



Entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces*

Andrzej Zabża, Beata Greb-Markiewicz

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii
Politechnika Wroclawska, Wroclaw

Entomopathogenic fungi of *Zoophthora* and *Paecilomyces* genus

Summary

Variations of enzymatic activity, pH and mycelium growth during life cycle of representatives of *Zoophthora* and *Paecilomyces* species and correlation between these properties, were described. Apart from monoamino oxalate and low molecular carboxylic acids, any other compounds which could be considered as mycotoxines were not found. The enzymatic activity seems to be the main factor in the mechanism of insect infection and intoxication by both analyzed fungus species.

Key words:

bioinsecticides, entomopathogenic fungi, proteolytic and lipolytic activity.

1. Wstęp

Entomopatogeniczne grzyby należące do rodzajów *Zoophthora* i *Paecilomyces* dość powszechnie występują w otaczającym nas środowisku. Pełnią one ważną rolę w naturalnej regulacji populacji owadów w poszczególnych ekosystemach. Rząd *Entomophthorales*, do którego należy rodzaj *Zoophthora*, znany jest z wysokiego stopnia specjalizacji w stosunku do infekowanych przez siebie gatunków owadów. Grzyby tego rodzaju nie atakują zazwyczaj owadów pożytecznych, takich jak np. biedronka czy pszczoły. Z tego też powodu stały się one interesującym obiektem badań w kontekście poszukiwań skutecznych bioinsektycydów, alternatywnych do syntetycznych substancji owadobój-

Adres do korespondencji

Andrzej Zabża,
Instytut Chemii Organicznej,
Biochemii i Biotechnologii,
Politechnika Wroclawska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27,
50-370 Wroclaw;
e-mail:
zabza@kchf.ch.pwr.wroc.pl

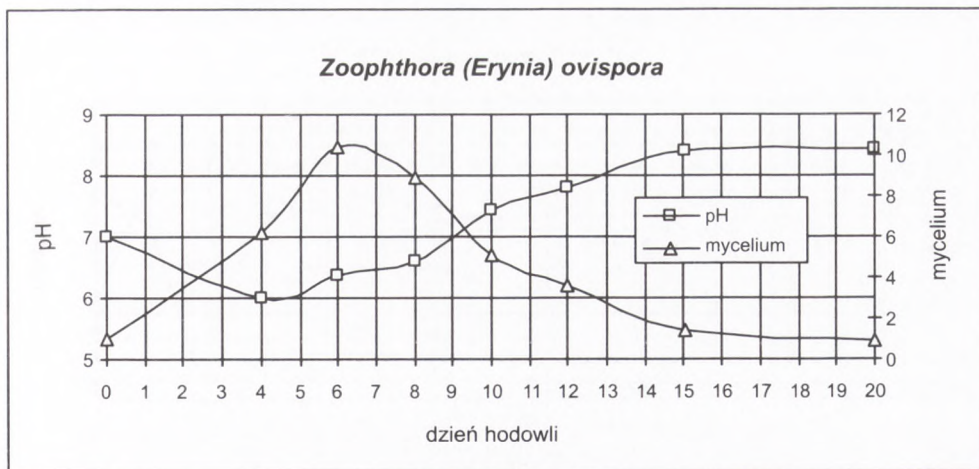
czych. Obecnie, jakkolwiek w niewielkiej skali, niektórzy przedstawiciele tych grzybów są już wykorzystywani w zintegrowanym systemie ochrony roślin. Zebrano stosunkowo dużo informacji na temat ich występowania w przyrodzie (1). Dla niektórych opracowano laboratoryjne metody hodowli; jednakże badania nad ich rozwojem, wytwarzaniem metabolitów, czy aktywnością enzymatyczną, nastroczają wiele trudności. Dlatego też mechanizm działania tych entomopatogenów na organizm owada nie został jeszcze jednoznacznie wyjaśniony.

W badaniach prowadzonych nad tymi mikroorganizmami poszukiwaliśmy czynników, które mogłyby pełnić podstawową rolę tak w procesie infekcji, jak i intoksykacji organizmu owada. Interesowała nas zwłaszcza możliwość biosyntezy substancji toksycznych, ale analizowaliśmy też i inne czynniki mogące uczestniczyć w porażaniu organizmu owada, szczególnie enzymy typu lipaz czy proteaz.

