

KAZIMIERZ ŻUKOWSKI

BADANIE LABORATORYJNE EFEKTYWNOŚCI
NOWYCH PREPARATÓW BIOLOGICZNYCH W REDUKCJI LICZEBNOŚCI
PRUSAKÓW (*BLATTELLA GERMANICA L.*)

TESTING OF THE EFFECTIVENESS
OF THE NEW BIOINSECTICIDES PROPOSED AS REDUCTANTS
OF THE POPULATION OF COCKROACHES (*BLATTELLA GERMANICA L.*)

Z Zakładu Zwalczania Skazań Biologicznych Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
p.o. Kierownik: dr H. Krzywicka

Zbadano efektywność handlowych biopreparatów owadobójczych z B. thuringiensis (Biobit, Novo Skeetal, Novodor) w redukcji liczebności prusaków (Blattella germanica L.).

Z preparatów biologicznych, służących do zwalczania owadów szkodliwych, szczególnie ważną rolę spełniają różne odmiany bakterii *Bacillus thuringiensis*, których toksyczność uwarunkowana jest możliwością wytwarzania proteinowych kryształów w komórkach towarzyszących procesowi sporulacji, a także z proteinami zawartymi w sporach. Sposób ich formowania zależy od podgatunku drobnoustroju. Są one nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczają się natomiast w środowisku alkalicznym, np. w przewodzie pokarmowym owadów, gdzie poprzez działanie proteolitycznych enzymów przyjmują postać endotoksyny. Wytworzone kryształy mają różny kształt i wielkość, a proteiny w nich zawarte są zróżnicowane pod względem biochemicznym i właściwości toksycznych. Odmiany podgatunku *B. thuringiensis var. kurstaki* mają dwa typy kryształów (bipiramidalny i owoidalny), o zróżnicowanych właściwościach antygenowych i toksyczności w stosunku do owadów. U podgatunku *B. thuringiensis var. israelensis* (serotyp 14) kryształy mogą być sześciennie bipiramidalne, owoidalne do bezkształtnych. Rozpuszczenie ich zależy od określonego pH przewodu pokarmowego danego gatunku owada. Natomiast podgatunek *B. thuringiensis var. tenebrionis* (syn. *san diego*) ma kryształy prostokątne lub kwadratowe, podobne do kryształów występujących u innych podgatunków. Nie wszystkie też kryształy mają proteiny będące protoksynami. Jako przykład mogą posłużyć kryształy wytwarzane przez *B. thuringiensis var. darmstadiensis*, które nie są toksyczne dla Lepidoptera i Diptera, chociaż kryształy innych izolatów tego podgatunku mogą być toksyczne dla przedstawicieli obu tych rzędów.

Biorąc pod uwagę różny kształt i wielkość proteinowych kryształów wytwarzanych przez różne podgatunki *B. thuringiensis*, a przede wszystkim ich zróżnicowanie pod względem biochemicznym i właściwości toksycznych w stosunku do owadów, postanowiono określić wpływ tych bakterii na prusaki (*Blattella germanica L.*) oraz ocenić możliwość ich wykorzystania do zwalczania tych, tak bardzo uciążliwych dla człowieka owadów.

MATERIAŁ I METODYKA

W badaniach uwzględniono prusaki (*Blattella germanica* L.) oraz trzy podgatunki bakterii *Bacillus thuringiensis*.

Owady: doświadczenia prowadzono tylko na pruskach dojrzałych, zróżnicowanych pod względem wieku i płci, pochodzących z hodowli laboratoryjnej, utrzymywanej w Państwowym Zakładzie Higieny.

Preparaty: wykorzystano trzy biopreparaty handlowe – 1) Biobit, zawierający spory z kryształami *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (B.th.k); 2) Novo Skeetal – z kryształami *B. thuringiensis* var. *israelensis* (B.th.i) oraz 3) Novodor – zawierający kryształy *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (B.th.t). Wszystkie są preparatami o działaniu żołądkowym, o zawartości 2,0% substancji biologicznie czynnej w preparacie podstawowym.

Metodyka:

Doświadczenia prowadzono w litrowych słojach Wecka, w temperaturze pokojowej. Owadom doświadczalnym, oprócz wody do picia, podawano rozdrobniony pokarm (mieszanka LSK używana do karmienia zwierząt laboratoryjnych),* wymieszany z zawartością 5,0; 2,0 i 1,0% preparatów podstawowych. Dla każdej kombinacji stosowano 3 powtórzenia – po 15 okazów (samic i samców) *B. germanica* w każdym powtórzeniu. Ogółem grupa doświadczalna zawierała 270, a kontrolna 90 okazów.

