

Т. В. ТЕПЛЯКОВА

ГРИБЫ ВЫХОДЯТ на ОХОТУ



Грибы являются одними из самых удивительных созданий среди высших организмов: сочетающие в себе черты растений и животных, они выделены в отдельное обширное царство. Эти микроскопические организмы вездесущи и удивительно разнообразны, но, пожалуй, самой уникальной экологической группой среди них можно считать хищные грибы. В процессе эволюции эти крошечные хищники обзавелись различными охотничьими приспособлениями для улавливания своих жертв – круглых червей (нематод), среди которых насчитывается немало паразитических видов, представляющих угрозу для здоровья растений, животных и даже человека. Хищные грибы могут стать эффективной и экологически безопасной альтернативой современным дорогостоящим и высокотоксичным химическим антигельминтным препаратам, использование которых в большинстве случаев приводит к загрязнению окружающей среды, а также повышению устойчивости к ядам самих паразитов

На фото – личинки картофельной нематоды в клейких сетях хищного гриба *Duddingtonia flagrans*; вверху – гифы (нити грибницы) хищного гриба, культивируемого на агаре

Ключевые слова: хищные грибы-нематофаги, паразитические нематоды, ловушки для нематод, хламидоспоры, биопрепараты.
Key words: predatory (nematophagous) fungi, parasitic nematodes, traps for nematodes, chlamydospores, biopreparation

© Т. В. Теплякова, 2012

НАУКА из первых рук <http://scfh.ru/papers/griby-vykhodyat-na-okhotu/>

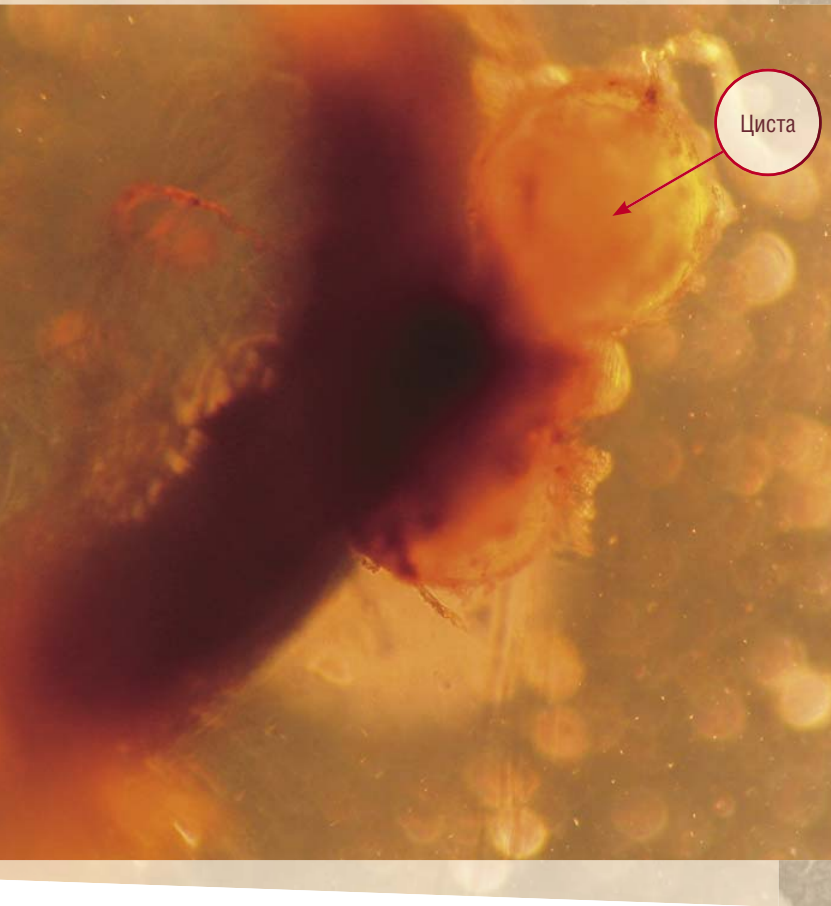


ТЕПЛЯКОВА Тамара Владимировна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией микологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Новосибирская обл.) Автор и соавтор более 150 печатных работ, в том числе 2 монографий, 12 авторских свидетельств и патентов

В наши дни гельминтозы растений, вызванные круглыми червями (нематодами), представляют собой серьезную проблему как для крупных сельскохозяйственных предприятий, так и обычных дачников: по мнению экспертов, фитопаразитические нематоды «съедают» до 10 % мирового урожая!

Особой вредоносностью отличаются так называемые *галловые нематоды* (*Meloidogyne incognita*, *M. hapla* и др.), распространенные как в открытом, так и в защищенном грунте. Они вызывают на корнях растений образование опухолей (*галлов*), в результате чего урожай может снижаться почти вдвое. Такими нематодами поражаются многие культуры, от томата и огурца до дыни и женьшеня. Большой ущерб наносят и другие паразитические нематоды: так, стеблевая нематода (*Anguillulina dipsaci*) поражает землянику, а к картофелю, традиционной русской культуре, ставшей в Сибири настоящим «вторым хлебом», равнодушна золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis*).

