

Довнар Д.В., аспирант<sup>1</sup>

Войтка Д.В., кандидат биологических наук<sup>2</sup>

Каплич В.М., доктор биологических наук, профессор<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», г. Минск

<sup>2</sup>РУП «Институт защиты растений», аг. Прилуки

<sup>3</sup>УО «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ КРОВОСОСУЩИХ МОШЕК (DIPTERA: SIMULIIDAE) В ВОДОТОКАХ БЕЛОРУССКОГО ПООЗЕРЬЯ

### Резюме

В статье рассматриваются паразиты и хищники кровососущих мошек в водотоках Белорусского Поозерья. В сравнительном аспекте описана биологическая активность кристаллоносных бацилл *Bacillus thuringiensis* и энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* на мошках *Wilhelmia equina* L. III-го возраста.

Показано, что паразитами преимагинальных фаз мошек являются микроспоридии, мермитиды и грибы. Полученные в лабораторных опытах данные показывают перспективность использования исследуемых штаммов *B. thuringiensis* для регуляции численности кровососущих насекомых, в частности семейства Simuliidae.

### Summary

The paper deals with the parasites and predators of blackflies in water-currents of the Belarusian Lakeland. It is described the biological activity of collection strains of *Bacillus thuringiensis* and also an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on *Wilhelmia equina* larvae of the third age in a comparative aspect.

It was shown that the parasites of the preimaginal stages of blackflies are microsporidia, mermitida and fungi. The data resulting from the study suggest the possibility of using *B. thuringiensis* studied strains to population control of blood-sucking insects in particular of the family Simuliidae.

Поступила в редакцию 10.10.2018 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Белорусское Поозерье занимает северную часть Беларуси и административно включает Витебскую область и несколько северных районов Минской и Гродненской областей. Регион сформировался в результате последнего Поозерского оледенения и выделяется по сравнению с другими регионами республики своеобразием климата и сложностью рельефа [1]. Территория Поозерья относится в основном к бассейну р. Западная Двина (81 %) и характеризуется сравнительно развитой гидрографической сетью с большим количеством озер (около 2,8 тыс.). По густоте речной сети район входит в число первых в Беларуси (45 км на 100 км<sup>2</sup> территории) [2]. Разветвленная речная сеть создает благоприятные условия для распространения мошек, основным местом выплода и размножения которых яв-

ляются проточные водоемы.

Мошки широко распространены и развиваются только в водотоках с высоким содержанием растворенного в воде O<sub>2</sub>. Являясь массовыми кровососами, они причиняют беспокойство и вред как человеку, так и сельскохозяйственным животным, вызывая снижение их продуктивности [3, 18]. Симулииды также играют роль в процессе передачи возбудителей болезней человека и животных: онхоцеркоза, анаплазмоза, туляремии и др. [5, 12]. Особенно остро проблема кровососущих мошек стоит на территории санитарно-оздоровительных учреждений вдоль крупных водных артерий (рр. Зап. Двина, Дисна). Выплод кровососов совпадает с периодом отдыха населения, лишая его полноценного оздоровления. В мировой литературе имеются данные, согласно которым в период лета

насекомых сокращается количество туристов на 85 %, в результате чего годовые потери составляют около 250 тыс. долларов [15].

Вред, наносимый кровососами, обуславливает проведение мероприятий, направленных на снижение численности их популяции. До недавнего времени наиболее распространенным методом защиты от кровососущих насекомых был химический метод. Но он при высокой эффективности имеет существенные недостатки: во-первых, химические инсектициды в большинстве своем универсальны и убивают не только вредных, но и полезных насекомых (опылителей); во-вторых, они загрязняют окружающую среду; в-третьих, за многолетнюю практику применения инсектицидов насекомые многих видов приобрели устойчивость к ним [20]. Исходя из этого, следует ограничить применение этих средств и проводить исследования по разработке экологически безопасных и безвредных для человека и окружающей среды способов защиты от гнуса.

Альтернативным методом регуляции численности кровососов является биологический метод, который включает в себя использование хищников, паразитов и биопрепаратов. Широкий спектр хищников и паразитов можно рассматривать как естественных врагов мошек. Хищники мошек могут варьировать от беспозвоночных, птиц и рыб до млекопитающих. Паразиты и патогенные микроорганизмы также играют важную роль в регулировании численности кровососов. К ним относятся вирусы, бактерии, грибы, простейшие и нематоды [16, 17, 19]. В ходе нашего исследования основной акцент был сделан на паразитах водных фаз мошек.

