

MICHAŁ HUREJ

**Bakteryjne zanieczyszczenia pożywki w masowej hodowli owadów  
na przykładzie kwieciaka bawełnowca  
(*Anthonomus grandis* Boheman)**

Planując zwalczanie szkodników roślin przy użyciu drapieżców, pasożytów czy „insektycydów biologicznych” (wirusy, bakterie, grzyby), coraz częściej powstaje konieczność prowadzenia masowych hodowli owadów. Według Suskiego (1976) ze względu na przeznaczenie owadów można hodowlę podzielić na dwie zasadnicze grupy:

1. Owady przeznaczone bezpośrednio do wypuszczenia w pole natychmiast po zakończeniu hodowli. Zaliczyć do nich można:

— drapieżce i pasożyty (np. dobroczynek szklarniowy, kruszynki), a także owady wypuszczane w ramach metod genetycznych;

— owady wypuszczane po dokonaniu na nich pewnych zabiegów nie wpływających w istotny sposób na większość funkcji życiowych osobnika (np. sterylizacja promieniami gamma lub za pomocą chemosterylantów);

2. Owady mające służyć za surowiec do dalszej przeróbki w procesie laboratoryjnym lub biologicznym, a mianowicie jako:

— pokarm dla innych owadów drapieżnych lub pasożytów, takich jak np. złotooki, kruszynki;

— substrat do namnażania wirusów lub bakterii chorobotwórczych, które po dalszej obróbce technologicznej użyte zostaną jako „insektycydy biologiczne”.

Ze względu na rodzaj użytego pokarmu hodowlę można podzielić na: 1) prowadzone na pokarmie naturalnym, 2) prowadzone na sztucznych pożywkach.

Prowadząc masową hodowlę dowolnego gatunku owada napotyka się wiele trudności, barier, do których Suski (1976) zalicza barierę fizjologiczną, genetyczną, behawiorystyczną, higieniczną i „techniczno-ekonomiczną”. W artykule zajmę się szerzej barierą higieniczną na przykładzie masowej hodowli kwieciaka bawełnowca.

Kwieciak bawełnowiec (*Anthonomus grandis* Boheman, *Coleoptera*, *Curculionidae*) zaliczany jest do najgroźniejszych szkodników bawełny

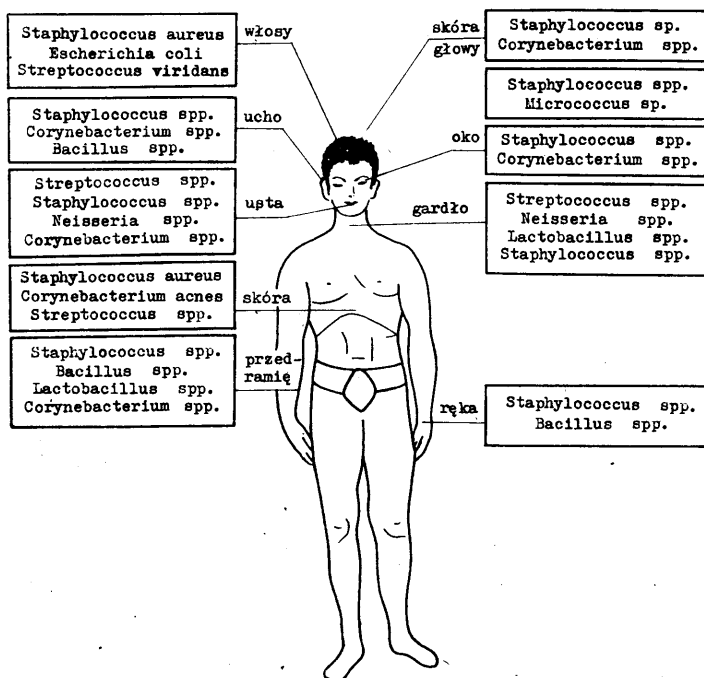
w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. Prawie jedną trzecią używanych w USA chemicznych insektycydów stosuje się przeciwko temu gatunkowi. Straty w plonie i koszty zwalczania przekraczają 200 - 300 milionów dolarów rocznie.