2. Laboratoryjna hodowla szczepów *Zoophthora* i *Paecilomyces*

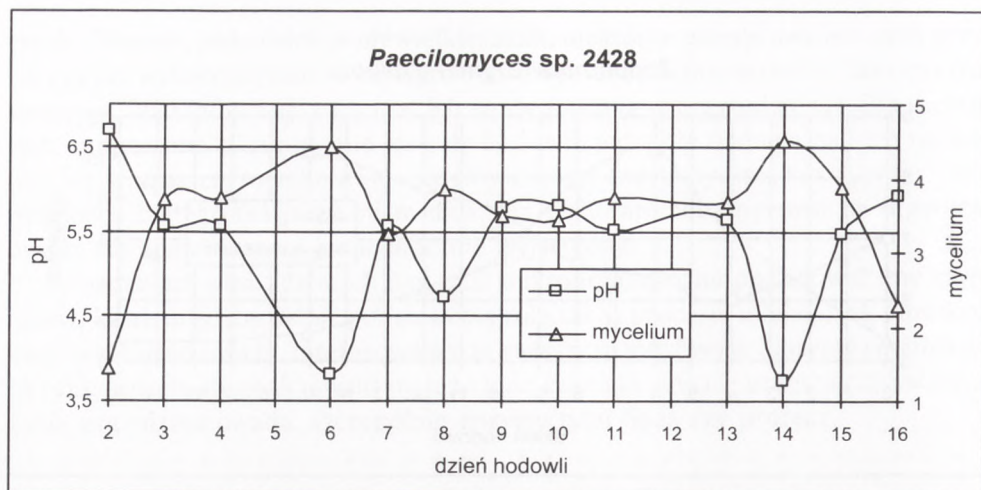
Do badań, jako przedstawicieli rodzaju *Zoophthora* zostały wybrane szczepy: *Z. (Erynia) ovispora*, *Z. phyllobii*, *Z. muscivora*, *Zoophthora* sp. 2356, z kolekcji S. Bałazego z Zakładu Ochrony Środowiska Rolniczego i Leśnego PAN w Poznaniu, oraz *Z. neoaphidis* z laboratorium I. Majchrowicz z Akademii Rolniczej w Szczecinie. Hodowle laboratoryjne tych mikroorganizmów są bardzo trudne (2). W składzie pożywki muszą się znajdować organiczne źródła azotu, a same hodowle bardzo łatwo ulegają zakażeniu. Tok prac badawczych zakłócany jest też przerwami w rozwoju grzybni, trwającymi nawet kilka miesięcy. Najczęściej okresy pauzy pojawiają się w czasie, kiedy w naturalnym środowisku mikroorganizmy te wykazują największą agresję w stosunku do owadów. Dla *Z. neoaphidis* były to okresy od maja do grudnia. Badania nad mechanizmem działania tych entomopatogenów są więc mało zaawansowane, a liczba publikacji dotycząca przedstawicieli *Zoophthora* jest stosunkowo skromna w porównaniu do licznych prac poświęconym innym, powszechnie badanym mikroorganizmom np. *Beauveria*, *Metarhizium* czy *Verticillium*. Jednakże interesujące właściwości entomopatogeniczne przedstawicieli *Zoophthora*, jak się wydaje, predestynują je bardziej jako obiecujący model skutecznych bioinsektycydów.

Niezależnie od innych cech morfologicznych grzybów rodzaju *Zoophthora*, bardzo charakterystyczna jest ich krzywa wzrostu, a zwłaszcza korelacja między tworzeniem się mycelium i zmianami pH kultury w czasie rozwoju grzybni. Dla przebadanych w naszym laboratorium 6. różnych szczepów przedstawicieli *Zoophthora* maksimum wzrostu grzybni obserwowano zawsze między 6. a 8. dniem hodowli, a minimum pH pojawiało się między 4. a 6. dniem, bezpośrednio przed intensywnym przyrostem biomasy. Przykładowo na rysunku 1 pokazano krzywą wzrostu dla szczepu *Z. (Erynia) ovispora*.



Rys. 1. Krzywa wzrostu *Zoophthora (Erynia) ovispora* (przyrost mycelium w g/1000 ml pożywki).