Prusakom kontrolnym, oprócz pokarmu, podawano też wodę do picia.

WYNIKI

Badania laboratoryjne wykazały, że działanie owadobójczych biopreparatów handlowych (Novodor, Novo Skeetal i Biobit) z *B. thuringiensis* na prusaki (*B. germanica* L.) jest zróżnicowane. Różnice w efektywności ich działania zaznaczyły się w zależności od typu preparatu, jego zawartości w podawanym prusakom pokarmie oraz w zależności od płci tych owadów (Tab. I). Z wymienionych preparatów, nieznacznie wyższą aktywność w redukcji liczebności prusaków wykazał Biobit, zawierający kryształy B.th.k. Jego wyższą efektywność w stosunku do pozostałych preparatów (Novo Skeetal, Novodor) zaobserwowano we wszystkich badanych stężeniach (Tab. 1). Przy zawartości 1,0% preparatu podstawowego w pokarmie, po 30 dniach doświadczenia padło 14,0% samic i 15,0% samców, a z preparatami Novo Skeetal i Novodor, zawierającymi B.th. i oraz B.th.t, padło odpowiednio: 7,0 i 5,0% samic oraz 9,0 i 7,0% samców. Natomiast podczas żerowania prusaków na pokarmie zawierającym 5,0% preparatu podstawowego Biobit, otrzymano 18,0% padłych samic i 23,0% samców, gdy z preparatem Novodor tylko 11,0% samic i 13,0% samców, przy czym w grupie kontrolnej padło w tym czasie 2,1%. Z porównania przytoczonych tu danych wynika, że efektywność biopreparatu Novodor w stosunku do preparatu Biobit jest prawie dwukrotnie niższa. Preparat natomiast Novo Skeetal dał wynik pośredni, a redukcja liczebności prusaków była tu niższa jak w przypadku preparatu Biobit, ale wyższa, jaką uzyskano stosując preparat Novodor, który okazał się najmniej skuteczny, gdyż dał on najniższy odsetek padłych prusaków. Z tabeli I wynika również, że samce prusaków są bardziej wrażliwe na działanie badanych biopreparatów niż samice.

* Skład mieszanki podano w pracy opublikowanej w Rocznikach PZH, 1993, 2–3, 228.

Tabela I. Efektywność biopreparatów z *B.thuringiensis* w redukcji liczebności prusaków (*Blattella germanica* L.)

Effectiveness of proinsecticides *B.thuringiensis* as reductans of the population cockroaches

Zawartość preparatu wyjściowego w pokarmie	Płeć	Procent padłych owadów po 30-tu dniach trwania doświadczenia			
		Biobit (B.th.k)	Novo Skeetal (B.th.i)	Novodor (B.th.t)	Kontrola
1,0%	♀♀	14,0	7,0	5,0	
	♂♂	15,0	9,0	7,0	
2,0%	♀♀	16,0	9,0	7,0	2,1
	♂♂	20,0	11,0	9,0	
5,0%	♀♀	18,0	13,0	11,0	
	♂♂	23,0	18,0	13,0	

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

B. thuringiensis jest typowym insektycydem mikrobiologicznym, a jego podgatunki wykorzystywane są do produkcji biopreparatów handlowych, służących do zwalczania owadów z różnych grup systematycznych. Owadobójcze właściwości tych drobnoustrojów związane są z możliwością wytwarzania w czasie sporulacji proteinyowych kryształów, toksycznych dla owadów o odpowiednio alkalicznym pH zawartości przewodu pokarmowego.