Laboratoryjną hodowlę *A. grandis* na sztucznej pożywce prowadzi się w USA od 1957 r. Masową hodowlę (około 1 miliona owadów tygodniowo) rozpoczęto w 1971 r., kiedy na terenie uniwersytetu stanowego Mississippi zbudowano duże laboratorium przeznaczone do tego celu. Samce po sterylizacji chemicznej lub promieniami gamma wypuszczane są na pola jako konkurenci naturalnych populacji. Kopulując z wypuszczonymi samcami „dzikie” samice składają niezapłodnione jaja, co prowadzi do obniżenia liczebności szkodników.

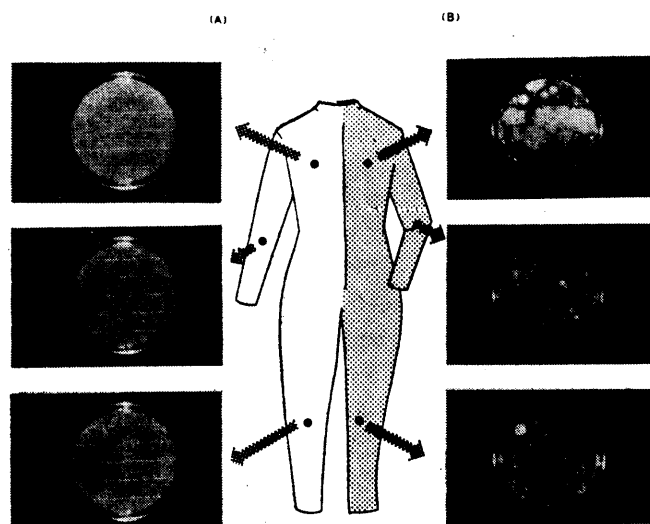
Z wymienionych na wstępie barier, utrudniających masową hodowlę owadów w przypadku kwieciaka bawełnowca, jak dotychczas nie udało się przełamać bariery higienicznej. Mówiąc o niej mamy na uwadze choroby infekcyjne owadów oraz zanieczyszczenia mikrobiologiczne pożywki. W masowej hodowli owadów istnieje duże zagęszczenie osobników tego samego gatunku, wynoszące niekiedy kilka tysięcy sztuk w przeliczeniu na m<sup>3</sup>. Sprzyja to rozwojowi chorób oraz pasożytów. Jednocześnie pożywka *A. grandis* stanowi doskonałe podłoże dla rozwoju niepatogenicznych mikroorganizmów. Biochemiczne zmiany w środowisku powodowane przez te mikroorganizmy wpływają negatywnie na odżywcze wartości pożywki. Niektóre gatunki bakterii i grzybów wytwarzają egzotoksyny, które mogą być trujące dla żerujących na tej pożywce owadów. O ile problem chorób infekcyjnych kwieciaka został skutecznie zlikwidowany, o tyle problem bakteryjnych zanieczyszczeń sztucznego pokarmu nadal istnieje. Straty w ilości wyhodowanych owadów przypisywane bakteryjnym zanieczyszczeniom pożywki wynoszą od 1 - 20% (Childress, Williams 1973). W laboratorium znajdującym się na terenie uniwersytetu Mississippi straty te w przeliczeniu na wartość pieniężną przekraczają 15 000 dolarów rocznie (Sikorowski 1975). Są to straty bezpośrednie, wynikające ze zwiększonej śmiertelności kwieciaka bawełnowca. O wpływie niepatogenicznych bakterii na fizjologię owada będzie mowa w dalszej części artykułu.

#### **Źródła zanieczyszczeń pożywki**

W wyjałowionym pomieszczeniu pierwotnym źródłem mikrobiologicznych zanieczyszczeń są ludzie. Poziom zanieczyszczeń jest wprost proporcjonalny do ilości osób w pomieszczeniu i ich aktywności. Jak podają Smith i Bruch (1969) mężczyzna bez ubrania gimnastykujący



Ryc. 1. Mikroflora człowieka na podstawie danych NASA SP-5076 (wyd. 1969)



Ryc. 2. Wpływ czasu noszenia ubrania na ilość izolowanych bakterii, A — świeżo uprane ubranie; B — ubranie noszone w ciągu 4 godz. (wg Sikorowskiego 1975)

się przez 30 minut rozprzestrzenił w pokoju 2 - 6 milionów mikroorganizmów. Zdrowy człowiek ma ogromne ilości bakterii na skórze, włosach, w ustach, przewodzie pokarmowym, oddechowym i wydalniczym (ryc. 1). Badania Sikorowskiego (1975) wykazały, że świeżo uprane i wysterylizowane ubranie nie stanowi mechanicznej bariery dla przenikania bakterii. Na fotografii (ryc. 2) przedstawiono różnicę w ilości bakterii izolowanych ze świeżo upranej odzieży oraz noszonej jedynie w ciągu 4 godzin.