Rodzaj *Paecilomyces* obejmuje różnorodne gatunki. Są wśród nich również grzyby szkodliwe dla człowieka, ale też dość liczna grupa entomopatogenów. U niektórych przedstawicieli stwierdzono biosyntezę toksyn o strukturze peptydowej (3), lub też produkcję antybiotyków peptaibolowych (4). Hodowla laboratoryjna entomopatogenicznych grzybów z rodziny *Paecilomyces*, w odróżnieniu do *Zoophthora*, nie jest trudna. Stosunkowo prosty skład pożywki, obejmujący dobrze zdefiniowane substancje chemiczne, a też większa odporność kultury na zakażenie, znacznie ułatwia laboratoryjne hodowle tych mikroorganizmów. Do badań zostały przez nas wybrane dwa szczepy z kolekcji S. Bałazego, o numerach katalogowych *Paecilomyces* 2428d i 2430a₁, izolowane z zainfekowanych larw chrząszczy. Oba te szczepy, jakkolwiek należą do tego samego rodzaju, różnią się wyglądem grzybni. Szczep *Paecilomyces* sp. 2428d na podłożu płynnym rośnie w postaci pojedynczych drobnych, białych kulczek. W czasie wzrostu grzyba pożywka staje się mętna i na powierzchni obserwuje się obfitą pianę. Na pożywce stalej tworzy puszystą, obfitą, białą grzybnię. Natomiast szczep *Paecilomyces* sp. 2430a₁ rośnie na podłożu stałym tworząc charakterystyczne „rożki” o zabarwieniu łososiowym. W hodowli płynnej rośnie w postaci drobnych koloni, a pożywka cały czas zachowuje klarowność i nie tworzy się piana. Odmienne też wyglądają krzywe wzrostu obu tych szczepów (5). Dla szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d w okresie rozwoju obserwuje się lokalne maksima przyrostu masy grzybni i minima pH płynu hodowlanego. Szczególnie wyraźne maksima przyrostu biomasy widoczne są w 6. i 14. dniu hodowli. W tych dniach pH płynu osiąga też najniższą wartość 3,8. Ta wyraźna korelacja widoczna jest na załączonym rysunku 2.

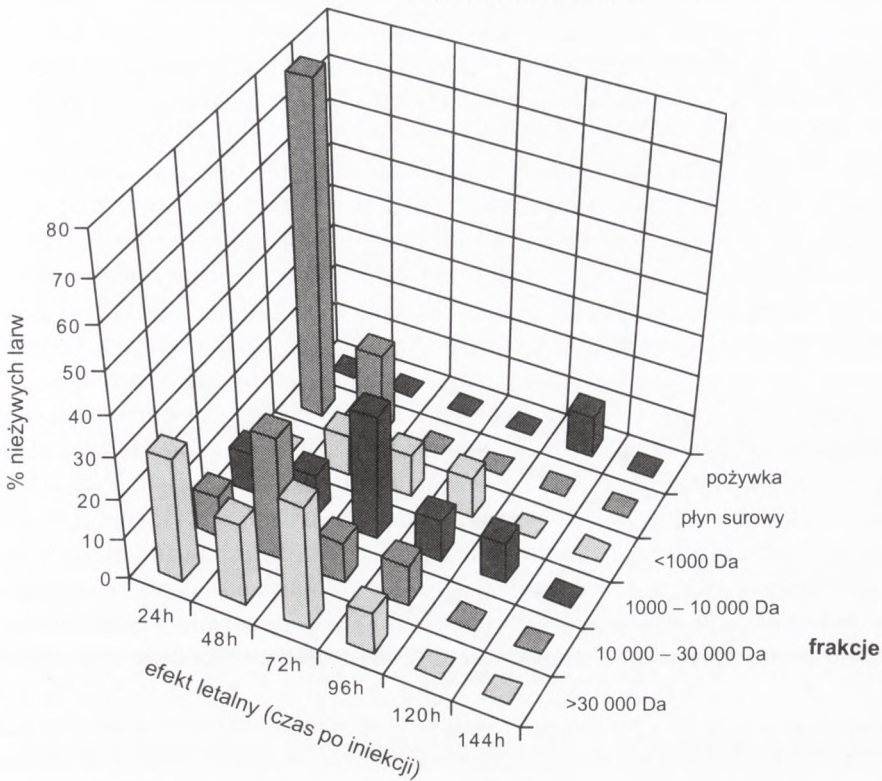


Rys. 2. Krzywa wzrostu *Paecilomyces* sp. 2428 d (przyrost mycelium w g/200 ml pożywki).

Krzywa wzrostu szczepu *Paecilomyces* sp. 2430a₁ nie jest tak urozmaicona. Nie obserwuje się żadnych lokalnych ekstremów w przyroście biomasy i pH płynu hodowlanego. Przyrost biomasy jest prawie liniowy, z wyraźnym przyspieszeniem przyrostu grzybni między 4. i 7. dniem hodowli. Jakkolwiek wartość pH nieznacznie zmienia się w czasie całego rozwoju grzybni, to właśnie w tych dniach szybciej opada; od wartości początkowej 6,88 do pH = 6,48 osiąganą w 11. dniu hodowli.

