Fixácia spór Beauveria bassiana v polymérnej matrici

Florián Štefan[1,2], Barta Marek[3,4], Kozánek Milan[4]

[1]Scientica, s.r.o., Hybešova 33, 831 06 Bratislava, [2]Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84 506 Bratislava, e-mail: stefan.florian@savba.sk,
[3]Arboretum Mlynany, Slovak Academy of Sciences, Vieska nad Žitavou 178, 951 52 Slepčany, e-mail: marek.barta@savba.sk,
[4]Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84 506 Bratislava, e-mail: milan.kozanek@savba.sk

Abstract. The regulation of spruce bark beetle *Ips typographus* population by its naturally appearing predator *Beauveria bassiana spp.* showed very hopeful. The low-molecular polyethylene as the polymeric matrix for *B. bassiana spp.* conidia revealed the best attributes for outdoor bio-control applications. *B. bassiana spp.* conidia in homogenous polymeric matrix were applied to *Ips typographus L.* and this suspensions caused first infections in 2 days and death of spruce bark beetles in 11 days of approximately 85% at concentrations 10^7 per ml polymer matrix.

Úvod

Podkôrnik lykožrút smrekový (*Ips typographus*) patrí medzi najvýznamnejších škodcov ihličnatých lesov. Vynikajúce podmienky pre jeho šírenie po veternej kalamite vo Vysokých Tatrách v r. 2004 mali za následok jeho premnoženie, v dôsledku čoho došlo k dramaticky rozsiahlemu usychaniu smrekov v tejto lokalite. Snaha o reguláciu početnosti lykožrúta sa uberala viacerými smermi. Jedným z nich bol vývoj jednoduchých lepových lapačov s prídavkom feromónu, kde sa lykožrút zachytával na platničke, opatrenej lepom o vysokej adhéznej pevnosti. No ako sa ukázalo, lykožrút sa na týchto platničkách dokázal síce veľmi, veľmi pomaly, ale predsa len posúvať, až nakoniec lepovú plochu opustil. Znamená to, že ani tie najpevnejšie lepy nanesené v štandardnej hrúbke okolo 100g/m^2 nie sú schopné trvale lykožrúta zachytiť a pripútať. To je možné iba v dvoch prípadoch – ak je nános lepu nad 700g/m^2 kedy už lep zrejme vniká lykožrútovi pri jeho lezení do dýchacieho ústrojenstva, alebo – a to je zaujímavé – ak je lep nanesený v pásikoch s viac ako 4mm medzerami. Lykožrút sa vie presunúť po lepiacom povrchu až k rozhraniu, tam však zastane, pretože sa nevie svojimi prednými nôžkami zachytiť na hladkom substráte, ktorým je najčastejšie polymérna fólia, a nemôže tak pokračovať v lezení.

Pokrok vo vývoji metód produkcie entomopatogénnych húb, ich stabilizácie, aj ich aplikácie umožnil formuláciu nových biopesticídových produktov na báze entomopatogénnych húb. Tieto preparáty sú z environmentálneho hľadiska podstatne výhodnejšie než stále ešte extenzívne využívané chemické prostriedky, keďže vzhľadom na charakter ich aplikácie a biologickú podstatu nemajú negatívny dopad na životné prostredie.

K regulácii početnosti populácií lykožrúta smrekového sa ukazuje byť najvhodnejšia entomopatogénna huba *Beauveria bassiana*. V najjednoduchšom systéme sa spóry vo forme zmáčateľného púdru aplikujú do feromónových lapačov. Hmyz prilákaný feromónom sa infikuje spórami huby a po jeho úniku z lapača sa stáva ich nositeľom. Spóry na povrchu tela hmyzu vyklíčia, rastúce hýfy preniknú do tela postihnutého jedinca a v priebehu niekoľkých dní ho usmrtia. Aplikácia spór vo forme jemného prášku má však viacero nevýhod a nie je príliš vhodná ani z environmentálneho hľadiska. Vietor postupne roznáša spóry zo zariadenia do okolitého prostredia, čo má negatívny dopad na spoločenstvo hmyzu v okolitej prírode. Navyše dažďová voda, ktorá sa dostáva do aplikačných zariadení výrazne znižuje životaschopnosť spór a tým aj ich účinnosť.
Pre zabezpečenie vysokej efektivity, aj selektivity tejto metódy bolo treba zaistiť dostatočne dlhú životnosť spór *Beauveria bassiana* a ich spoľahlivý prenos na lykožrúta. Imobilizácia spór do vhodnej polymérnej matrice malo prispieť k obidvom týmto cieľom.