**Целью** данного исследования являлось изучение биологических агентов контроля численности мошек в водотоках Белорусского Поозерья и выявление перспективных агентов для борьбы с гнусом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящей работы послужили паразиты мошек, собранные в результате стационарных и маршрутных

исследований водотоков бассейна р. Западная Двина, а также штаммы энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*B. thuringiensis* 2, *B. thuringiensis* 4), *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (16-91) и штамм энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 10-06 – основа коммерческого препарата Melobass®, пс. коллекционного фонда РУП «Институт защиты растений». Лабораторные опыты проводились в условиях инсектария лаборатории микробиологического метода защиты растений Института защиты растений НАН Беларуси.

Сборы преимагинальных фаз симулиид осуществлялись общепринятыми методами [4, 11]. Личинок мошек, подозрительных на заражение микроспоридиями, мермитидами и грибами, определяли визуально или с помощью лупы по вздутию и окраске заднего конца тела с последующим их исследованием под микроскопом.

Видовую идентификацию симулиид проводили по И.А. Рубцову (1956), А.В. Янковскому (2002) и В.М. Капличу с соавторами (2015). Микроспоридиоз мошек изучали по методике И.В. Исси с соавторами (1990), мермитидоз – по И.А. Рубцову (1978), микоз – по Э.З. Коваль (1974).

Ларвицидную активность коллекционных штаммов энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis* и гриба *B. bassiana* оценивали по методике, предложенной Всемирной организацией здравоохранения, на личинках кровососущих мошек *W. equina*.

Лабораторное культивирование штаммов кристаллоносных бацилл *B. thuringiensis* проводили на лабораторной качалке ИКА®KS 260 basic в колбах емкостью 750 мл при температуре 28 °С и скоростью вращения качалки 250 об/мин в течение 48 часов на питательной среде следующего состава (%): меласса – 3,0; дрожжевой экстракт – 2,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,15; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,15; MgSO<sub>4</sub> – 0,01, FeSO<sub>4</sub> – 0,0001. Количество жизнеспособных спор определяли путем высева из серийных разведений суспензий на мясопептонный агар.

Культивирование энтомопатогенного гриба *B. bassiana* проводили на лаборатор-

ной качалке ИКА®KS 260 basic в колбах емкостью 750 мл при температуре 26 °С и скорости вращения качалки 200 об/мин в течение 72 часов на питательной среде следующего состава (%): меласса – 2,0, глицерин – 2,0, пептон – 2,0, NaNO<sub>3</sub> – 0,1, MgSO<sub>4</sub> – 0,1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,1, вода водопроводная – до 100. Количество спор определяли с помощью гемоцитометра (камеры Горяева).

Для лабораторных исследований личинок мошек отлавливали в водотоках и вместе с субстратом помещали в емкости, заполненные речной водой, и доставляли в лабораторию. Затем личинок III-го возраста рассаживали по 30 особей в химические стаканы с 400 мл воды из мест обитания мошек. Для аэрации воды использовали микрокомпрессоры Barbus Air 002 (рисунок 1).



Рисунок 1. – Лабораторная установка

Гибель личинок отмечали через каждые 12 ч. Использовали не менее 3-х концентраций, каждую из которых испытывали в 3-х повторностях.

Смертность для каждой концентрации, с поправкой на гибель в контроле, вычисляли по формуле Аббота (1):

$$C = 100 \times \frac{(Ba - Ab)}{Aa}, \quad (1)$$

где C – процент смертности особей с поправкой на контроль;

A и a – общее число особей в опытном варианте и контроле соответственно;

B и b – количество погибших особей в опытном варианте и контроле соответственно.

Расчет полулетальной дозы (LD<sub>50</sub>) производился по методу Кербера (2):

$$LD_{50} = LD_{100} - \sum \frac{(z \times D)}{n}, \quad (2)$$

где LD<sub>100</sub> – доза препарата, которая вызвала эффект у всех тест-объектов в группе;

D – интервал между двумя смежными

дозами;

Z – среднее арифметическое из двух значений числа тест-объектов, у которых проявился положительный эффект при воздействии каждой из двух смежных доз;

n – число тест-объектов в группе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Согласно нашим исследованиям, одним из важнейших регуляторов численности личинок мошек в водотоках исследуемого региона являются микроспоридии. Всего выявлено четыре вида микроспоридий из трех родов: *Pleistophora simulii* (Lutz et Splendore, 1904), *Vovraia multisporea* (Strickland, 1911), *Amblyospora bracteata* (Strickland, 1913) и *A. varians* (Leger, 1897).