3. Poszukiwania mykotoksyn

Większość z niewielu opisanych do tej pory toksyn wydzielanych przez grzyby owadobójcze, izolowana była poprzez ekstrakcję grzybni takimi rozpuszczalnikami jak aceton, chlorek metylenu czy octan etylu. W przeprowadzonej analizie acetonowych ekstraktów mycelium *Z. (Erynia) ovispora*, oraz *Z. phyllobii* nie wykazano w nich obecności substancji, które mogłyby być uważane za wyraźne toksyny. Jedynie stosunkowo większa ilość wolnych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza nisko cząsteczkowych, może wywierać negatywny wpływ na normalny rozwój owada. Interesujące było stwierdzenie stosunkowo dużej ilości skwalenu we frakcji węglowodorowej izolowanej z grzybni *Z. phyllobii* (5). Związek ten raczej rzadko występuje u grzybów. Obok dużej ilości triacylgliceroli i mniejszej diacylgliceroli, obserwowaliśmy też niewielkie ilości frakcji steroidowej. W przypadku *Z. (Erynia) ovispora* był to cholesterol i ergosterol, natomiast odnośnie do *Z. neoaphidis* i *Z. phyllobii* – kampesterol/22-dihydrobrassikosterol (2,6,7).

Zoophthora neoaphidis

Rys. 3. Aktywność letalna poszczególnych frakcji metabolitów *Z. neoaphidis* w stosunku do larw *Galleria mellonella*.

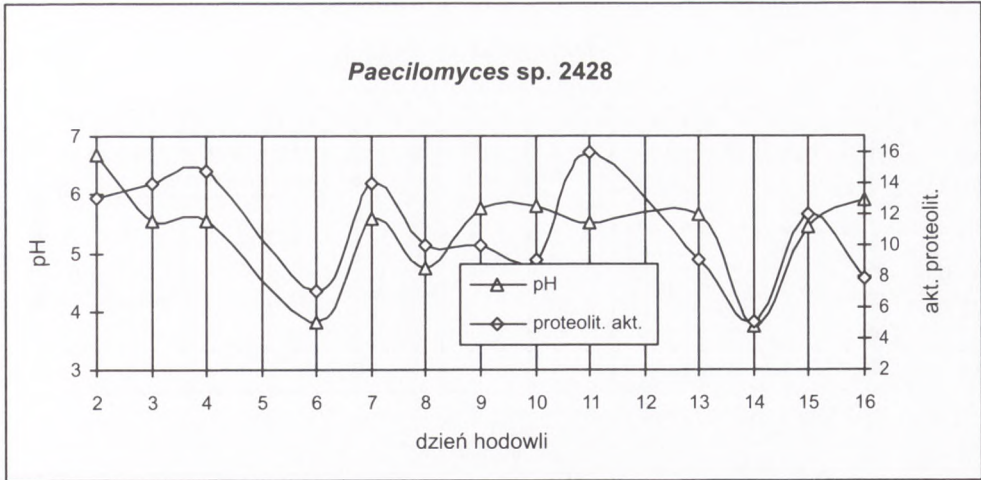
Podjęto zatem poszukiwania substancji toksycznych spośród bardziej polarnych metabolitów wydzielanych do podłoża hodowlanego. W przypadku grzybów z rodzaju *Zoophthora*, z uwagi na złożony skład podłoża hodowlanego, badania te były bardzo utrudnione. Można było jedynie stwierdzić, że surowy płyn pochodzący z hodowli na larwy *G. mellonella* (8) wywiera zdecydowanie silniejszy efekt letalny, niż jakakolwiek jego frakcja uzyskana poprzez ultrafiltrację tego płynu przez membrany 1000, 10 000 i 30 000 Da. Stosunkowo najwyższą aktywność wykazała frakcja zawierająca związki o masach powyżej 30 000 Da, a zatem już substancje wyżej cząsteczkowe, wśród nich enzymy (rys. 3).

Aby uniknąć problemów związanych z maskującą obecnością składników pożywki w analizie metabolitów własnych, opracowane zostały stresowe warunki hodowli, w których biosyntezowane przez mikroorganizm metabolity wydzielane były na powierzchni grzybni w postaci kropeł. Warunki stresowe to szybkie zmiany temperatury, albo/i pH podłoża hodowlanego. Wówczas szczep *Z. neoaphidis* wydzieliał drob-

ne krople na powierzchni grzybni rosnącej na podłożu stałym (9). Metabolity rozpuszczone w kroplach wykazywały interesującą aktywność biologiczną w stosunku do bakterii. Stymulowały one rozwój bakterii gramujemnych, natomiast były wyraźnie toksyczne w stosunku do gramododatnich. Niestety, ograniczona ilość materiału, bardzo niskie stężenie związków zawartych w kroplach (poniżej 3%) i ich złożoność strukturalna, uniemożliwiły przeprowadzenie izolacji i identyfikacji poszczególnych metabolitów. We wstępnych badaniach mogliśmy stwierdzić ich małą trwałość. Metabolity te rozdzielane na drodze preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej bardzo łatwo (w sposób niekontrolowany), odszczepiały cząsteczki glukozy. Ich wyjątkowa podatność na zakażenia (szczególnie bakteriami gramododatnimi) była dodatkowym utrudnieniem. Na podstawie zmierzonych widm NMR można sądzić, że analizowane substancje należą do grupy glikoproteidów.