Použité metodiky a materiály

K meraniu adhéznych vlastností polymérnych systémov sa použil Dynamometer Instron 4301, doplnený prípravkom k meraniu pevnosti adhézneho spoja v odlupovaní (peel test).

Viskozita polymérnych systémov sa merala na rotačnom viskozimetri metódou Brookfield
Enkapsulácia spór sa robila na zariadení Mini spray – dryer Buechi 190 pri voliteľnom prietoku a teplote.
Pre prípravu adhéznych povrchov boli použité komerčné PSA, aj adhezíva pripravené v laboratóriu na báze kaučukov a oligomérnych tackiefierov. Ako polymérna matrica boli použité nízkomolekulové polyméry o nízkej hodnote Tg.

K enkapsulácii spór *Beauveria bassiana* sa použili vodné roztoky prírodných aj syntetických polymérov (dextrin, škrob, polyvinylpyrolidon, polyvinylalkohol a i), povrchovo aktívnou látkou bol Tween 20. Dispergácia spór v roztokoch sa zabezpečovala pôsobením ultrazvuku po dobu 10 min.

Výsledky a diskusia

Adhézne vlastnosti komerčných PSA lepidiel.

Vzhľadom na plánované primárne využitie týchto lepidiel k odchytu hlodavcov sú ich najvýznamnejšie parametre: Load at tensile strength a Energy at tensile strength, ktoré hovoria akú silu musí živočích vyvinúť, aby sa mohol odpútať od lepidla a koľko energie na to spotrebuje.
Merania boli vykonané na prístroji Dynamometer Instron 4301
posuv hlavice: 10mm/min.
Teplota: 25°C.
Hodnoty uvedené v tabuľke boli získané ako priemer nameraných hodnôt zo štyroch meraní.

	Trapcoll B	Trapcoll A	All Trap	Ratrap
Load at tensile strength (N)	316,64	422,41	381,48	458,59
Energy at tensile strength (mJ)	54,2	62,16	53,21	88,43

Aplikácia spór v polymérnej matrici

Ako polymérna matrica poslúžili nasledovné polyméry: (a) nízkomolekulový polyetylén, (b) polybutén, (c) PVAL Sloviol 88-100, 14% vodný roztok, (d) hydrolyzát kolagénu. Polymérne materiály boli zvolené, alebo upravené tak, aby ich viskozita ležala v rozmedzí 20.000 - 50.000 mPa.s, kedy možno očakávať ich dostatočné ulpievanie na nožičkách a tele lezúceho hmyzu.

Pritom prvé dva materiály (a, b) sú nepolárne a teda hydrofóbne a vykazujú navyše pseudoplasticitu, posledné (c, d) sú polárne. Mohol sa tu teda prejaviť vplyv polarity prostredia na životnosť spór. Z tohto pohľadu sa napokon ukázali byť výhodnejšie hydrofóbne polymérne materiály.