Bakterie z ciała ludzkiego osiadają na podłodze, wyposażeniu laboratorium, znajdują się w powietrzu, stanowiąc wtórne źródło zanieczyszczeń.

### Flora bakteryjna kwieciaka bawełnowca

Porównanie mikroflory owadów żerujących w warunkach naturalnych z rozmnażającymi się w laboratorium wykazało, że około 75% osobników zebranych z pola miało w przewodzie pokarmowym 100 i mniej bakterii w przeliczeniu na 1 owada (McLaughlin, Sikorowski 1978). Najczęściej izolowanymi bakteriami były *Erwinia herbicola* i *Enterobacter aerogenes*. Tak mała ilość bakterii izolowana z dzikich populacji przypisywana jest antybakteryjnym składnikom zawartym w tkankach rośliny żywicielskiej kwieciaka bawełnowca, takim jak gossypol, kwas galasowy i tanina. Trzeba pamiętać również i o tym, że owady te w warunkach naturalnych występują zwykle pojedynczo i prawdopodobieństwo przeniesienia bakterii z jednego osobnika na drugiego jest znikome.

Ci sami autorzy wykazali, że *A. grandis* hodowany w laboratorium ma o wiele większą ilość bakterii w przewodzie pokarmowym w porównaniu z populacjami dzikimi. Również różnorodność gatunków bakterii jest tu większa. W tabeli 1 przedstawiono bakterie izolowane z hodowanych w laboratorium chrząszczy oraz zdolność wzrostu tych bakterii na sztucznej pożywce przeznaczonej do karmienia dorosłych osobników. Wyniki te wskazują, że izolowane bakterie mogą pochodzić z pożywki, na której kwieciak żerował, dlatego też uważana jest ona za podstawowe źródło niepatogenicznej flory bakteryjnej omawianego gatunku. Jednakże nie jest to jedyne źródło nabywania bakterii, chrząszcze bowiem spijają płyny skraplające się na ściankach naczyń, w których hoduje się owady, a w płynach tych znajduje się również duża ilość mikroorganizmów.

Tabela 1. Bakterie izolowane z hodowanych w laboratorium chrząszczy oraz bakterie rozmnażające się na sztucznej pożywce (wg McLaughlina i Sikorowskiego 1978)

Gatunki bakterii	Wzrost na pożywce (w godz.)		
	24	48	72
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	+
<i>Micrococcus</i> sp.	-	+	+
<i>Escherichia freundii</i>	+	+	+
<i>Achromobacter pestifer</i>	+	+	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+
<i>Corynebacterium humiferum</i>	-	-	+
<i>Flavobacterium rigense</i>	-	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	-	+	+
<i>B. pumilus</i>	+	+	+
<i>Erwinia herbicola</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+

#### Rozwój kwieciaka, wytwarzanie feromonów, kwasów aminowych i tłuszczowych

Wpływ bakteryjnych zanieczyszczeń pożywki na rozwój kwieciaka bawełnowca uzależniony jest od gatunku bakterii, stadium rozwojowego owada, czasu zanieczyszczenia, temperatury i wilgotności. Szybko rosnące bakterie, takie jak *Leuconostoc* spp., często przerastają dużą powierzchnię (do 700 mm<sup>2</sup> w ciągu 24 godz.) i pokrywają wszystkie żerujące na niej stadia rozwojowe. Liczba owadów dorosłych, rozwijających się w przypadku żerowania larw na pożywce wolnej od bakterii, jest często wyższa o 100% w porównaniu z liczbą owadów hodowanych na pożywce zanieczyszczonej. Normalny rozwój *A. grandis* od jaja do owada dorosłego wynosi średnio 13 dni, podczas gdy owady rozmnażające się na pożywce, zanieczyszczonej *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus* spp., mają rozwój przedłużony do 15 dni (Thompson, Sikorowski 1980).

