

ALICJA KRZEMIŃSKA<sup>1</sup>, JOANNA MICHALIK<sup>2</sup>, BOŻENA SAWICKA<sup>1</sup>

BADANIA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA BAKULOWIRUSÓW  
DO ZWALCZANIA OWADÓW SZKODNIKÓW SANITARNYCH

THE STUDY ON THE POSSIBILITY OF USING THE BACULOVIRUSES  
TO CONTROL INSECTS OF SANITARY PESTS

<sup>1</sup> Zakład Zwalczania Skażeń Biologicznych

Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

Kierownik Zakładu: dr A. Gliniewicz

<sup>2</sup> Instytut Biochemii i Biofizyki

Polska Akademia Nauk  
02-106 Warszawa, ul. Pawińskiego 5a

*Zbadano możliwości wykorzystania bakulowirusów do zwalczania niektórych uciążliwych szkodników sanitarnych spośród owadów.*

WSTĘP

Występujące często w dużych populacjach w szpitalach, w zakładach produkujących i magazynujących żywność, w obiektach handlowych prusaki i karaluchy, mrówki faraona i muchy, a także nalatujące do pomieszczeń owady krwiopijne, niebezpieczne jako przenosiciele patogennych mikroorganizmów są nie tylko uciążliwe ale i trudne w zwalczaniu. Niektóre z tych owadów np. karaczany wykazują działanie alergizujące [5]. Inne, jak komary czy meszki mogą powodować uczulenia i dermatozy. Stąd w różnych krajach, również w Polsce, prowadzone są badania nad metodami zwalczania szkodników sanitarnych oraz nowymi preparatami biologicznymi i chemicznymi. Środki chemiczne są często toksyczne i niebezpieczne dla środowiska. Z biologicznych znane są i szeroko stosowane przeciwko larwom komarów preparaty zawierające bakterie *Bacillus thuringiensis*.

Bakulowirusy są naturalnymi patogenami różnych gatunków owadów. Ich zaletą jest wysoka specyficzność [4]. Dzięki temu są bezpieczne dla innych zwierząt, w tym ssaków. Wydawało się celowe zbadanie bakulowirusów w aspekcie możliwości ich wykorzystania do zwalczania niektórych uciążliwych szkodników sanitarnych spośród owadów [1].

Bakulowirus AcMNPV jest jednym z najlepiej zbadanych, o szerokim (ponad 50 gatunków) kręgu gospodarzy [2]. Niektóre rekombinanty bakulowirusa o podwyższonej wirulencji stosowane są jako bioinsektycydy [3, 6]. Jego rekombinant SPX zawiera gen toksyny peptydowej, zbudowanej z 25 reszt aminokwasów [7]. Jest on naturalną toksyną, wytwarzaną przez mrówkę *Panaponera clavata*. Wiadomo, że toksyna ta działa paraliżująco na układ nerwowy owadów blokując kanały sodowe.

Pośród znanych bakulowirusów, bakulowirus *Autographa* wydawał się być najlepszym kandydatem do testowania na wywołanie wirozy u badanych szkodliwych owadów ze względu na najszerszy i wciąż się powiększający krąg gospodarzy.

Zakażenie owadów wirusem odbywa się drogą pokarmowa. Cząstki genomowego DNA wnikają poprzez komórki epitelialne wyścielające jelito środkowe owada do jąder komórkowych i tam replikują się wielokrotnie, wykorzystując materiał odżywczy komórek gospodarza. Na etapie rozległej infekcji wirus rozwija się masowo we wszystkich praktycznie tkankach owada, wywołując efekt letalny w ciągu 7–8 dni, a w przypadku bardziej zjadliwych rekombinantów 6–7 dni. Warto podkreślić jest również, że bakulowirus charakteryzuje się wysoką specyficnością i w związku z tym jest bezpieczny dla bezkręgowców nie należących do kręgu jego gospodarzy, a także dla kregowców w tym człowieka.

W Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk przygotowano rozcieńczenia bakmidu, zawierającego genomowe DNA bv lub jego rekombinanta SPX w komórkach bakterii *Escherichia coli*.