Ako optimálny pre regulované uvoľňovanie spór sa napokon ukázal systém, založený na jedno, alebo dvojzložkovom termoplastickom materiáli, obsahujúcom polymérnu zložku s parametrami rozpustnosti okolo 20 $(J/m^3)^{1/2}$. Tejto, aj viskozitnej požiadavke vyhovuje nízkomolekulový polyetylén o molekulovej hmotnosti 450 – 4000, alebo ataktický polypropylén o molekulovej hmotnosti 550 - 5000 Druhou zložkou môžu byť alkány C11 až C18.
Termicky upravený termoplastický materiál vyššie uvedeného zloženia vytvára spolu s v ňom zapracovanými spórami multikomponentný systém, v ktorom v dôsledku vzájomných interakcií si spóry uchovávajú dlhú životnosť (v chladničke pri 8 °C po 9tich mesiacoch pokles viability na 62 %), na druhej strane parametre polymérneho systému sú zvolené tak, že pri kontakte hmyzu s jeho povrchom dochádza k uchyteniu polyméru na jeho končatinách, prípadne aj ostatnom tele a tak nielen že je tento hmyzí jedinec vystavený účinku patogénnej huby, ale ju môže zavliecť aj medzi iných, dovtedy ešte neinfikovaných príslušníkov svojho druhu.
Veľmi dobré výsledky sa v laboratóriu dosiahli s nízkomolekulovým polyetylénom ako matricou pre konídie *Beauveria bassiana* o koncentrácii 10^7 / ml. Z tohto materálu bol vytvorený film o hrúbke 0,1 mm, cez ktorý museli lykožrúty prejsť. Po dvoch dňoch sa u ních objavili známky infekcie a do 11 dní 85 % jedincov zahynulo.

Enkapsulácia spór *Beauveria bassiana*

Cieľom enkapsulácie spór bolo predĺženie ich virulentnosti, zlepšenie odolnosti voči UV žiareniu a v neposlednom rade zlepšenie manipulácie s nimi. Koncentrácia spór bola 20 mg v 100 ml roztoku. Ph roztokov bolo vždy v rozmedzí 7,0 – 7,5. Prietok počas enkapsulácie bol volený tak, aby pri danej teplote (30 – 50 °C) sa získaval suchý produkt. Pri niektorých experimentoch sa spóry označili pomocou fluorescenčného farbiva (fluoresceín izotiokyanát, FITC), čo umožnilo stanoviť ich distribúciu v polymérnych časticiach.

Veľkosť častíc sa merala pomocou optického mikroskopu a ich morfológia pomocou elektrónového skenovacieho mikroskopu (SEM). Zistilo sa, že častice majú nepravidelný oválny tvar o veľkosti 0,01 – 0,25 mm podľa podmienok ich prípravy, pričom samotné spóry majú rozmer 0,002 mm.

Záver

Lykožrúta smrekového nemožno trvale zachytiť pomocou výkonných polymérnych adhezív, okrem špeciálnych podmienok.

Polymérne adhézne systémy je možné použiť ako matricu pre spóry entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana*. V súčinnosti s feromónovým lapačom sa tak získa efektívny prostriedok k likvidácii lykožrútov.

Spóry môžu byť do polymérnej matrice vmiešavané priamo, alebo pohodlnejšie vo forme kapsulí.
Problém hodnotenia účinnosti likvidácie Lykožrúta smrekového za využitia entomopatogénnej huby *Beauveria bassiana* v teréne spočíva v tom, že k úhynu lykožrútov nedochádza v lapači. Tam sa len zabezpečí ich spoľahlivé infikovanie hubou a následne umožní ich odlet. Infikované jedince sa vrátia do prírody, kde napokon hynú.

Poďakovanie. Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: „Vývoj ekologických metód pre kontrolu populácií vybraných druhov lesných škodcov v zraniteľných vysokohorských oblastiach Slovenska“ (ITMS: 26220220087), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

E.K.K. Fernades, D.E.N. Rangel a i.: Variability in tolerance to UV – B radiation among Beauveria B. spp isolates, J.of Invertebrate Pathology 96 (2007), 237 – 343.

B.F. Huang, M.G. Feng: Comparative Tolerances of Various Beauveria Bassiana Isolates to UV – B Irradiation with a Description of a Modeling Method to Asses Lethal Dose, Mycopathologia (2009), 168, 145 - 162

Shah P. A., Pell J. K.: Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotech., 61(2003), 413-423.