В обследованных водотоках микроспоридии зарегистрированы у личинок *Schoenbaueria pusilla* (Fries, 1824), *W. balcanica* (Enderlein, 1924), *W. equina* (Linnaeus, 1746), *W. lineata* (Meigen, 1804), *Boopthora erythrocephala* (De Geer, 1776), *Odagmia ornata* (Meigen, 1818), *Argentisimulium noelleri* (Friederichs, 1920), *Simulium morsii-*

*tans* (Edwards, 1915) и *Sim. promorsitans* (Rubtsov, 1956). Личинки доминирующих видов (*B. erythrocephala* (индекс доминирования (ИД) 34,3 %) и *O. ornata* (ИД 8,4 %)) заражены в 4–5 раз выше (экстенсивность инвазии (ЭИ) 25,0 % и 17,6 % соответственно) по сравнению с другими, встречающимися в сборах. Приуроченность отдельных видов микроспоридий к отдельным видам мошек не установлена. Стоит отметить, что наибольшая зараженность личинок паразитами наблюдается в водотоках с высокой численностью и видовым разнообразием их хозяев. Личинки, зараженные микроспоридиями, встречались во всех типах водотоков, во всех поколениях, при этом экстенсивность заражения популяций мошек колебалась в течение сезона, но особенно высока была во второй половине лета.

Споры микроспоридий попадают в личинку перорально и локализуются в жировом теле симулиид, где развиваются как облигатный внутриклеточный паразит. Пораженные личинки отличаются беловато-желтым цветом брюшка и увеличенными размерами, через кутикулу просвечиваются бесформенные белые, кремовые или розовые скопления. Выраженные признаки заражения отмечены у личинок старшего возраста. Зараженные микроспоридиями личинки слабо удерживаются на субстрате и легко уносятся потоком воды. Окукливание пораженных особей не происходит [8, 16].

Личинки мошек также поражаются грибами. Установлено [14], что около 750 видов грибов вызывают инфекции у насекомых и клещей. В наших сборах энтомопатогенный гриб *Coelomycidium simulii* (Debais, 1919) обнаружен у 9 видов мошек: *B. erythrocephala*, *Sch. pusilla*, *W. equina*, *Od. ornata*, *Arg. noelleri*, *Sim. rostratum*, *Sim. morsitans*, *Sim. paramorsitans* и *Sim. promorsitans*. Заражение личинок мошек грибами отмечали на протяжении всего летнего периода с двумя подъемами численности пораженности личинок – в начале лета и сентябре. Инфицированных особей находили в средних и малых реках, ручьях и мелиоративных каналах. Наибольшее количество пораженных личинок отмечено в водотоках,

сильно заросших водной растительностью. Чаще всего инфицированы *B. erythrocephala* (ЭИ 8,6 %) и *W. equina* (ЭИ 2,1 %). В основном гриб поражает жировое тело особи, а также покровы, гонады и нервную систему [14]. Размеры инфицированных и неинфицированных личинок существенно не отличаются. Пораженные грибом личинки имеют розовато-коричневый цвет брюшка.

Как биорегуляторы численности вредных насекомых важную роль играют мермитиды [10, 17]. Поражение личинок мошек мермитидами регистрировали с июля по сентябрь, с максимумом во второй половине лета (54 % случаев инфицирования), в чистых проточных водоемах, не загрязненных промышленными отходами. Видовую принадлежность мермитид определить нам не удалось, согласно данным Daniel P. Molloy [17], наиболее распространенными мермитидами, паразитирующими у мошек, являются представители родов *Mesomermis* (Daday, 1911), *Gastromermis* (Micoletzky, 1923) и *Isomermis* (Coman, 1953).