В связи с изменением климата, а также с расширением торговых связей между регионами многие паразиты, в том числе и некоторые фитопаразитические нематоды, ранее считавшиеся карантинными объектами, начинают успешно завоевывать новые территории. Наглядным примером для сибиряков является не только хорошо всем знакомый колорадский жук, впервые зафиксированный в Новосибирской области в 1978 г, но и вышеупомянутая картофельная нематода – злостный, быстро размножающийся

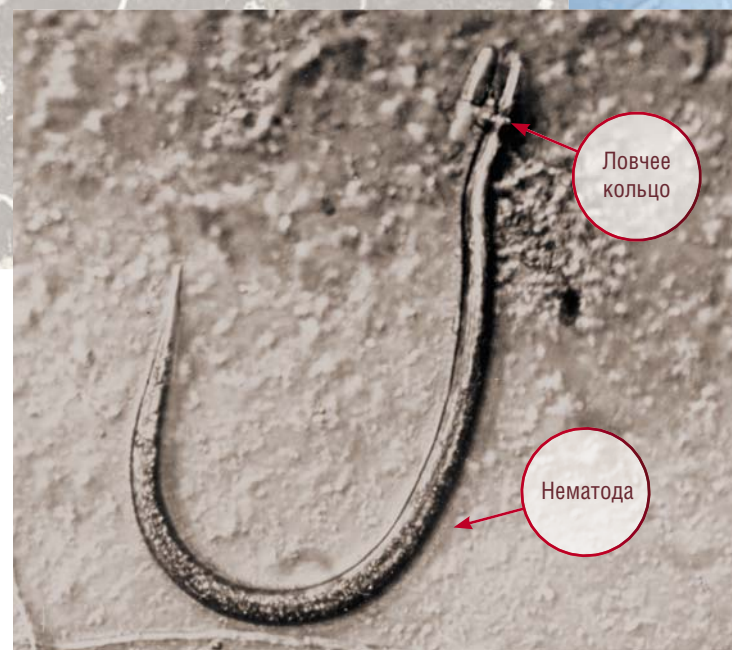
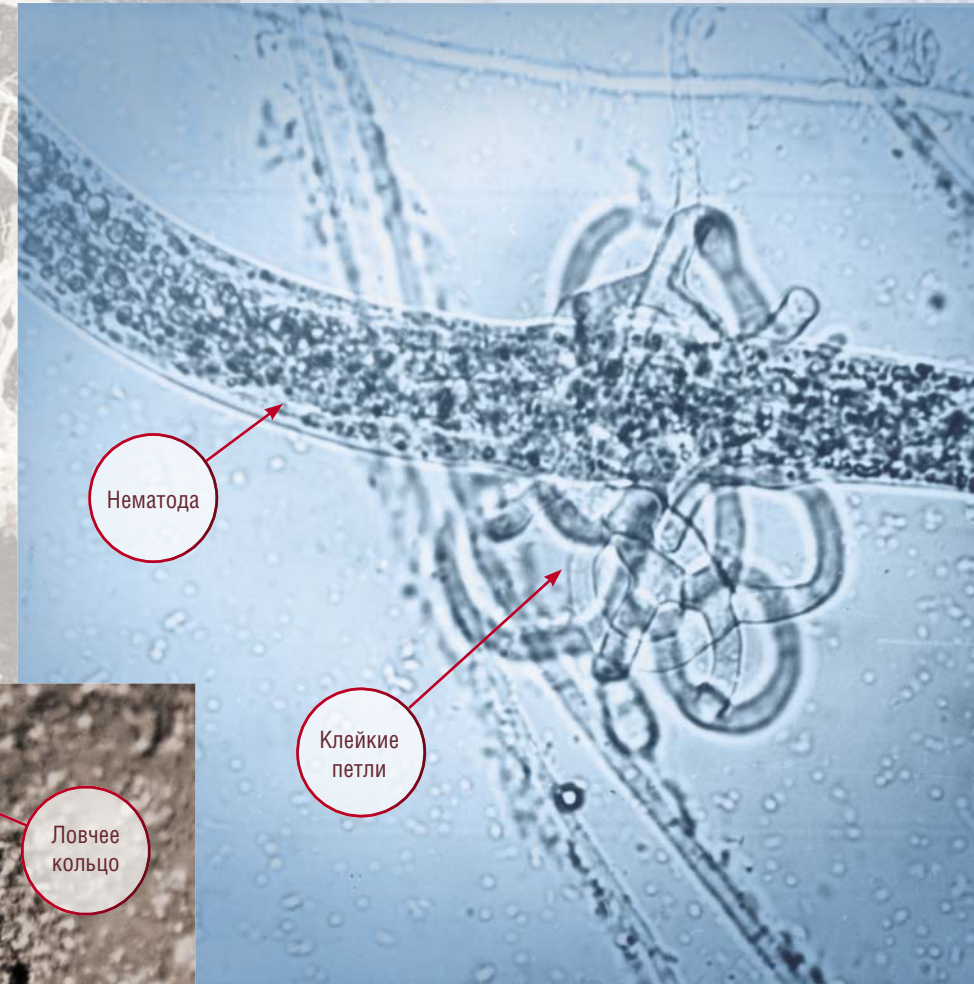