W przypadku kwieciaka bawełnowca feromony płciowe produkowane są przez samce. Stosowano dwie grupy testów dla określenia wpływu bakteryjnych zanieczyszczeń na produkcję feromonów. Zawar-

tość ich mierzona była w odchodach (Gueldner, Sikorowski, Wyatt 1977) oraz w homogenizowanym ciecie chrząszczy (Thompson, Sikorowski 1980). Więcej feromonów izolowano z odchodów i homogenizowanych ciał owadów żerujących na pożywce wolnej od bakterii (tab. 2). W obu przypadkach były to różnice istotne statystycznie. Kwieciek bawełnowiec hodowany w laboratorium, a następnie po sterylizacji używany do biologicznego zwalczania, musi charakteryzować się podobną atrakcyjnością seksualną, jak naturalne populacje. Tymczasem, ze względu na mniejszą ilość produkowanych feromonów przez osobniki hodowane na pożywce zanieczyszczonej bakteriami, owady te przedstawiają mniejszą wartość w biologicznym programie ochrony roślin.

Tabela 2. Wpływ bakteryjnych zanieczyszczeń na produkcję feromonów przez samce kwieciaka bawełnowca (wg Sikorowskiego i Thompsona 1980)

Stan kwieciaka	Liczba użytych owadów	Gatunek bakterii	Liczba bakterii/owada.	Metoda użyta do oznaczenia feromonów	Liczba mg feromonów chrząszcza/dzień
Nie zanieczyszczony	232	nie oznaczone	0-5000	z odchodów	3,51
Zanieczyszczony	271	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Micrococcus varians</i> <i>Enterobacter areogenes</i>	$5 \times 10^4$		0,49
Nie zanieczyszczony	714	nie oznaczone	0-200	homogenizacja ciała	3,22
Zanieczyszczony	1063	nie oznaczone	$5 \times 10^4$		0,13

Według Thompsona i Sikorowskiego (1978) ilość aminokwasów stwierdzanych w ciecie samic i samców *A. grandis* żerujących na pożywce wolnej od bakterii jest większa za wyjątkiem glutaminy i tyrozyny w porównaniu do owadów z pożywek zanieczyszczonych. Średnia redukcja aminokwasów przepisywana bakteryjnym zanieczyszczeniom wynosiła 30% u samców i 52% u samic. Przyczyny wysokiego poziomu tyrozyny i glutaminy u owadów z bakteriami nie udało się autorom tym wyjaśnić. Nie wyjaśniono również, co było przyczyną spadku zawartości aminokwasów u osobników zanieczyszczonych bakteriami: czy konkurencja mikroorganizmów w pobieraniu aminokwasów z pożywki, czy też brak zdolności absorbowania omawianych związków przez ściany komórkowe jelita środkowego, które jest często uszkodzone przez bakterie dostające się w dużych ilościach wraz z pożywką do przewodu pokarmowego kwieciaka.

Badania dotyczące wpływu niepatogenicznych bakterii na przyswajanie lipidów i kwasów tłuszczowych przez *A. grandis* były prowadzone przez Sikorowskiego i in. (1977). Zawartość tłuszczów w ciele owadów przeliczano na kalorie dla trzech poziomów bakteryjnych zanieczyszczeń (tab. 3). Jak wynika z danych przedstawionych w tej tabeli silnie zanieczyszczone owady (5000 i więcej bakterii/chrząszcza) wykazywały

Tabela 3. Wpływ bakteryjnych zanieczyszczeń (*Streptococcus* sp. *Micrococcus varianus* i *Enterobacter aerogenes*) na zawartość kwasów tłuszczowych w ciele samic i samców kwieciaka bawełnowca (wg Thompsona, Sikorowskiego i Wyatta 1977)

Liczba bakterii/chrząszcza	Kalorie <sup>a</sup>		Różnica w procentach	
	♂	♀	♂	♀
0-100 (zdrowe)	1,517	1,564		
1000-5000	1,799	0,644	118,6	42,45
5000 i więcej	0,3709	0,4115	24,4	26,35

a — suma kalorii liczona dla poszczególnych kwasów tłuszczowych.

zmniejszoną o około 76% zawartość kwasów tłuszczowych w porównaniu do osobników zdrowych (0 - 100 bakterii). Ustalenie ilości kalorii zawartych w kwasach tłuszczowych jaja kwieciaka bawełnowca wykazało, że zdrowe samice muszą przeznaczyć 25,1% całkowitej ilości lipidów na dzień na wytwarzanie jaj (siedem jaj dziennie). Obecność niepatogenicznych bakterii w pożywce może zatem powodować istotne zmiany w liczbie składanych jaj.