Aktywacja kryształów poprzez rozpuszczenie ich, prowadzi do wytworzenia toksycznych protein. Heimpel i Angus [6] dzielą owady wrażliwe na *B. thuringiensis* na trzy grupy:

1) Owady, u których dochodzi do śmiertelnego porażenia przez ogólny paraliż spowodowany działaniem delta – endotoksyny, np. u *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi*, czy larw komarów [1]. 2) Owady, u których po przyjęciu kryształów następuje paraliż przewodu pokarmowego, ale nie rozwija się paraliż ogólny (tak jest u wielu gatunków *Lepidoptera*) oraz 3) Owady, u których nie rozwija się ogólny paraliż, nie giną one po pobraniu kryształów i wymagają obecności spor. Do grupy tej należą *Anagasta kuehniella* [6] i *Galleria mellonella* [3]. *Nishiitsutsuji-Uwo* i Endo [13] mówią, że spory wyraźnie zwiększają letalny efekt. Prusaki ze względu na objawy związane z żerowaniem ich na pokarmie wymieszanym z preparatami zawierającymi *B. thuringiensis*, zaliczyć należy do trzeciej z wymienionych grup. Nie dochodzi u nich do ogólnego paraliżu i nie giną one w odpowiednio krótkim czasie po pobraniu pokarmu skażonego tymi bakteriami, jak to ma miejsce u owadów wrażliwych na te bakterie, np. u *Lepidoptera*. Mimo to pod wpływem delta-endotoksyny i prawdopodobnie rozwoju form wegetatywnych w przewodzie pokarmowym, dochodzi u nich do zatrucia. U samic rozwój kokonów jest powolny, często zatrzymany i nie dochodzi do rozwoju w nich zarodków – samice noszą tak zwane suche kokony, bez rozwijających się w nich zarodków. U form doświadczalnych obserwuje się również wydalanie uwodnionego kału, niechęć do żerowania oraz redukcję (choć powolną) ich liczebności [16]. Po trzydziestu dniach doświadczenia, najwyższy odsetek padłych prusaków (18,0% samic i 23,0% samców) uzyskano z preparatem

Biobit, zawierającym spory z kryształami B.th.k. Jego wyższa aktywność w stosunku do dwóch pozostałych preparatów (B.th. i oraz B.th.t – zawierających tylko proteinyowe kryształy), może wynikać z obecności spor i rozwoju ich u tych owadów. Niektóre gatunki owadów, np. *E. kuehniella* czy *Ostrinia nubilalis*, wykazują objawy zatrucia tylko po równoczesnym zjedzeniu kryształów i spor (6, 2, 14), a spory czy kryształy zjedzone osobno, nigdy nie dają wyraźnej letalnej reakcji. I przeciwnie, przyjęcie kompleksu spora – kryształ zatrzymuje żerowanie tak, jak w przypadku aktywnie działających toksyn powstałych z enzymatycznie hydrolizowanych kryształów [15]. Są również gatunki owadów, u których do zatrucia nie dochodzi mimo, że pH przewodu pokarmowego jest alkaliczne, np. u *Agrotis ipsilon* czy *A.(Euxoa) segetum*, i kryształy rozpuszczają się w medium wypełniającym przewód, albo mimo wysokiego pH, np. u *Lycophotia saucia*, czy *Mamestra brassicae*, nie dochodzi do ich rozpuszczania się. Może to sugerować, że w akcji działania pH w rozpuszczaniu kryształów i w manifestacji ich toksyczności odgrywają rolę także i inne czynniki. *Lacadet* i *Dedonder* [7, 8] podają, że u *P. brassicae* i *B. mori* występuje swoisty system enzymatyczny z selektywną aktywnością proteolityczną w alkalicznym środowisku.

To proteazy [10] hydrolizują kryształy i uwalniają rozpuszczając poszczególne substancje [4, 9]. Potwierdzili to *Faust* i *inni* [5]. Nie naruszone kryształy działają tylko *per os*, gdy produkty enzymatycznej hydrolizy kryształów są także toksyczne po podaniu ich do jamy ciała, ale obie te metody dają te same efekty [12, 11] i to nie tylko u *P. brassicae* i *B. mori*, lecz także u innych owadów, np. u *E. kuehniella* [11], gatunku normalnie niewrażliwego na działanie kryształów nienaruszonych [6]. W ten sposób enzymy owadów mogą zmieniać protoksyny kryształów w aktywne, prawdziwe toksyny. Natomiast zróżnicowanie wrażliwości różnych gatunków owadów na kryształy związane by było ze specyficznością proteaz występujących w ich przewodach pokarmowych, które kontrolują hydrolizę kryształów w warunkach *in vivo*.