W Zakładzie Zwalczenia Skażeń Biologicznych Państwowego Zakładu Higieny określono aktywność biologiczną bakulowirusa AcMNPV oraz jego rekombinanta SPX w stosunku do trzech gatunków owadów: prusaków *Blattella germanica* L., much domowych *Musca domestica* L. i mrówek faraona *Monomorium pharaonis* L.

## MATERIAŁ I METODY

### Bakulowirusy

Przygotowane rozcieńczenia bakmidu dla prusaków i mrówek faraona miały stężenia:  $2 \times 10^7$  pfu/ml, a dla much domowych  $1 \times 10^6$  pfu/ml.

### Owady testowe

Badania aktywności bakulowirusa prowadzono na trzech gatunkach owadów: musze domowej *Musca domestica* L., prusaku *Blattella germanica* L. oraz mrówce faraona *Monomorium pharaonis* L.

W przypadku muchy domowej do doświadczeń użyto jaj much (drugie złożo), a w przypadku prusaków larw w I stadium rozwoju w wieku do 8 dni.

Eksperymentalne kolonie mrówek faraona składały się z 2 samic, 30 poczwerek i 70 robotnic.

Owady trzymano w temp.  $25 \pm 1$  °C oraz wilgotności względnej  $70 \pm 5\%$ .

### Badania na musze domowej

Do zlewki o pojemności 150 ml wkładano ok. 120 ml pożywki stosowanej jako podłoże rozwojowe (pożywka LSM zmieszana z wodą i drożdżami) dla larw muchy domowej. Na wierzchu pożywki umieszczono skrawek tkaniny o wymiarze  $2 \times 2$  cm, na którym znajdowało się 200 jaj. Nanoszono 0,5 ml bakulowirusa bezpośrednio na jaja much. Tak przygotowane zlewki z jajami nakrywano papierem perforowanym i trzymano w cieplarni o temp 25 °C i wilgotności  $75 \pm 5\%$ . Oceniano wylęgi larw po 24 i 48 godzinach. Larwy po wylęgu przechodziły do podłoża rozwojowego. Określano liczebność poczwerek a następnie form imaginalnych. Jednocześnie prowadzono próby kontrolne wylęgu larw z jaj złożonych na sukienkach zwilżonych czystą wodą oraz obserwowano dalszy rozwój much.

Badania wykonano w 4 powtórzeniach na owadach poddanych działaniu bakulowirusów, w 3 powtórzeniach na owadach kontrolnych.

### Badania na mrówce faraona

Kolonie mrówek faraona traktowano bakulowirusem, który owady otrzymywały zamiast wody do picia w stężeniu  $2 \times 10^7$  pfu/ml przez 5 tygodni w porcjach wymienianych co 7 dni. Oprócz tego mrówki otrzymywały pokarm stały w postaci gotowanego rozdrobnionego żółtka. W koloniach kontrolnych

mrówkom podawano czystą wodę. Badania wykonano w 3 powtórzeniach. Obserwowano rozwój owadów w koloniach mrówek.

### Badania na prusakach

W badaniach eksponowano po 50 sztuk larw w 1 stadium rozwoju. Owady otrzymywały bakulowirusy w miejsce wody do picia w stężeniu  $2 \times 10^7$  pfu/ml. Czas ekspozycji był różny dla kilku grup owadów: grupa I – ekspozycja 8 tygodni, grupa II – 6 tygodni, grupa III – 4 tygodnie, grupa IV – 2 tygodnie. Po ekspozycji owadom podawano czystą wodę do picia. Jako pokarm owady otrzymywały suchą karmę dla kotów „Kitekatę”

We wszystkich grupach traktowanych owadów oraz w grupie kontrolnej obserwowano: śmiertelność larw, czas rozwoju owadów, liczebność imagines, zdolność samic do formowania kokonów oraz wylęgi larw. Liczba owadów zakażonych wirusem wynosiła 200, kontrolnych 150.