#### Reakcja kwieciaka bawełnowca na insektycydy

Jak wcześniej przedstawiono, *A. grandis* hodowany na pożywce zanieczyszczonej niepatogenicznymi bakteriami wykazuje ograniczenie czynności fizjologicznych w porównaniu do owadów „zdrowych”. Ciekawa wydaje się reakcja tak osłabionego owada na środki chemiczne ochrony roślin. Hurej i inni (1982) przeprowadzili badania dotyczące śmiertelności kwieciaka bawełnowca hodowanego na pożywce pokrytej koloniami 4 gatunków bakterii, tj. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) Ewing i Fife, *Escherichia coli* (Migula) Castellani i Chalmers, *Leuconostoc* spp. i *Staphylococcus epidermidis* (Winslow i Winslow) Evens, a następnie traktowanych dwoma powszechnie stosowanymi w USA insektycydami, tzn. metyloparationem (insektycyd fosforoorganiczny) i mirexem (chlorowany węglowodór). Okazało się, że owady

żerujące na pożywce z bakteriami i traktowane metyloparationem wykazywały niższą śmiertelność (w wielu przypadkach nawet dwukrotnie) w porównaniu z owadami bez bakterii. Dane te sugerowały, że insektycyd ten może być rozkładany w przewodzie pokarmowym owada i wykorzystywany jako źródło składników pokarmowych. Potwierdzeniem tej hipotezy były dalsze doświadczenia przeprowadzone przez cytowanych autorów, mianowicie wykazano, że *E. agglomerans* i *S. epidermidis* namnażały się szybciej, jeżeli do pożywki dodawano metyloparationu. Wiadomym jest, że insektycyd ten może być rozkładany w glebie (Nauermann 1967) czy w wodzie (Yasuno i in. 1965). Doświadczenia wykazały, że jest to również możliwe w przewodzie pokarmowym owadów.

Odmienne wyniki uzyskano prowadząc doświadczenia nad reakcją kwieciaka na mirex. Najwyższą śmiertelność obserwowano w przypadku zanieczyszczeń pożywki przez *E. agglomerans* i *E. coli*. W porównaniu do kontroli była to śmiertelność wyższa o 100 czy nawet 200%. Chlorowane węglowodory nie są rozkładane przez mikroorganizmy, a mając na uwadze silne osłabienie owadów przez niepatogeniczne bakterie reakcji takiej można było oczekiwać. Jednocześnie chrząszcze żerujące na pożywce pokrytej koloniami *Leuconostoc* spp. i *S. epidermidis* wykazywały niższą od kontroli śmiertelność, w większości przypadków były to różnice statystycznie istotne. Autorom nie udało się wyjaśnić, co było przyczyną tak niskiej śmiertelności w przypadku żerowania kwieciaka na pożywce zanieczyszczonej przez bakterie z rodzajów *Leuconostoc* i *Staphylococcus*.

#### Zabiegi podejmowane w celu ograniczenia bakteryjnych zanieczyszczeń

Dla pokonania bariery higienicznej w masowej hodowli kwieciaka bawełnowca prowadzi się prace w dwóch kierunkach:

1) Dąży się do zahamowania wzrostu bakterii w samej pożywce poprzez dodawanie do niej antybiotyków i innych substancji hamujących rozwój mikroorganizmów. Środki te najczęściej miesza się z sterylnym piaskiem i posypuje się na powierzchnię pożywki. Dzięki tym zabiegom udało się uzyskać w doświadczeniach 86 - 97% chrząszczy, mających w przewodzie pokarmowym mniej niż 500 bakterii na 1 owada. Dla porównania 80% kontrolnych chrząszczy, tj. rozmnażających się na pożywce z dodatkiem jedynie sterylnego piasku, miało o wiele więcej niż 500 bakterii na 1 owada (Sikorowski i in. 1980). Jednocześnie nie stwierdzono ujemnego wpływu antybiotyków na produkcję jaj, rozwój, wy-



lęg chrząszczy i produkcję feromonów kwieciaka bawełnowca. Są to, jak na razie, doświadczenia, których wyniki być może w najbliższym czasie znajdą zastosowanie w masowej hodowli;