На территории Белорусского Поозерья мермитиды способны заражать личинок 6 видов мошек из 4 родов: *W. equina*, *W. lineata*, *B. erythrocephala*, *Arg. noelleri*, *Sim. promorsitans* и *Sim. morsitans*. Более подвержены заражению личинки *B. erythrocephala* (ЭИ около 10 %). Единичные случаи паразитирования зарегистрированы у *Arg. noelleri* (ЭИ 0,4 %). Отдельные особи были инфицированы несколькими нематодами, которые видны через кутикулу хозяина. Паразит локализуется в брюшном отделе тела личинки. Зараженные мермитидами личинки мошек в 1,5–2 раза крупнее, чем здоровые личинки. Влияние паразита на хозяина проявляется в задержке его развития, что, вероятно, является следствием сильного истощения из-за недостатка питательных веществ, а не активного влияния паразита на гормональную систему хозяина [17].

В настоящее время к числу перспективных агентов контроля численности кровососущих двукрылых, наносящих серьез-



ный экономический ущерб, относятся споробразующие бактерии *B. thuringiensis*, энтомопатогенные грибы, а также препараты, разработанные на их основе [9, 14, 19].

Патогенное действие *B. thuringiensis* на насекомых связано с токсинами и другими метаболитами бактерий. Однако различные штаммы *B. thuringiensis* обладают разными патогенными свойствами по отношению к таксономическим группам насекомых. Так, известны штаммы, отличающиеся патогенностью по отношению к личинкам чешуекрылых, двукрылых [9]. Поэтому важна оценка энтомопатогенности отдельных штаммов *B. thuringiensis* по отношению к конкретным таксономическим группам насекомых.

Таблица 1. – Биологическая активность микробиологических агентов в отношении личинок мошек III-го возраста *W. equina*

Титр, спор/мл	<i>B. thuringiensis</i> 2		<i>B. thuringiensis</i> 4		<i>B. thuringiensis</i> 16–91		<i>B. bassiana</i> 10–06	
	Биологическая активность с поправкой на контроль, (%) при экспозиции							
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч	12 ч	24ч
$1-2 \times 10^2$	10,0	50,0	11,1	64,4	20,0	42,2	0,04	8,8
$1-2 \times 10^3$	36,7	86,6	15,5	84,4	17,7	62,2	0,04	4,4
$1-2 \times 10^4$	53,3	96,7	31,1	55,5	37,7	84,3	8,8	40,0
LD <sub>50</sub> (спор/мл)	$2,1 \times 10^3$		$5,8 \times 10^3$		$5,09 \times 10^3$		$1,3 \times 10^4$	

Причем, в вариантах со штаммом *B. thuringiensis* 2 до 50 % особей погибло в течение 12 часов (LD<sub>50</sub> составляла  $2,1 \times 10^3$  спор/мл). Эффективность штаммов *B. thuringiensis* 4 и *B. thuringiensis* 16–91 была практически на одном уровне (LD<sub>50</sub> составляла  $5,8 \times 10^3$  спор/мл и  $5,09 \times 10^3$  спор/мл соответственно).

Из данных таблицы 1 видно, что энтомопатогенный гриб *B. bassiana* по сравнению со штаммами *B. thuringiensis* против личинок мошек проявил меньшую ларвицидную активность в 2,78 раза ( $p < 0,05$ ). Однако следует отметить, что энтомопатогенные грибы в отличие от бактерий растут и развиваются относительно медленно, и их энтомоцидное действие обусловлено другими механизмами. Эффект от энтомопатогенных грибов наступает через 1–2 недели

Грибные биопестициды также имеют большие перспективы в качестве альтернативных биорегуляторов насекомых. Один из наиболее распространенных в мире энтомопатогенных грибов, поражающий насекомых разных отрядов, в том числе кровососущих двукрылых, и активно используемый для создания экологически безопасных инсектицидных препаратов, является *B. bassiana* [19].

Результаты лабораторных экспериментов показали, что все исследуемые штаммы *B. thuringiensis* оказались высокоэффективными в отношении личинок мошек: гибель личинок достигала 96,7 % в течение суток при использовании штамма *B. thuringiensis* 2 (таблица 1).