Laboratoryjną hodowlę obu szczepów z rodzaju *Paecilomyces* można było prowadzić na pożywce, zawierającej ściśle określone związki nieorganiczne oraz glukozę. Nie było zatem problemu z „tłem” pochodzącym od nie zidentyfikowanych organicznych składników pożywki. Wytwarzane metabolity miały wyraźnie hydrofilowy charakter. Żadne z produkowanych połączeń nie były ekstrahowane przez niepolarny, czy mniej polarny rozpuszczalnik (jak heksan, chlorek metylenu, octan etylu czy eter). Pomimo zachowania tych samych warunków hodowli nie uzyskiwaliśmy powtarzalnych wyników. Ta zmienność składu biosyntezy metabolitów uniemożliwiła zebranie wystarczająco dużej ilości, w miarę jednorodnego materiału, aby podjąć systematyczne badania strukturalne. Wstępne wyniki badań (widma NMR) wskazują na wyraźny peptydowy charakter analizowanych metabolitów. Trudno też było znaleźć jakąkolwiek korelację pomiędzy obrazem sygnałów substancji na chromatogramach HPLC płynu pohodowlanego, a jego aktywnością biologiczną, testowaną na larwach *G. mellonella*. Dla szczepu 2430a₁ można było wprawdzie zauważyć pewną powtarzalność w tworzeniu metabolitów w poszczególnych dniach hodowli, ale trudno było powiązać ich obecność z pojawieniem się efektu letalnego w testach na owadach. Można sądzić, że analizowane mikroorganizmy nie produkują połączeń o wyraźnej toksyczności. Pod koniec okresu wegetacyjnego *Paecilomyces* obserwowaliśmy jedynie biosyntezę toksycznego monoszczawianu amonu, który był wydzielany na powierzchni grzybni (10).

Podstawowym czynnikiem w procesie infekcji i porażania organizmu owada przez grzyby z rodzaju *Zoophthora* i oba analizowane szczepy *Paecilomyces*, jak się wydaje, jest aktywność enzymatyczna chitynaz, proteaz i lipaz. Wcześniej udowodniono, że lipazy i proteazy uczestniczą już w pierwszym etapie destrukcji warstwy ochronnej owada – kutikuli. Jonsson (10) udowodnił obecność enzymów proteolitycznych u dziesięciu przedstawicieli rodzaju *Entomophthora*, a Leopold i Samsinakova (11) potwierdzili występowanie chitynazy, proteazy, lipazy i cellulazy u grzyba *Beauveria bassiana*. Charakterystykę tych enzymów u *Zoophthora* i *Erynia* przedstawiliśmy też we wcześniejszych publikacjach (2,12). Po pokonaniu kutikuli, organizm owada trawiony jest stopniowo przez lipazy i proteazy.

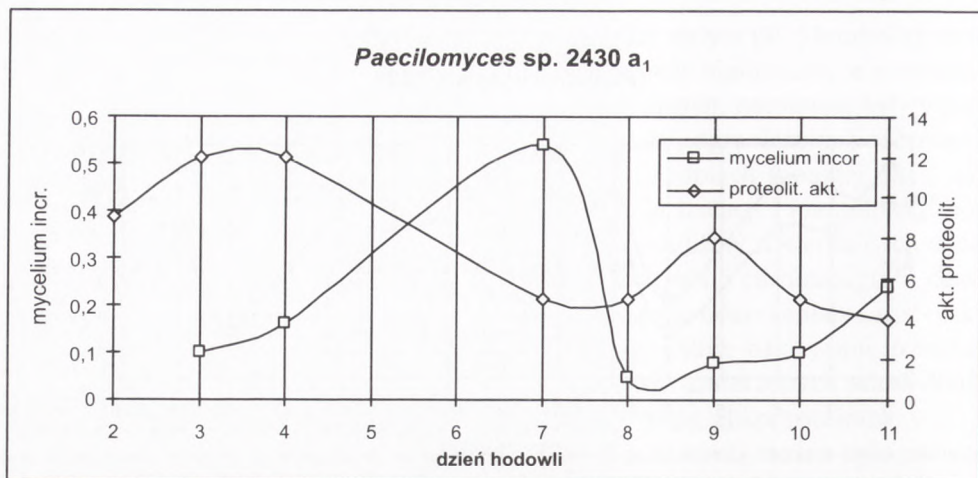


Rys. 4. Zmiany aktywności proteolitycznej i pH w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Paecilomyces* sp. 2428 d.