В защищенном и открытом грунте широко распространены галловые нематоды. Внедряясь в корни огурца, томата и других растений, они вызывают образование на них опухолей, нарушая обмен веществ. Пораженные растения увядают, легко поражаются болезнями и погибают. Золотистая картофельная нематода повреждает корни картофеля, образуя цисты: эти круглые образования представляют собой самок, кожные покровы которых превращаются в жесткую, стойкую к внешним условиям оболочку, наполненную яйцами и формирующимися из них личинками. Слева – цисты на корне картофеля; вверху – галлы на корнях огурца

На сегодняшний день известно более ста видов хищных грибов-гифомицетов. Эти микроскопические обитатели почвы найдены во всех частях мира и во всех климатических зонах. Утилизируя огромную массу почвенных нематод, они играют значительную роль в общем круговороте углерода, азота и других важнейших биогенных элементов

вредитель, уже обнаруженный во многих районах НСО.

Не в меньшей степени, чем растения, паразитическими нематодами поражаются домашние и сельскохозяйственные животные. При этом ряд гельминтов животных представляют серьезную угрозу и для здоровья людей, которые могут заразиться ими при непосредственном контакте либо через почву с территорий выгулов. Значительная зараженность собак и кошек гельминтами приводит к росту заболеваемости среди населения с весьма тяжелыми последствиями. К этому достаточно добавить, что по некоторым оценкам паразитическими нематодами (острицами, аскаридами и т.д.) заражена четверть населения Земли.



В засаде на червя

Среди естественных регуляторов численности нематод особого внимания заслуживают *хищные грибы*.

Выражение «хищный» применительно к грибу может показаться странным, тем более что в отличие от крупных грибов – *макромицетов*, к которым относятся все съедобные грибы, хищные грибы являются *микроммицетами* и представляют собой тончайшие паутинки нитей (*гиф*), видимых только под микроскопом.

На таких гифах и формируются ловушки, способные захватывать активно передвигающихся нематод, диаметр тела которых в сотни раз больше диаметра гиф самого гриба! Причем виды этих ловчих приспособлений, начиненных «химическим оружием», очень разнообразны: клейкие петли, головки, сжимающиеся кольца.

Исследования хищных грибов с целью поиска штаммов, перспективных в качестве продуцентов био-препарата против нематод, были начаты в Сибирском НИИ земледелия и химизации сельского хозяйства еще в 1971 г.

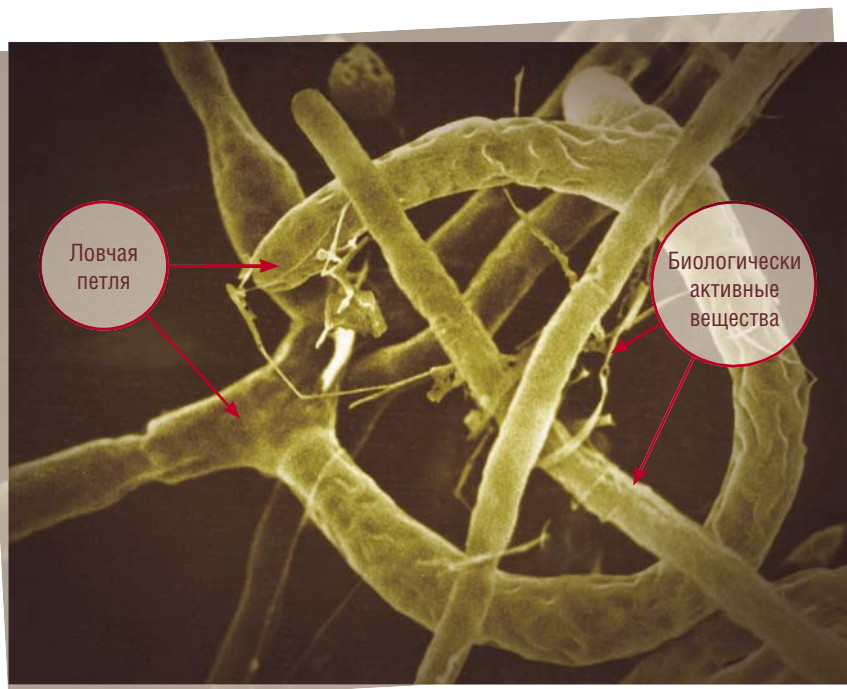
Охотничьи приспособления хищных грибов отличаются большим разнообразием: здесь и сжимающиеся кольца, и клейкие петли, и даже «химическое оружие». На фото – результат успешной охоты: почвенная нематода, сжатая ловчим кольцом гриба *Dactylariopsis brochopaga* (вверху), и нематода, попавшая в клейкие петли гриба *Arthrobotrys compacta* (вверху справа). Световая микроскопия

В МИРЕ НЕМАТОД

Круглые черви (нематоды, лат. *Nematodes*) отличаются огромным систематическим и экологическим разнообразием. Сегодня в этой группе насчитывается около 80 тыс. видов, однако по некоторым оценкам их число достигает миллиона. Среди нематод встречаются как малютки с длиной тела менее 100 мкм, так и гиганты, такие как паразитирующая в плаценте кашалота нематода длиной свыше 8 м. Маленькая деталь: взрослая самка круглого червя может ежедневно откладывать до четверти миллиона яиц!