2) Dąży się do rygorystycznego przestrzegania higieny w pokojach hodowlanych. Dla przykładu podam zalecenia higieniczne, jakim powinny być poddawane pomieszczenia do przygotowania pożywki, przechowywania jaj i larw oraz pomieszczenia do hodowli dorosłych owadów:

— wszyscy pracownicy pracujący w tych pomieszczeniach powinni przed wejściem wziąć prysznic i założyć czyste ubranie;

— wianienki do dezynfekcji butów powinno się odkażać i ponownie napełniać każdego dnia;

— podłogi powinno się odkażać rano i wieczorem, tj. przed wejściem i po wyjściu pracowników;

— pracownicy, którzy w jakiś sposób stykają się z pożywką, muszą nosić maski na twarzy i czepki przykrywające włosy;

— stoły, inkubatory, podłogi, okna i ściany powinno się odkażać każdego dnia wieczorem;

— pomieszczenie, gdzie znajduje się prysznic i pokój do przebierania, również powinno się odkażać każdego dnia.

Jednocześnie każdy nowo przyjęty pracownik jest szkolony minimum 15 godzin w celu zapoznania go z rolą mikroorganizmów w tego typu laboratorium oraz wpływem odkażania i zachowania czystości na ograniczenie liczby bakterii.

Higiena odgrywa bardzo ważną rolę w masowej hodowli owadów i coraz więcej uwagi powinno się zwracać na to zagadnienie. Owady pochodzące z chowu laboratoryjnego zbyt często nie stanowią bowiem odpowiedniej konkurencji dla osobników „dzikich”, a tym samym nie spełniają ściśle określonego przez człowieka zadania.

#### PIŚMIENNICTWO

- Childress D., Williams P. P. 1973. Control of a bacterial contaminant of boll weevil diet. *J. Econ. Ent.*, 2: 554 - 555.
- Gueldner R. C., Sikorowski P. P., Wyatt J. M. 1977. Bacterial load and pheromone production in the boll weevil *Anthonomus grandis*. *J. Invertebr. Path.*, 29: 397 - 398.
- Hurej M., Sikorowski P. P., Chambers H. W. 1982. Effects of bacterial contamination on insecticide — treated boll weevils (*Coleoptera: Curculionidae*). *J. Econ. Ent.*, 4: 651 - 654.
- McLaughlin R. E., Sikorowski P. P. 1978. Observations of boll weevil midgut when fed natural food or on bacterially contaminated artificial diet. *J. Invertebr. Path.*, 32: 64 - 70.

- Naumann K., 1967. Über den Parathionabdan durch bodenbakterien. Phytopathologische Z., 60: 343 - 357.
- NSA SP-5076 1969. Contamination Control Handbook (Office of Technology Utilization, National Aeronautics and, Space Administration, Washington); pp. VI, 1 - 15.
- Sikorowski P. P. 1975. Microbial monitoring in the boll weevil rearing facility. Technical Bulletin, 17.
- Sikorowski P. P., Thompson A. C., Wyatt J. M. 1977. The effect of bacterial load on fatty acids in the boll weevil *Anthonomus grandis*. J. Invertebr. Path., 30: 274 - 275.
- Sikorowski P. P., Kent A. D., Lindig O. H., Roberson J., Wiygul G., 1980. Laboratory and insectary studies on the use of antibiotics and antimicrobial agents in mass — rearing of boll weevil. J. Econ. Ent., 1: 106 - 111.
- Smith F. W., Bruch M. 1969. Devs ind Microbiol., 10: 290.
- Suski Z. 1976. Praktyczne aspekty masowej hodowli owadów. Ochrona Roślin, 2: 12 - 13.
- Thompson A. C., Sikorowski P. P. 1978. The effect of bacterial load amino acids in the boll weevil, *Anthonomus grandis*. J. Invertebr. Path., 32: 388 - 389.
- Thompson A. C., Sikorowski P. P. 1980. Effect of internal bacterial contaminants on mass reared boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman). Technical Bulletin, 103.
- Yasuno M., Hirakso S., Sasa M., Uchida M. 1965. Inactivation of some organophosphorus insecticides by bacteria in polluted water. Jap. J. Exp. Med., 35: 545 - 563.

Katedra Entomologii Rolniczej AR  
ul. Cybulskiego 20, 50-205 Wrocław