4. Aktywność enzymatyczna

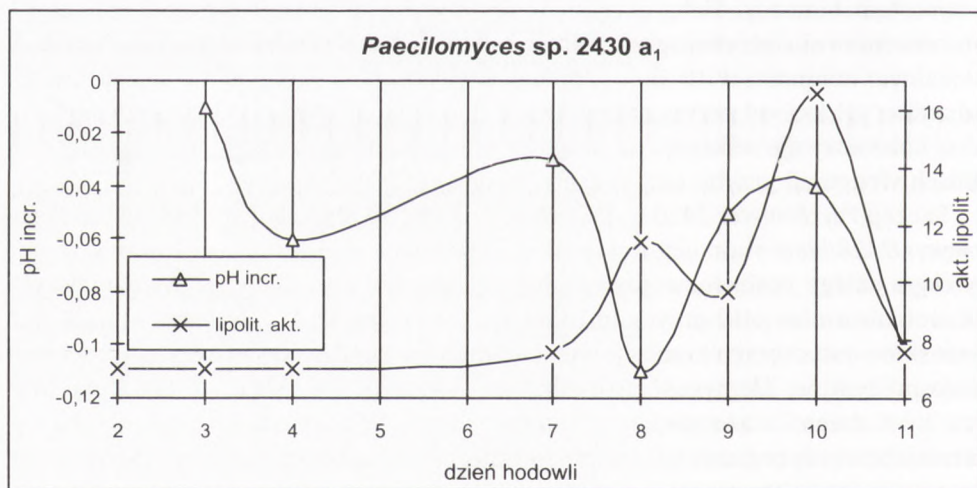
Dla analizowanych szczepów można było obserwować ciekawe współzależności pomiędzy aktywnością enzymatyczną, pH płynu hodowlanego i przyrostem biomasy. W ciągu 16-dniowego wzrostu *Paecilomyces* sp. 2428d można było wyróżnić cztery maksima aktywności proteolitycznej. Maksima te pojawiają się zazwyczaj w okresie najwyższych wartości pH, z wyjątkiem okresu pomiędzy 9. i 12. dniem hodowli (rys. 4). Natomiast minima aktywności proteolitycznej korelują ze zwiększonym przyrostem biomasy. Słabą aktywność lipolityczną obserwuje się podczas całego procesu rozwoju grzybni, przy jednym wyraźnym maksimum w 15. dniu hodowli i lokalnym minimum w 10. dniu. Zmiany aktywności lipolitycznej nie są zależne ani od zmian pH, ani od przyrostu mycelium. Porównanie obu krzywych aktywności lipazy i proteazy nie wskazuje na żadną korelację pomiędzy nimi; jedynie w ostatnich dniach wegetacji grzyba oba enzymy osiągają lokalne maksima (5).

Szczep *Paecilomyces* 2430a₁, jakkolwiek należy do tego samego rodzaju co *Paecilomyces* 2428d, to obraz jego aktywności enzymatycznej jest zdecydowanie różny. W ciągu całego cyklu rozwojowego tego grzyba nie obserwuje się wyraźniejszych ekstremów zmian pH i przyrostu biomasy. Stąd wyprowadzenie bardziej ogólnych wniosków dotyczących korelacji tych parametrów z aktywnością enzymatyczną jest mało precyzyjne. Aktywność proteolityczna wykazuje dwa szerokie maksima: między 3. i 4. dniem, oraz mniejsze w 9. dniu hodowli. W poszukiwaniu sposobu na wyraźniejsze uwidocznienie tych współzależności sporządzono grafik, na którym korelowano zmiany aktywności enzymatycznej ze zmianami gradientu przyrostu biomasy. Na rysunku 5 można zauważyć, że wyraźniejszy przyrost biomasy koreluje ze spadkiem aktywności proteolitycznej (5).

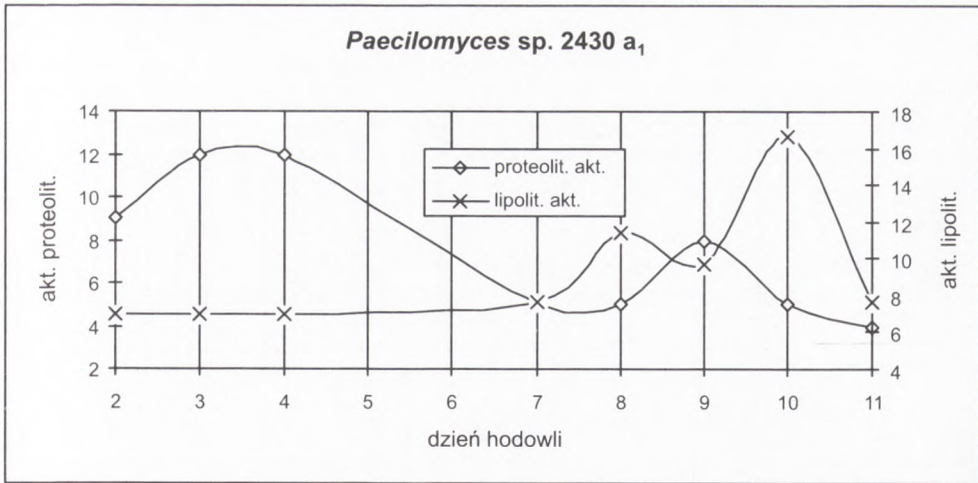


Rys. 5. Zmiany aktywności proteolitycznej i zmiany przyrostu (incr.) mycelium w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Paecilomyces* sp. 2430 a₁.