Круглые черви с успехом освоили практически все известные среды обитания, исключая воздушную: они встречаются в пресноводных водоемах и в глубинах океанов, в почве и в ... самих живых организмах. Последние, т.е. паразитические нематоды, представляют собой лишь часть среди множества многочисленных свободно живущих видов (в 1 дм³ поверхностного слоя почвы может обитать до 2 млн особей).

Круглые черви паразитируют за счет растений и животных; хозяином их является и человек, на котором могут паразитировать около пяти десятков видов нематод. Обычно они живут в полостных органах, сообщающихся с внешней средой (пищеварительный тракт, легкие, почки), а также в соединительной и лимфатической ткани. На сегодня нематоды наиболее распространены среди гельминтозов, возбудители которых проходят фазу развития в почве. Например, по данным ВОЗ, в мире аскаридозом ежегодно поражается свыше 1 млрд человек, и немногим меньше – анкилостомидозами и трихоцефалезом



ТАКТИКА И СТРАТЕГИЯ ХИЩНИКА

Механизм хищничества у грибов, независимо от типа ловушки, включает в себя выделение аттрактивных (привлекающих) и токсичных веществ; проникновение гифы гриба внутрь тела парализованной нематоды; выделение ферментов и антибиотиков для «переваривания» содержимого нематод и подавления развития конкурирующих микроорганизмов.

Все эти биологически активные соединения не растворимы в воде и поэтому не подвергаются быстрому разрушению почвенными микроорганизмами. К таким веществам относятся, например, токсины терпеновой природы, содержащиеся в клейком веществе, выделяющемся на поверхности ловушек и мицелия (Раджабова, 1971; Беккер, 1972).

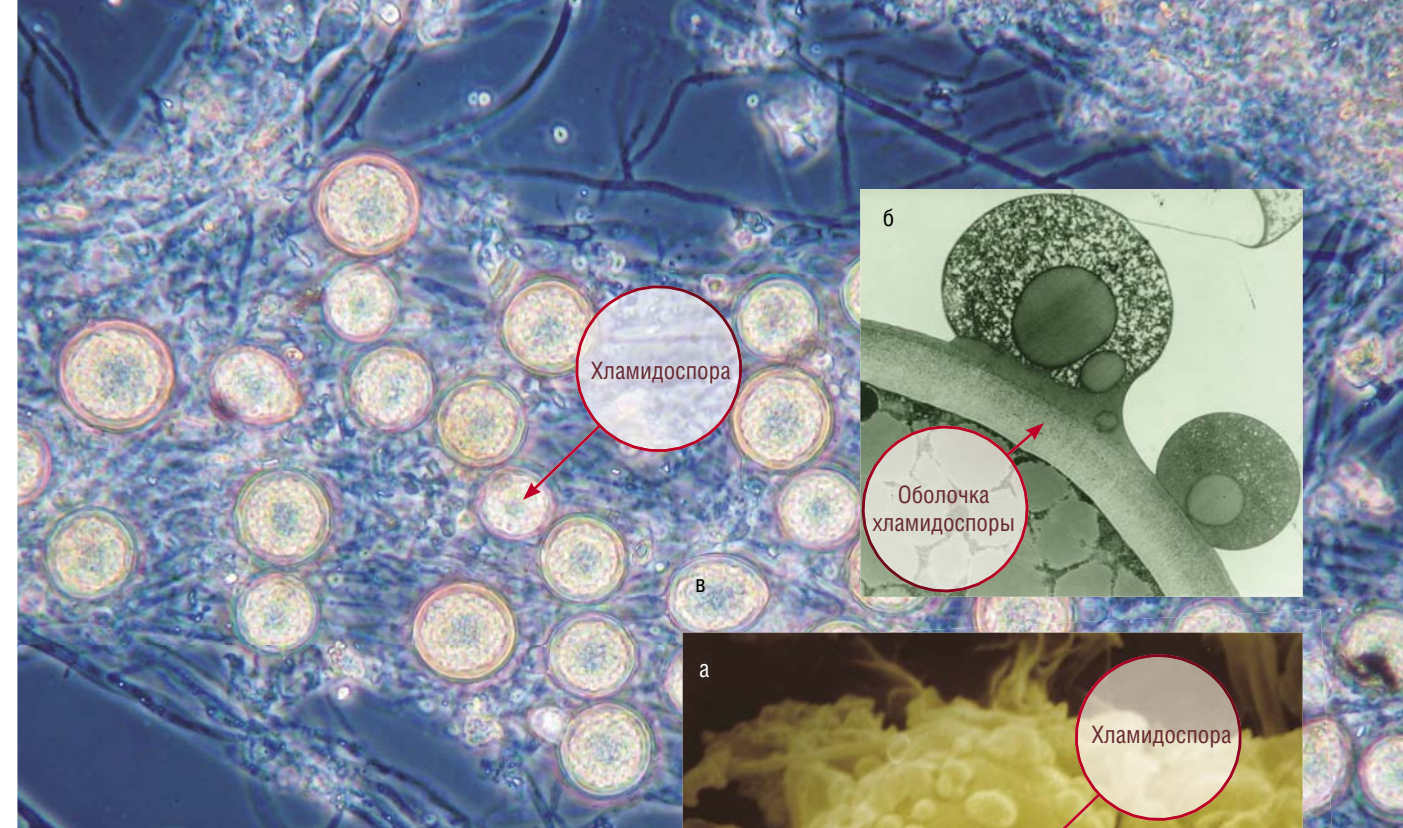
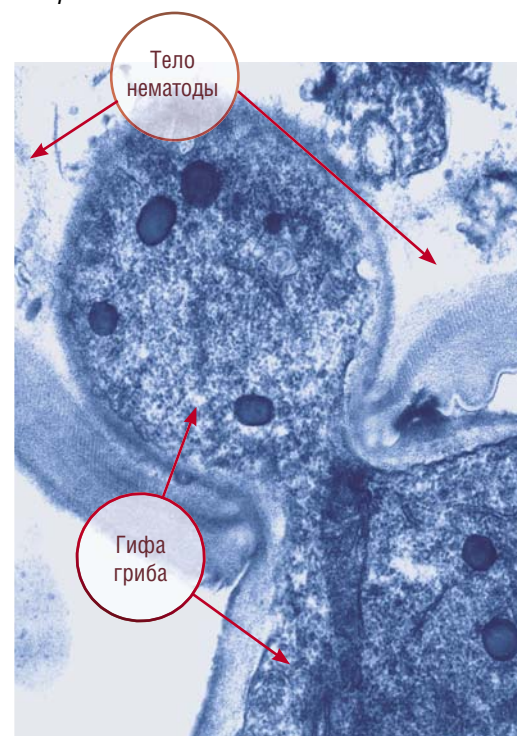
Ранее предполагалось, что проникновение гифы гриба в тело нематоды происходит благодаря растворению внешних покровов червя под действием ферментов, выделяемых грибами, однако на сегодня точно установлено, что гифы гриба раздвигают кутикулу нематоды с помощью особых фибриллярных структур (Теплякова, Рябчикова, 1991). Об этом свидетельствует и повышенное содержание кальция в ловушках гриба, выявленное с помощью рентгеновского микроанализа. Особенно заметно (в 30—40 раз!) содержание кальция увеличивается в ловчих кольцах грибного мицелия.