### WYNIKI

W doświadczeniu na prusakach obserwowano wzrost śmiertelności larw traktowanych bakulowirusem przy różnych czasach ekspozycji, zwłaszcza przy ekspozycji 8 tygodniowej (tab. I). Procent owadów dojrzałych przy ekspozycji 8 i 6 tygodniowej obniżył się wydatnie, co było związane ze zwiększoną śmiertelnością larw. Czas rozwoju prusaków zakażonych wirusem był podobny jak w kontroli z wyjątkiem grupy I, w której owady osiągnęły dojrzałość szybciej (35–53 dni) niż w kontroli (po 42–60 dniach).

Tabela I. Wpływ bakulowirusa AcMNPV na rozwój karaczana prusaka *Blattella germanica* L.  
The effect of baculovirus AcMNPV on development cockroaches *Blattella germanica* L.

Obserwacje	Czas podawania bakulowirusów – ekspozycja				Kontrola (średnie z 3 powtórzeń)
	8 tygodni	6 tygodni	4 tygodnie	2 tygodnie	
Procent śmiertelności podczas rozwoju	62	50	36	50	36
Czas od rozpoczęcia ekspozycji do osiągnięcia stadium imaginalnego	35–53 dni	42–60 dni	42–53 dni	42–60 dni	42–60 dni
Procent owadów dojrzałych w tym:					
– samce	382	421	643	482	573
– samice	216	824	232	424	324

Reprodukcja u samic w grupie I była całkowicie zahamowana (tab. II). Samice uformowały tylko 3 kokony, z których nie było wylęgów. W innych grupach owadów traktowanych bakulowirusami podczas rozwoju larwalnego wylęgi larw były dwukrotnie lub prawie dwukrotnie mniejsze niż w kontroli. U niektórych dojrzałych owadów z grupy I, poddanych działaniu bakulowirusów przez 8 tygodni, ujawniły się deformacje skrzydeł oraz odnóży. Zniekształcony był także kokon formowany przez samicę (ryc. 1 i 2). Jak wynika z przeprowadzonych badań traktowanie prusaków bakulowirusem może powodować obniżenie liczebności populacji poprzez zwiększenie śmiertelności podczas rozwoju larwalnego oraz oddziaływanie na zdolność rozrodczą owadów.

W stosunku do muchy domowej przy ekspozycji jaj bakulowirus okazał się nieaktywny (tab. III). Wylot form imaginalnych wynosił w grupie much pod wpływem bakulowirusa –

Tabela II. Wpływ bakulowirusa AcMNPV na zdolność rozrodczą karaczana prusaka *Blattella germanica* L.  
The effect of baculovirus AcMNPV on reproduction potential cocroaches *Blattella germanica* L.

Obserwacje	Czas podawania bakulowirusów – ekspozycja				Kontrola
	8 tygodni	6 tygodni	4 tygodnie	2 tygodnie	
Liczba samic	8	12	16	12	12
Liczba kokonów	3	10	15	12	12
Liczba larw	–	181	347	205	371
Liczba larw na kokon	–	18,1	23,1	17,08	30,9
Liczba larw na samice	–	15,08	21,7	17,08	30,9



Ryc. 1. Karaczany prusaki – owady kontrolne  
Cockroaches – control insects



Ryc. 2. Karaczany prusaki traktowane bakulowirusem w 1 stadium rozwoju larwalnego  
Cockroaches were treated baculoviruses AcMNPV in first stage of larval development

Table III. Rozwoju muchy domowej *Musca domestica* L. poddanej działaniu bakulowirusa AcMNPV w stadium jaj  
Effects of some baculovirus AcMNPV, applied to eggs on the house – fly development