Pomiary aktywności lipolitycznej dla tego szczepu wykazały dwa maksima, w 8. i 10. dniu hodowli. Widoczna jest korelacja pomiędzy zmianami aktywności tego enzymu od gradientu zmian pH, przy czym lipazy w 8. i 10. dniu hodowli wykazują zwiększoną aktywność przy różnych wartościach pH (rys. 6). Dla tego szczepu można też zauważyć pewną zamienną sekwencję aktywności obu enzymów, co pokazano na rysunku 7. Maksima aktywności proteolitycznej i lipolitycznej wzajemnie się



Rys. 6. Zmiany aktywności lipolitycznej i zmiany (incr.) pH w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Paecilomyces* sp. 2430 a₁.

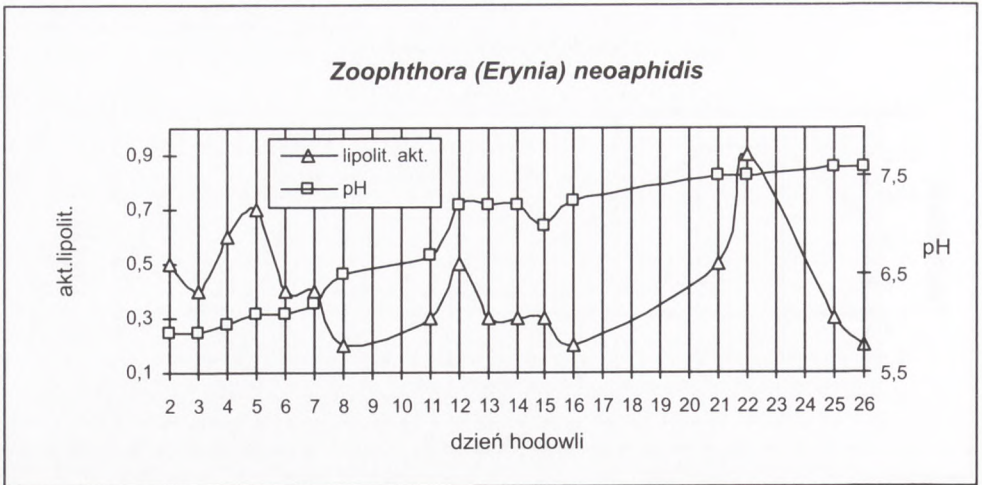


Rys. 7. Zmiany aktywności proteolitycznej i lipolitycznej w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Paecilomyces* sp. 2430 a₁.

wymieniają. Może to być zależność przypadkowa, ale może też oznaczać sekwencyjne działanie obu, tych ważnych dla życia mikroorganizmu, enzymów.

Dokładna analiza krzywych wzrostu grzybni z nałożeniem na nie zmienności aktywności enzymatycznej proteazy może sugerować, że widoczne na chromatogramie HPLC substancje nie są metabolitami, ale produktami enzymatycznej degradacji grzybni. Może to wyjaśnić przyczynę zmienności i przypadkowości składu analizowanych płynów pochodzących, widocznych na chromatogramach HPLC. Podjęliśmy próby analizy substancji częściej powtarzających się na chromatogramach HPLC. Wykorzystując spektroskopię masową ESMS (*electro-spray mass spectrometry*) mogliśmy udowodnić ich peptydowy charakter. W przypadku szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d był to prawdopodobnie cykliczny peptyd o masie 801 Da, natomiast dla *Paecilomyces* sp. 2430a₁ di- lub tripeptyd o masie 302 Da. Oba te związki nie wykazywały jednak żadnej aktywności w stosunku do testowanych larw *G. mellonella*.