Как известно, кальций играет важную роль в механизме мышечных сокращений у животных, участвуя в регуляции функции актомиозина (сократительного белка мышц). Аналогичное явление, по-видимому, имеет место и в мире грибов, чья биохимия имеет много общих черт с животными (Беккер, 1975). Такая актомиозиновая система у хищных грибов может использоваться для разных целей: с ее помощью они могут сжимать свои ловчие кольца либо выдавливать токсические клейкие вещества на поверхность ловчих петель.

При внесении в почву биопрепарата на основе хищных грибов максимальное число ловчих органов у всех исследованных штаммов формируется на 14-е сутки. Поэтому наиболее целесообразно вносить такой биопрепарат не менее чем за 2—3 недели до высадки растений (Сопрунов, 1958; Теплякова, 1999).

Во всем мире этой проблемой тогда занимались не более сотни специалистов. Полученные к тому времени экспериментальные данные о нематофаговой эффективности хищных грибов были немногочисленны и противоречивы, что ставило под сомнение возможность их применения для регуляции численности нематод. Поэтому для научного обоснования возможности эффективного использования хищных грибов в биологической защите требовалось изучить многие стороны жизнедеятельности этих организмов – жизненные циклы, особенности поведения, взаимоотношения с другими микроорганизмами как в культуре, так и в почве.

Уже через 30 минут после поимки нематоды с помощью клейких ловчих петель (слева), гифы гриба *Arthrobotrys compacta* раздвигают покровы и проникают в тело парализованного круглого червя (внизу). Сканирующая и световая микроскопия



Было необходимо также глубже узнать о самом механизме хищничества, обосновать методы селекции и стабилизации эффективных штаммов. Не решив эти вопросы, было невозможно разработать биотехнологию препарата и дать рекомендации по его применению на практике.

