видимому, являются более доступными для *C. pipiens*, чем для *A. messeae*.

Данная работа – первое исследование чувствительности к энтомопатогенным грибам личинок комара *A. messeae*, потенциального переносчика малярии. Исследование показало высокую эффективность использования культур *M. brunneum* и *M. robertsii* при внесении сухих конидий. Дальнейшие исследования могут быть направлены на тестирование культур грибов с различными гигро-



Выживаемость личинок *C. pipiens pipiens* (а) и *A. messeae* (б) после обработки сухими спорами и суспензиями *M. brunneum* (штамм Mali). 1 – контроль, 2 – $2 \cdot 10^6$ опыливание, 3 – $2 \cdot 10^6$ опрыскивание, 4 – $1 \cdot 10^6$ опыливание, 5 – $1 \cdot 10^6$ опрыскивание

термическими предпочтениями, а также испытание разных препаративных форм грибов, в том числе с использованием синтетических масел, способствующих равномерному распространению спор по поверхности воды и длительному сохранению их активности.

Таким образом, энтомопатогенные грибы *Metarhizium* могут быть перспективными для подавления численности личинок кровососущих комаров *Culex* и *Anopheles* в условиях Сибири. При этом остаются вопросы, связанные с эффективностью грибов в зависимости от возраста и плотности личинок, а также влияние грибов на нецелевые организмы.

Авторы благодарны Б. А. Борисову (ИПЭЭ РАН) за любезно предоставленный штамм *M. brunneum*. Работа выполнена при финансовой поддержке базового проекта VI.51.1.5.

ЛИТЕРАТУРА

- Кальвиш Т. К., Кухарчук Л. П. Патогенная микрофлора кровососущих комаров Западной Сибири и Дальнего востока // Медицинская паразитология. 1974. Т. 63, № 1. С. 57–64.
- Кухарчук Л. П. Кровососущие комары (Diptera, Culicidae) Сибири: Систематика. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1980. 232 с.
- Розендал Я. А. Борьба с переносчиками болезней. Методы, предназначенные для отдельных лиц и общин. ВОЗ. Женева. 1998. 438 с.
- Сазонова О. Н. Роль кровососущих комаров в экологических системах // Двукрылые фауны СССР и их роль в экологических системах. Л.: Зоол. ин-т АН СССР. 1984. С. 108–115.
- Тарасов В. В. Медицинская энтомология. М.: Изд-во МГУ, 1996. 352 с.
- Ansari M. A., Carpenter S., Butt T. M. Susceptibility of *Culicoides* biting midge larvae to the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*: Prospects for blue-tongue vector control // Acta Tropica. 2010. Vol. 113. P. 1–6.
- Butt T.M., Greenfield B., Greig C., Maffei T., Taylor J., Piasecka J., Dudley E., Abdulla A., Dubovskiy I., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Eastwood D. *Metarhizium anisopliae* pathogenesis of mosquito larvae: a verdict of accidental death // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, N 12. P. e81686.
- Goddard J. Mosquito Vector Competence and West Nile Virus Transmission // Infect Med. 2002. Vol. 19. P. 542–546.
- Hegedus D. D., Khachatourians G. G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents // Biotech. Adv. 1995. Vol. 13 P. 455–490.
- Koenraadt C. J., Majambere S., Hemerik L., Takken W. The effects of food and space on the occurrence of cannibalism and predation among larvae *Anopheles gambiae* s.l. // Entomol. Exp. Appl. 2004. Vol. 112. P. 125–134.
- Kryukov V. Yu., Khodyrev V. P., Yaroslavtseva O. N., Kamenova A. S., Duisembekov B. A., Glupov V. V. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. Vol. 45, N 5. P. 511–516.
- Miranpuri G. S., Khachatourians G. G. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti* // Entomol. Exp. Appl. 1991. Vol. 59. P. 19–27.
- Sutherland C. J. Tonomsing N., Nolder D. et al. Two non-recombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally // J. Infect. Dis. 2010. Vol. 201. P. 1544–1550.

Susceptibility of *Anopheles messeae* Fall. and *Culex pipiens pipiens* L. Larvae to Entomopathogenic Fungi *Metarhizium*

V. P. KHODYREV, I. M. DUBOVSKIY, V. Yu. KRYUKOV, V. V. GLUPOV

*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS
630091, Novosibirsk, Frunze str., 11
E-mail: vkhodyrev@inbox.ru*

The mortality rate of *Anopheles messeae* Fall. and *Culex pipiens pipiens* L. mosquito larvae infected with entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *M. robertsii* was studied in laboratory conditions. It was shown that *C. pipiens* larvae were more susceptible to water suspension of fungal conidia, while *A. messeae* larvae were more susceptible to treatment with dry conidia. Mortality of mosquito larvae infected with the most virulent strain and dose of $2 \cdot 10^6$ conidia / cm² was 87.5–92.5 %. The prospects of the use of fungi in biocontrol of mosquito are discussed herein.

Key words: susceptibility, larvae *Anopheles messeae*, *Culex p. pipiens*, entomopathogenic fungi, *Metarhizium*.