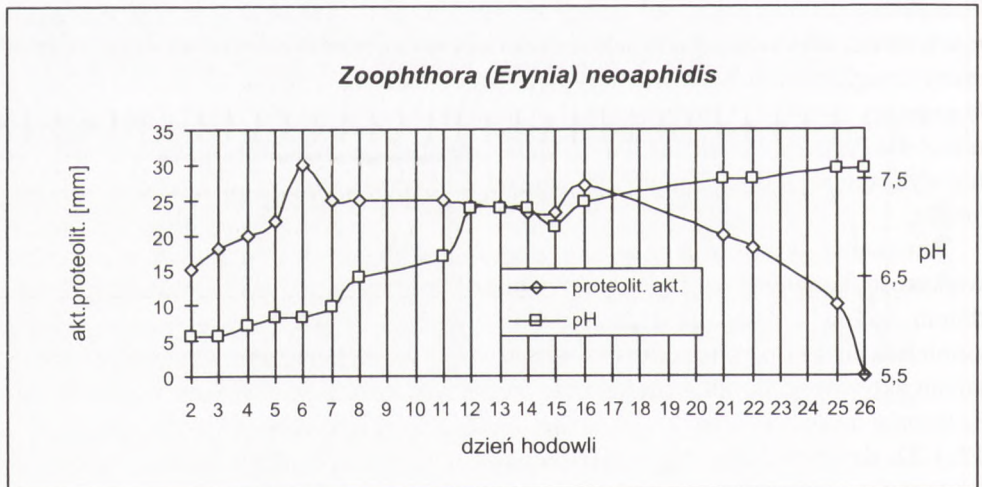
Zmienność aktywności enzymatycznej u *Zoophthora* jest mniej urozmaicona. Dla większości badanych szczepów, aktywność lipolityczna pojawia się między 3. i 5. dniem hodowli, osiągając maksimum pomiędzy 7. i 9., a następnie stopniowo zmniejsza się aż do końca okresu wegetacji (13). Nieco bardziej zróżnicowany obraz zmian aktywności lipolitycznej w poszczególnych dniach hodowli obserwowany dla *Z. (Erynia) neoaphidis* (rys. 8). Wyraźne 3 maksima tej aktywności przypadają na 5., 12. i 22. dzień hodowli. Nie widać jednak żadnej ich korelacji z liczbą pH kultury. Proteazy u tego mikroorganizmu utrzymują dość wysoką aktywność, praktycznie przez cały okres wegetacji (rys. 9). Niewielkie lokalne maksima można było zauważyć w 6. i 16. dniu rozwoju grzybni. Ta wysoka aktywność proteolityczna może



Rys. 8. Zmiany aktywności lipolitycznej i pH w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Zoophthora (Erynia) neoaphidis*.

tłumaczyć powolne, ale systematyczne trawienie i „mumifikację” organizmu zainfekowanych owadów z końcowym efektem letalnym.

Mechanizm infekcji i porażenia organizmu owada przez entomopatogeniczne grzyby ma zatem bardzo złożony mechanizm. Mogą w nim uczestniczyć zarówno wtórne metabolity wytwarzane przez te mikroorganizmy, jak i enzymy. Jednakże,



Rys. 9. Zmiany aktywności proteolitycznej i pH w pełnym cyklu rozwojowym szczepu *Zoophthora (Erynia) neoaphidis*.

jak się wydaje, w przypadku grzybów należących do rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces* podstawowym czynnikiem entomopatogenicznym są właśnie enzymy.

Literatura

1. Bałazy S., Miętkiewski R., Majchrowicz I., (1990), Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 392, 35-56.
2. Urbańczyk J. M., Zabża A., Bałazy S., Peczyńska-Czoch W., (1992), J. Invertebrate Pathology, 59, 250-257.
3. Mikami M., (1984), Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol., Hyg. (A), 257 (2), 275-283.
4. Brückner H., Maisch J., Reinecke C., Kimonyo A., (1991), Amino Acids, 1, 251-257.
5. Celejowski M., Ziółko D., Zabża A., prace nie opublikowane.
6. Greb-Markiewicz B., Zabża A., Szafranek B., Szafranek J., Maliński E., Synak E., Cimino G., (1998), Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, vol. 21(4), 97-100.
7. Zabża A., Karaszewski R., Szafranek B., Synak E., Szafranek J., (1995), J. Basic Microbiology, 35, 123-131.
8. Mollier P., Lagnel J., Fournet B., Aioun A., Riba G., (1994), J. Insect. Pathology, 64, 200-207.
9. Piątkowski J., Zabża A., Rokomińska M., Greb-Markiewicz B., (1998), Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, vol. 21(4), 135-138.
10. Zabża A., Piątkowski J., Greb-Markiewicz B., Bujak J., (1996), Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, vol. 19(9), 196-199.
11. Jonsson A. G., (1968), Appl. Microbiol., 16, 450-457.
12. Leopold J., Samsinakova A., (1970), Invertebrate Pathology, 18, 322-330.
13. Urbańczyk M. J., Zabża A., Wieczorek J., (1988), *Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology*, Ed. By F. Sehnal, A. Zabża, D. L. Delinger, 393-398.