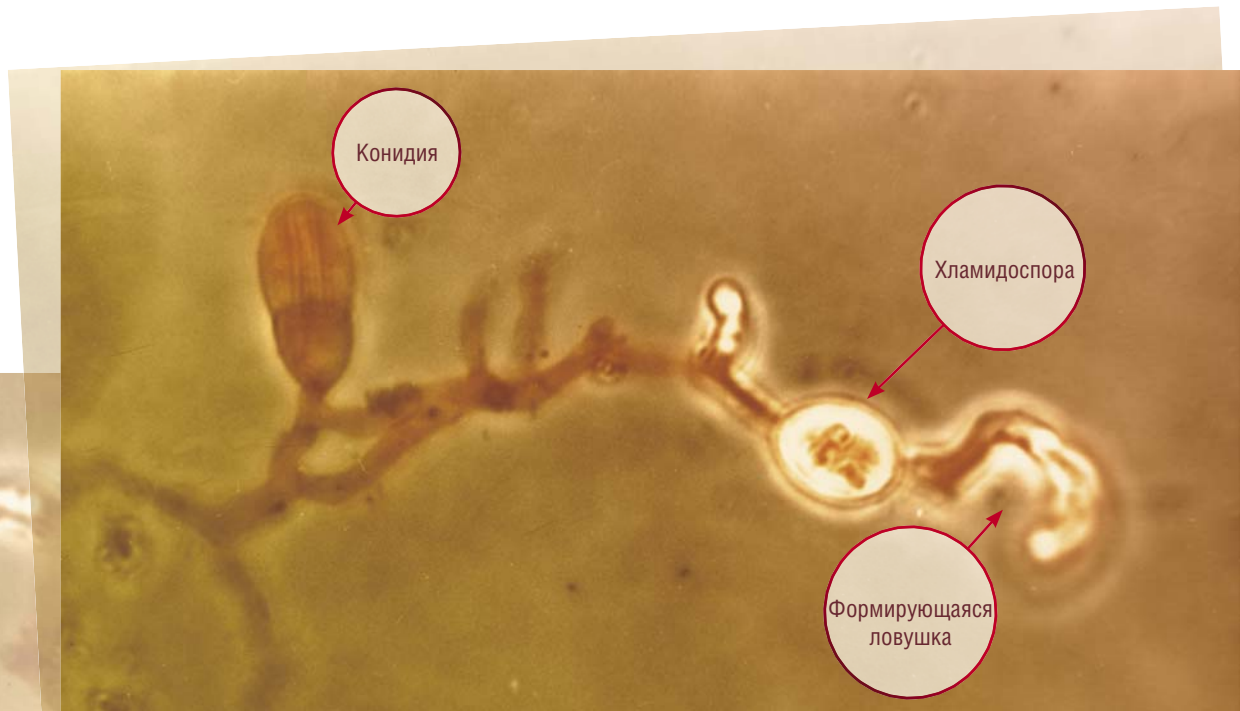
За стенками хламидоспоры

Многие исследователи при выделении хищных грибов из почвы наблюдали образование на грибном мицелии хламидоспор – крупных, с толстыми оболочками образований, которые по мере пересевов грибов исчезали. Считалось, что хламидоспоры формируются только в неблагоприятных условиях, при этом роль их в жизненном цикле этих грибов до конца не была ясна. Однако результаты исследований показали, что для хищных грибов хламидоспоры являются важнейшей и в некоторых случаях даже основной жизненной формой (Теплякова, 1999).

Это открытие объяснило тот факт, почему хищные грибы так трудно выделять из почвы общепринятыми микробиологическими методиками. Ведь преимущественное развитие на питательном агаре получают обычные грибы-сапротрофы, находящиеся в вегетативных стадиях развития, а хламидоспоры хищных грибов для прорастания требуют стимуляции. Поэтому для выделения нематофаговых грибов используют особую методику, при которой на поверхность водного агара помещают комочки почвы вместе с ее обитателями-нематодами, либо добавляют лабораторную культуру нематод.

Грибы отличаются сложным циклом и разнообразием способов размножения. Важнейшей жизненной формой для хищных грибов является хламидоспора – покрытая толстой оболочкой покоящаяся стадия хищника, служащая вегетативным аналогом настоящих семян-конидий. На фото – внешний вид (а) и фрагмент внутреннего строения (б) хламидоспор *Duddingtonia flagras* (в). Световая и электронная микроскопия

Под влиянием метаболитов, выделяемых червями, хламидоспоры прорастают и на гифах гриба образуются «охотничьи» приспособления. Уже через неделю на поверхности агара можно обнаружить настоящие «погобища» – участки, где находятся погибшие нематоды и гифы гриба с ловушками, а также органы бесполого размножения – конидиеносцы с головками или целыми гирляндами головок конидий (грибных спор). При дальнейшем культивировании на питательном агаре грибы постепенно теряют способность к образованию хламидоспор и начинают расти преимущественно в виде вегетативного мицелия.



На примере штамма хищного гриба-нематофага рода *Arthrobotrys* показано, что при внесении в почву лабораторной культуры гриба преимущественно формируются хламидоспоры. Они прорастают и формируют ловушки, когда рядом с ними появляются личинки нематод. После «трапезы» образуется следующая генерация хламидоспор. Цикл будет повторяться, пока в почве присутствуют гельминты. Слева – динамика охотничьей эффективности в естественных условиях лабораторной культуры пяти штаммов рода *Arthrobotrys*, оцененной по интенсивности формирования ловушек на грибном мицелии

Таким образом было установлено, что наиболее эффективными продуцентами биопрепарата являются штаммы нематофаговых грибов, способные формировать в почве и в культуре большое количество хламидоспор, чьи защитные оболочки оказываются «не по зубам» клещам, амебам и другим представителям почвенной фауны, а также выдерживают длительное высушивание и действие других неблагоприятных факторов среды.