Z badań przeprowadzonych z prusakami i biopreparatami handlowymi z *B. thuringiensis* (Biobit, Novo Skeetal i Novodor) wynika, że tylko pierwszy z nich może być brany pod uwagę w zwalczaniu prusaków. Natomiast niski odsetek padłych prusaków żerujących na pokarmie z biopreparatami Novodor i Novo Skeetal wynika prawdopodobnie z małej wrażliwości tych owadów na zawarte w preparatach kryształy i specyficzności proteaz występujących w przewodzie pokarmowym, które kontrolują hydrolizę kryształów oraz z odpowiedniego pH zawartości przewodu, gdzie procesy te zachodzą.

K. Żukowski

TESTING OF THE EFFECTIVENESS
OF THE NEW BIOINSECTICIDES PROPOSED AS REDUCTANTS
OF THE POPULATION OF COCKROACHES (*BLATTELLA GERMANICA* L.)

Summary

The usefulness of new commercial products of biological origin (Biobit, Novo Skeetal and Novodor) was tested in cockroaches (*Blattella germanica* L.) control. Biobit proved to be the most effective in reduction of cockroaches population. Its higher activity against cockroaches was observed in all concentrations tested. Females were more sensitive for all tested products than males.

PIŚMIENNICTWO

1. Barjac H.: Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les Moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotyp 14. C.R. Acad.Sci., Paris, Ser. D., 1978, 286, 797.
– 2. Burgerjon A., Yamvriat C.: Titrage biologique des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis à vis de *Anagasta kühniella* Zell. C.R.Acad.Sci., Paris, 1959, 249, 2871. – 3. Burges H.D., Thomson E.M., Latchford R.A.: Importance of spores and delta-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Path., 1976, 27, 87. – 4. Dedonder R., Lecadet M.M.: Etude des Enzymes proteolitiques conteriuis dans le chyle de *Pieris brassicae* et actifs sur le cristal des *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga Mém. hors Ser. 2., 1964, 197. – 5. Faust R.M., Adams J.R., Heimpel A.M.: Dissolution of the Toxic parasporal Crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *pacificus* by the Gut Secretions of the Silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Path., 1967, 9, 488.
– 6. Heimpel A.M., Angus T.A.: The site of action of cristalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Pathol., 1959, 1, 152. – 7. Lecadet M.M., Dedonder R.: Les proteases de *Pieris brassicae*. I. Purification et proprietes. Bull. Soc. Chim.biol., 1966, 48, 631. – 8. Lecadet M.M., Dedonder R.: Les proteases de *Pieris brassicae*. II. Specificite. Bull. Soc. Chim. biol., 1966, 48, 661. – 9. Lecadet M.M., Dedonder R.: Enzymatic Hydrolisis of the Crystals of *Bacillus thuringiensis* by the Proteases of *Pieris brassicae*. I. Preparation and Fractionation of the Lysates. J. Invertebr. Path., 1967, 9, 310.
– 10. Lecadet M.M., Martouret D.: The enzymic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the Chyle of *Pieris brassicae* (L.). J. Invertebr. Path., 1965, 7, 105.

11. Lecadet M.M., Martouret D.: Enzymatic Hydrolisis of the Crystals of *Bacillus thuringiensis* by the Proteases of *Pieris brassicae*. II. Toxicity of the Different Fractions of the Hydrolysate for Larvae of *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Path. 1967, 9, 322. – 12. Martouret D.: Intoxication chez *Pieris brassicae* L.par une raction enzymatique de la toxine des cristaux des souches *Bacillus thuringiensis* serotype I Berliner et *Bacillus thuringiensis* serotype III Anduze. Entomophaga Mém. hors Ser. 2, 1964, p. 213. – 13. Nishiitsutsuji-Uwo, Endo Y.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Relative role of spores and crystals in toxicity to *Pieris*, *Lymantria* and *Ephestia* larvae. Appl. Entomol. Zool. 1980, 15, 416. – 14. Raun E.S., Sutter G.R., Revello M.A.: Ecological Factors Affecting the Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to the European Corn Borer and Fall Armyworm. J. Invertebr. Path. 1966, 8, 365. – 15. Yamvriat C.: Contribution à l'etude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine *Anagasta* (*Ephestia*) *kühniella* Zeller (Lepidoptere). Entomophaga, 1962, 7, 101. – 16. Żukowski K.: Badania efektywności wybranych biopreparatów owadobójczych w redukcji liczebności prusaków (*Blattella germanica* L.). Roczn. PZH, 1994, 45, 1–2, 1.

Dn. 1994.12.14

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24