Obscr- wacje  Powtó- rzenia	Owady eksponowane						Owady kontrolne			
	Liczba jaj	Procent wylęgu larw		Procent poczwarek	Procent wylotu imagines	Liczba jaj	Procent wylęgu larw		Procent poczwarek	Procent wylotu imagines
		po 24 godzinach	po 48 godzinach				po 24 godzinach	po 48 godzinach		
1	200	96,5	96,5	50,5	45,5	200	98,5	98,5	65,0	60,5
2	200	95,0	95,5	62,0	59,0	200	91,0	94,0	70,5	63,0
3	200	99,0	99,0	56,0	53,5	200	97,5	97,5	47,0	45,5
4	200	99,0	99,0	65,0	60,0	-	-	-	-	-
średnia z powtórzeń	-	97,4	97,5	58,4	54,5	-	95,6	96,6	60,8	56,3

54,5% a w grupie owadów kontrolnych – 56,3%. Rozwój larwalny był opóźniony o 1–2 dni. Nie obserwowano deformacji morfologicznych u dorosłych owadów. Obserwacje rozwoju owadów w pokoleniu F<sub>1</sub> traktowanych bakulowirusem, nie wykazały różnic w stosunku do kontroli. Średni procent wylotu imagines wynosił 77% a w kontroli 82%. Być może, przyczyną negatywnych wyników jest krótki cykl rozwojowy muchy domowej, który uniemożliwia namnażanie się odpowiedniej ilości wirusa w organizmie owada, zwłaszcza przy stosowaniu niższych stężeń bakulowirusa.

Bakulowirus okazał się również nieaktywny w stosunku do mrówek faraona. Rozwój kolonii zarażonych bakulowirusem i kontrolnych przebiegała podobnie.

Otrzymane wyniki, wpływu bakulowirusa AcMNPV na trzy gatunki owadów – szkodników sanitarnych, wykazały zaburzenia w rozwoju jedynie w przypadku karaczanów *Blattella germanica* L. Pozostałe gatunki były nie wrażliwe na stosowany biopreparat.

#### WNIOSKI

1. Bakulowirus AcMNPV stosowany w stężeniu  $2 \times 10^7$  pfu/ml powodował wzrost śmiertelności larw prusaków w I stadium rozwoju i ograniczał rozrodczość samic w badanej populacji.
2. W warunkach przeprowadzonych badań bakulowirus AcMNPV okazał się nieefektywny w stosunku do muchy domowej i mrówki faraona.

A. Krzemińska, J. Michalik, B. Sawicka

#### THE STUDY ON THE POSSIBILITY OF USING THE BACULOVIRUSES TO CONTROL INSECTS OF SANITARY PESTS

##### Summary

The biological activity of baculovirus AcMNPV and its recombinant SPX were determined on cockroaches *Blattella germanica*, pharaoh's ants *Monomorium pharaonis* and flies *Musca domestica* – species very difficult to eradication. Baculovirus AcMNPV is one of the best known viruses of wide host range. Its recombinant SPX contained the gen for natural toxin. It is known that this toxins paralyse nervous system of insects by blocking sodium channels.

The studies on the influences of baculoviruses showed in the case of cockroaches *Blattella germanica* L. the disturbances of development. The result of using high concentration baculoviruses SPX  $2 \times 10^7$  pfu/ml for a long time of exposition 8 weeks it was.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Altstein M., Aharonson N., Menn J.J. Overview: New Targets for Insect Management. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1993, 22, 5–12.
2. Ayres M.D., Howard S.C., Kuzio J. et al.: The complete DNA sequence of *Autographa californica*. Virology 1994, 202, 586–605.
3. Bonning B.C., Hoover K., Booth T.F. et al.: Development of a recombinant baculovirus expressing a modified juvenile hormone esterase with potential for insect control. Arch Insect Biochem. Pharmacol. 1995, 30, 177–194.
4. Entwistle P.F., Evans H.F.: Viral control, W: Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology 1985, 12, 348–412.
5. Kang B.J., Chang J.L.: Allergenic impact of inhaled arthropod material. Clin. Rev. Allergy. 1985, 3, 363–375.

6. *Maeda S.*: Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 165, 1177–1183.
7. *Michalik J., Szotajska E., Chroboczek J.*: Application of baculovirus for control of pest population. *FAO/IAEA Int. Conf. On Area-Wide Control of Insect Pests.* Penang, 1998, May 28–June 2.

Otrzymano: 2003.02.14