Лекарство для почвы

Поиск в природных популяциях позволил отобрать эффективные штаммы хищных грибов, характеризующиеся высокой нематофаговой активностью.

Речь идет об *Arthrobotrys oligospora* 3062D (а.с. СССР 1688818, 1991), на основе которого в 1990 г. была разработана технология получения биопрепарата нематофагин-БЛ, разрешенного для применения в России,



а также *Duddingtonia flagrans* F-882 (патент РФ 2253671, 2005), характеризующегося высокой способностью к формированию в культуре хламидоспор.

Стало очевидно, что в зависимости от назначения возможно получать как жидкие, так и сухие формы биопрепаратов, используя разные технологические приемы.

Для внесения в почву сухая форма биопрепарата, содержащего хламидоспоры, может быть приготовлена на разных носителях, например, на слоистом минерале вермикулите (патент РФ 2366178, 2009). В более простом случае препарат производят на зерновых средах: его используют для лечения и профилактики от паразитических нематод сельскохозяйственных или домашних животных путем скармливания.

Жидкий препарат можно нарабатывать на уже существующих предприятиях, производящих бактериальные средства защиты растений, тем более что для выше-названных штаммов уже подобраны недорогие среды и отработаны условия культивирования.

Так, в 2001–2008 гг. на Бердском заводе ООО ПО «Сиббиофарм» на основе штамма *Duddingtonia flagrans* F-882 было произведено более 5 т жидкой формы препарата, предназначенного для производственных испытаний в защищенном грунте. Нужно сказать, что биомасса гриба, полученная в таких ферментерах, содержит широкий спектр биологически активных веществ. Последние исследования, проведенные в ГНЦ ВБ «Вектор» совместно с вирусологами, свидетельствуют и о противовирусной активности этих метаболитов нематофаговых грибов (заявка на патент 2011110830 от 22.03.2011).

Испытания жидкой и сухой форм биопрепаратов на основе хищных грибов показали их высокую эффективность как для защищенного, так и открытого грунта. Контрольные растения, почва под которыми не была обработана препаратом, значительно отставали в росте и урожайности

Испытания разных форм биопрепарата, проведенные в России (Новосибирская и Кемеровская области, Алтайский и Краснодарский края) на разных культурах (огурец, томат, картофель, земляника и др.) показали:

- снижение зараженности почвы нематодами в теплицах на 86 %, в результате чего прибавка урожая на примере огурца составляет 2 кг на 1 м² и более;
- снижение зараженности картофельной нематодой у восприимчивых сортов на 52–70 %, благодаря чему урожайность повышается в 1,5–2 раза;
- уменьшение численности стеблевых нематод в листьях земляники в 2–17 раз в зависимости от дозы и формы препарата при одновременном увеличении доли крупных ягод на 5–17 %;
- стимулирующее влияние на рост и развитие растений, от рассады цветов до саженцев сосны и т. д.

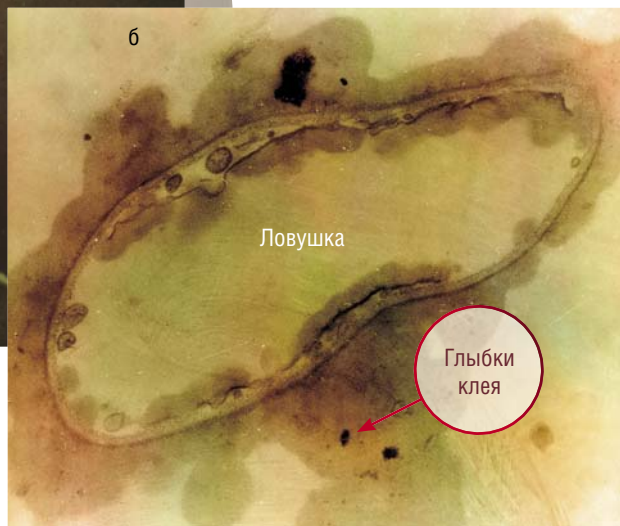
Зимой 2005–2006 гг. в тепличном комбинате совхоза «Суховский» (Кемеровская обл.) был проведен производственный опыт с жидкой формой препарата с целью подтвердить отмеченную ранее большую продолжительность действия биопрепарата (Теплякова, 1999; Теплякова, Ананько и др., 2008). Оказалось, что в первый год применения препарата урожайность огурца гибрида «Эффект» в опытных теплицах по сравнению с контролем повысилась на 0,1–1,0 кг/м²,

Именно незнание этих особенностей могло приводить к несовпадению данных экспериментов и полевых исследований. Ведь чаще всего в почву вносили биопрепарат, полученный на зерновых питательных средах, основу которого составляет грибной мицелий с конидиями. В почве такой штамм часто оказывался не слишком жизнеспособным, в результате чего высокоактивный в лабораторных условиях препарат был неэффективным на практике.

Например, из пяти изученных штаммов грибов рода *Arthrobotrys*, показавших в условиях лаборатории практически одинаково высокую нематофаговую активность, лишь два были пригодны для биотехнологических целей.