и сохраняется дольше [14].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа литературных данных и собственных исследований установлено, что паразитами преимагинальных стадий мошек выступают микроспоридии, мермитиды и грибы. Заражение симулиид паразитом определенного вида зависит от экологических условий обитания. Основными регуляторами численности мошек в проточных водоемах являются микроспоридии. Более слабое развитие инфекции вызывают грибы и мермитиды. Проведенные лабораторные эксперименты показали высокую эффективность исследуемых штаммов *B. thuringiensis* против преимагинальных фаз кровососущих мошек. Полученные в лабораторных модельных опытах

данные позволяют сделать вывод о перспективности использования штаммов *B. thuringiensis* 2, *B. thuringiensis* 4 и *B. thuringiensis* 16-91 для промышленного производ-

ства бактериальных препаратов с целью контроля численности личинок кровососущих мошек.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мержвинский, Л.М. Биологическое разнообразие Белорусского Поозерья: монография / Л.М. Мержвинский [и др.]; под общ. ред. Л.М. Мержвинского. – Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2011. – 413 с.
2. География Белоруссии: учеб. для студентов геогр. фак. высш. учеб. заведений, под ред. В.А. Дементьева [и др.]. – 2-е изд. – Минск: Выш. шк., 1977. – 320 с.
3. Каплич, В.М. Кровососущие мошки (Diptera, Simuliidae) Республики Беларусь: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.19 / В.М. Каплич; Ин-т паразитологии РАН. – М., 1999. – 34 с.
4. Каплич, В.М. Кровососущие мошки лесной зоны / В.М. Каплич, З.В. Усова. – Минск: Ураджай, 1990. – 176 с.
5. Капліч, В.М. Мошкі (Diptera, Simuliidae) – магчымыя носыбіты узбуджальніка анплазмозу буйной рагатай жывёлы / В.М. Капліч // Весці Акадэміі навук БССР. Серыя біялагічных навук. – 1985. – № 6. – С. 89–91.
6. Каплич, В.М. Мошки (Diptera, Simuliidae) смешанных лесов Европы / В.М. Каплич, Е.Б. Сухомлин, А.П. Зинченко. – Минск: Новое знание, 2015. – 464 с.
7. Коваль, Э.З. Определитель энтомопатогенных грибов СССР / Э.З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1974. – 260 с.
8. Микроспоридии мошек (определение и краткое описание микроспоридий мировой фауны) / И.В. Исси [и др.]; под общ. ред. А.М. Дубицкого. – Ташкент: Фан, 1990. – С. 124.
9. Оценка лепидоцидной активности биологических препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* / М.В. Лозовская [и др.] // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК. – 2014. – № 4. – С. 82–87.
10. Рубцов, И.А. Мермитиды. Классификация, значение, использование / И.А. Рубцов. – Л.: Наука, 1978. – 208 с.
11. Рубцов, И.А. Мошки (сем. Simuliidae). Фауна СССР Насекомые двукрылые / И.А. Рубцов – М. – Л.: Наука, 1956. – 860 с.
12. Самойлова, Т.И. Арбовирусы в Республике Беларусь: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.06; 14.00.30 / Т. И. Самойлова; ГУ НИИЭМ МЗ РБ. – Минск, 2003. – 41 с.
13. Янковский, А.В. Определитель мошек (Diptera, Simuliidae) России и сопредельных территорий (бывшего СССР) / А.В. Янковский. – СПб, 2002. – 570 с.
14. Abdel Ghany, T.M. Entomopathogenic fungus and their role in biological control / T.M. AbdelGhany. – Foster City: OMICS Group eBooks, 2015. – 46 p.
15. Economic losses during an outbreak of *Simulium* (*Wilhelmia*) species (Diptera: Simuliidae) in the Cappadocia region of Turkey / S. Sariözkan [ et al.] / *Turkiye Parazitol Derg.* – 2014. – № 38. – P. 116–119.
16. Maurand, J. Comparative histopathological effects of coelomic parasites (Chytridiales: Microsporides) of simuliid larvae / J. Maurand, J.F. Manier // *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* – 1968. – № 43. – P. 79–85.
17. Molloy, Daniel P. Mermithid parasitism of black flies (Diptera: Simuliidae) / Daniel P. Molloy // *Journal of nematology.* – 1981. – Vol. 13, № 3. – P. 250–256.
18. Niesiolowski, S. Meszki (Simuliidae) gor Swientokrzyskich / S. Niesiolowski // *Wiad. Parazytol.* – 1978. – Vol. 41, № 5. – P. 597–608.
19. Ramirez, José L. Entomopathogenic fungal infection leads to temporospatial modulation of the mosquito immune system / José L. Ramirez / *PLoS Negl Trop Dis.* [Electronic resource]. – 2018. – № 12. – Mode of access <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006433>. – Date of access: 02.10.2018.
20. Regional susceptibilities of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) to ten insecticides / Y. Zuo [et al.] // *Florida Entomologist* – 2016. – Vol. 99, № 2.