Высокий нематофаговый эффект сухой формы биопрепарата хищного гриба, богатой хламидоспорами, обязан образованию в почве многочисленных ловушек. При использовании жидкой формы, содержащей только грибной мицелий, гибель нематод наступала в результате воздействия токсических соединений, выделяемых гифами гриба.
 а, б – клейкие и биологически активные вещества, выделяемые хищным грибом *Arthrobotrys oligospora*.
 Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия



а в последующие два года (без дополнительного внесения препарата) – на 0,6–0,7 кг/м² и 1,3–2,8 кг/м² соответственно.

От мышей до маралов

Известно, что популяция паразитических нематод на пастбищах на 95% состоит из инвазивных личинок, что быстро сводит на нет действие антигельминтной терапии и способствует увеличению экономических затрат за счет увеличения кратности противопаразитарных обработок (Herd, 1985). Согласно современным представлениям, оптимизация системы противопаразитарных мероприятий подразумевает, во-первых, уничтожение гельминтов в организме самого животного при помощи антигельминтных средств; а во-вторых, проведение ряда мер, ограничивающих численность личинок и яиц паразитов во внешней среде.

Одним из перспективных методов ограничения численности личинок паразитических нематод во внешней среде является биологический контроль с использо-

ванием хищных грибов-гельминтофагов. В рамках такого подхода совместно с Институтом ветеринарии СО Россельхозакадемии были проведены лабораторные исследования нематофаговой способности штамма *D. flagrans* F-882 в отношении нематод овец, маралов и лошадей. Оказалось, что «в пробирке» этот штамм вызывает гибель 93–98% нематод ряда паразитических родов *Trichonema*, *Strongylus*, *Alfortia* и др. (Теплякова, Ефремова, 2005; Ефремова, Теплякова, 2007; Ефремова, Теплякова и др., 2007).

В эксперименте на лабораторных белых мышах, которым скармливался зерновой биопрепарат на основе этого штамма, было показано, что гриб, проходя через пищеварительную систему животных, сохранял свою жизнеспособность и нематофаговую эффективность.



Этот хищный гриб *Duddingtonia flagrans* успешно справился с поимкой нематоды, паразитирующей на сельскохозяйственных и диких животных – овцах, лошадях и маралах

В экскрементах опытных животных были обнаружены гифы с ловчими петлями и хламидоспоры, а гельминты, «вымытые» из пищеварительного тракта мышей, имели, по сравнению с контролем, значительные нарушения в структуре клеток всех тканей и органов, которые в конечном счете и приводили к гибели нематод. Очевидно, повреждающее действие оказывали вещества, продуцируемые грибными клетками, поскольку признаки «прямого» заражения нематод грибами не были выявлены.

Токсикогигиеническая оценка культур штаммов хищных грибов в Ангарском НИИ медицины труда и экологии человека, аккредитованном в Системе аккредитации Госстандарта России, показала, что при всех путях поступления в организм культуры грибов не оказывают на организм теплокровных животных общетоксического и патогенного действия. Они не размножаются в организме, не вызывают инфекционного процесса и быстро элиминируются.

Все эти данные свидетельствуют о возможности применения хищных грибов с целью лечения или профилактики животных от гельминтозов, которые могут быть опасны и для человека. Поскольку грибные хламидоспоры остаются жизнеспособными при прохождении через пищеварительный тракт, хищные грибы продолжают «работать» и в экскрементах, тем самым оздоравливая не только самих животных, но и окружающую среду.

Что же касается антигельминтных препаратов для человека, то перспективным направлением может быть получение активных малотоксичных природных соединений из биомассы хищных грибов, любое количество которой можно легко получить по уже разработанным технологиям. Для повышения эффективности и снижения токсичности таких природных антигельминтиков их можно заключать в транспортные структуры типа липосом, что позволит уменьшить дозировку препарата.

В промышленно развитых странах биотехнологическое направление, связанное с разработкой биологической защиты, недаром является приоритетным: на каждый вложенный в эту область доллар получают до 150% прибыли (Яценко, 2008). Рынок микробиологических биопестицидов растет быстрыми темпами: так, только в США за последние двадцать лет он увеличился почти в пять раз.

Однако доля биологических средств защиты по сравнению с химическими остается в целом невысокой, особенно в странах с интенсивным земледелием. Поэтому так важны отечественные биотехнологические разработки, которые уже сегодня можно применять в растениеводстве и ветеринарии.

Кстати сказать, недавно выяснилось, что биологически активные соединения нематофагового гриба *D. flagrans* действенны и в отношении ВИЧ, вируса гриппа типа А и вируса осповакцины. Все говорит за то, что эти паразитические создания – хищные грибы – еще не раз удивят своих исследователей.

Литература

Теплякова Т.В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. Новосибирск, 1999. 252 с.

Теплякова Т.В., Ефремова Е.А., Рябчикова Е.И. Хищные грибы-гифомицеты – естественные регуляторы численности паразитических нематод животных // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. М., 2005. № 4. С. 13–17.

Теплякова Т.В., Рябчикова Е.И. Хищные грибы-гифомицеты – естественные враги нематод // Защита растений. М.: ВО Агрпромиздат, 1991. С. 10–12.

В статье использованы фото автора и Е.И. Рябчиковой (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск)