

ACTIVITATEA LARVICIDĂ ASUPRA CULICIDELOR A UNOR NOI IZOLATE AUTOHTONE DE BACILLUS THURINGIENSIS

CORNELIA CEIANU, GABRIELA NICOLESCU,
ANA-MARIA PETRESCU, E. CHIRILĂ

Izolarea varietății *israelensis*, serotip H-14, de *Bacillus thuringiensis* de către Goldberg și Margalit în 1977 [3], a deschis perspectiva utilizării acestei bacterii în combaterea larvelor de culicide. În 1978 din larve de *Culex* sp. colectate într-o zonă mlăștinoasă din localitatea Năvodari, jud. Constanța, a fost izolată o nouă tulpină aparținând serotipului H-14 de *B. thuringiensis*, înregistrată cu codul OMS 2013-9. Această tulpină are o activitate larvicidă similară cu cea a tulpinii ONR-60 A izolată în Israel [4, 6, 8].

Investigațiile din anul 1987 cu privire la incidența în natură a bacteriilor din genul *Bacillus* patogene pentru larvele de țânțari, au dus la izolarea a trei noi tulpini cu activitate larvicidă. Morfologia coloniilor, aspectul microscopic al celulelor bacteriene și producerea în cursul sporulării a unor incluzii de formă neregulată, neomogene, care sînt liberate prin liza celei sporangiale, sugerează apartenența noilor izolate la grupul *B. thuringiensis*. În această lucrare se prezintă activitatea larvicidă a celor trei tulpini noi față de cea a tulpinilor aflate în colecție și sensibilitatea larvelor unor specii autohtone de culicide la acțiunea noilor izolate.

MATERIAL ȘI METODE

Tulpinile de *B. thuringiensis* luate în studiu sînt prezentate în tabelul 1. În cultivare s-a pornit de la un inocul de spori cu densitatea de 10^9 spori/ml, activat termic 5' la 72°C. Cîte 1 ml din această suspensie s-a inoculat în flacoane de 250 ml conținînd 50 ml mediu UG 5 cu următoarea formulă: glucoză — 10 g, peptonă pancreatică 7,5 g, H_2KPO_4 — 6,8 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,123 g, $MnSO_4$ — 0,002 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,014 g, $Fe(SO_4)_3$ — 0,02 g, $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ — 0,183 g/1 l mediu. Baloanele cu mediu au fost incubate la 28°C pe un agitator rotativ timp de 24 h, moment în care culturile se găseau în faza de creștere vegetativă. Cîte 1 ml din cultura de 24 h s-a utilizat pentru inocularea unor flacoane similare cu cîte 50 ml mediu UG. Acestea au fost incubate la 28°C agitare rotativă timp de 5 zile. La sfîrșitul acestei perioade toate culturile erau lizate, conținînd spori și cristale libere și foarte rare celule vegetative. Pentru fiecare tulpină s-a recoltat o probă care s-a inactivat 12' la 72°C și s-a utilizat pentru determinarea numărului de spori/ml. Culturile au fost păstrate la frigider (4°C) timp de 5 săptămîni, pînă la efectuarea tuturor testelor.

Testele pentru evaluarea activității toxice relative au fost efectuate după metoda standard OMS [9] modificată [7] pe larve de stadiul IV de *Aedes aegypti*, în raport cu preparatul de referință IPS-82 (Inst. Pasteur) cu titrul de 15 000 UFI/mg. Diluțiile au fost făcute direct din cultura bacteriană, cu un factor

Proveniența tulpinilor de *B. thuringiensis* laute în studiu

Nr. crt.	Tulpina	Proveniența	Serotip
1	Ca-27	Izolată nou, probă de mil din habitat temporar, Mamaia Nord, jud. Constanța; 24.VI.1987.	neidentificat
2	Fa-22	Izolate noi, probă de mil din habitat temporar, Iezer, Saturn, jud. Constanța; 29.VI.1987.	neidentificat.
4	2013-9/5R	Derivate ale tulpinii autohtone 2013-9 (OMS),	H-14
5	2013-9T6/10	izolată din larve de <i>Culex</i> sp., Năvodari, jud. Constanța, 1978.	
6	T _{31/6}	OMS, derivată a tulpinii originale izolate în Israel, ONR-60A	H-14
7	16g	Produs comercial Teknar granulat (Sandoz)	H-14
8	32i	Preparat standard IPS-82 (Inst. Pasteur)	H-14
9	22B	Preparat comercial Baçtimos (Biochem)	H-14

de diluție de 0,7. Pentru fiecare concentrație s-au expus, în 100 ml apă decolorată, câte 20 larve în trei repetiții, iar testul s-a desfășurat în două replici, cu două populații diferite de larve.

Sensibilitatea speciilor autohtone a fost evaluată prin aceeași metodă cu larve de *Culex molestus* colectate în teren (seră-Pitești) și de *Anopheles atroparvus* (colonie de laborator). Testele s-au efectuat pe larve de stadiul IV. Experimentele s-au desfășurat într-o cameră termostată la 26° C. Mortalitățile au fost înregistrate la 24 h de la tratare.

DL₅₀ și DL₉₀ au fost stabilite prin trasarea liniilor de regresie concentrație-mortalitate pe hirtie gausso-logaritmică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În condițiile prezentate, numărul sporilor/ml cultură a variat, în cazul celor 9 tulpini studiate, între 0,63—7,93 × 10⁹ (Tabelul 2). Izolatele noi Fa-22, Fb-1, Ca-27 și tulpinile T_{31/6}, 16 g, 22-B au avut o creștere și o sporulare bună, în timp ce derivatele tulpinii 2013-9 (9T₆ și 5R) și tulpina 32i au crescut mai slab.

Activitatea larvicidă a culturilor față de larve de stadiul IV de *Aedes aegypti*, exprimată prin DL₅₀ și DL₉₀, a variat între 1,8—7,8 ppm, respectiv 3,4—16 ppm. Titrul activității toxice stabilit în UTI/ml în raport cu preparatul standard IPS-82, a variat între 307000 și 133300 (tabelul 2). Tulpinile 5R și 9T₆ au avut sporulare mai slabă și activitate larvicidă mai scăzută. În cazul tulpinii 22-B creșterea și sporularea abundentă nu a fost însoțită de mărirea activității toxice. Cele trei izolate noi au avut o activitate larvicidă similară, ușor mai înaltă decât tulpina T_{31/6}, cea mai activă din colecția laboratorului. Titrul cel mai ridicat, 133300 UTI/ml, a fost înregistrat în cazul

Tabelul 2

Activitatea larvicidă față de *Aedes aegypti* (L IV) a culturilor bacteriene obținute din diverse tulpini de *B. thuringiensis*, în condițiile testului OMS

Nr. crt.	Tulpina	Spori/ml $\times 10^8$	DL ₅₀ (ppm)	DL ₉₀ (ppm)	DL ₉₀ /DL ₅₀	Titrul (UTI/ml) față de IPS-82
1	Ca-27	6,58	1,95	4,20	2,15	123 000
2	Fa-22	5,90	1,80	3,70	2,05	133 300
3	Fb-1	6,19	1,85	3,40	1,83	129 700
4	2013-9/5R	2,22	2,90	5,60	1,93	82 750
5	2013-9T6/10	0,63	7,80	16,00	2,05	30 7000
6	T _{31/6}	5,43	2,00	3,70	1,85	12 000
7	16g	5,73	2,55	5,45	2,13	94 100
8	32i	2,67	2,45	4,10	1,67	97 900
9	22B	7,93	3,70	7,00	1,89	64 800

tulpinii Fa-22. Acest izolat se caracterizează microscopic prin incluzii neomogene, polimorfe, de dimensiuni mai mari decât în cazul celorlalte tulpini aflate în colecție.

Activitatea larvicidă a noilor tulpini este ridicată, asemănătoare cu cea a izolatelor considerate active pe plan mondial [1], [2], [5], [10].

Tabelul 3

Activitatea larvicidă față de *Culex molestus* și *Anopheles atroparvus* a unor izolate noi de *B. thuringiensis*, în raport cu tulpini existente în colecția laboratorului

Nr. crt.	Tulpina	Culex molestus			Anopheles atroparvus		
		DL ₅₀ (ppm)	DL ₉₀ (ppm)	DL ₉₀ /DL ₅₀	DL ₅₀ (ppm)	DL ₉₀ (ppm)	DL ₉₀ /DL ₅₀
1	Ca-27	1,00	4,00	4,00	8,80	24,00	2,72
2	Fa-22	1,90	8,00	4,21	8,00	20,00	2,50
3	Fb-1	2,30	13,00	5,65	7,00	20,00	2,85
4	2013-9T6/10	8,80	35,20	4,00	14,00	40,00	2,85
5	T _{31/6}	1,50	5,00	3,33	9,60	20,00	2,08

Sensibilitatea speciilor autohtone *Culex molestus* și *Anopheles atroparvus* față de noile izolate și 2 tulpini de referință din colecție, este prezentată în tabelul 3. Larvele de *Culex molestus* prezintă o sensibilitate marcată față de noile izolate și față de tulpina de referință T_{31/6}, DL₅₀ cea mai mică (1 ppm) înregistrându-se în cazul preparatului Ca-27. Larvele de *Anopheles atroparvus* sînt mai rezistente, DL₅₀ variind în cazul tulpinilor noi între 7 și 8,8 ppm.

CONCLUZII

Activitatea larvicidă față de culicide a noilor izolate autohtone de *B. thuringiensis* Fa-22, Fb-1 și Ca-27 este înaltă, similară cu cea a tulpinilor considerate pe plan mondial bune producătoare de endotoxină. Aceste izolate îmbogățesc stocul de tulpini active potențial utilizabile în producerea preparatelor bacteriene pentru combaterea larvelor de țînțari.

BIBLIOGRAFIE

1. BROWNRIDGE M., MARGALIT J., 1986, — New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae., J. Invertebr. Pathol., 48, 216—222.
2. BROWNRIDGE M., MARGALIT J., 1987, — Identification of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to mosquitoes recently isolated in Israel, J. Invertebr. Pathol., 50, 322—323.
3. GOLDBERG L. J., MARGALIT J., —1977, A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*, Mosquito News, 37, 3, 355—358.
4. LACEY L. A., SINGER S., —1982, Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* against anopheline and culicine mosquitoes. Mosquito News, 42; 4, 537—543.
5. LARGET I., DE BARJAC H., —1981, Activité comparée de 22 variétés de *Bacillus thuringiensis* sur trois espèces de culicides. Entomophaga, 26, 2, 143—148.
6. MARGALIT J., DEAN D., 1985 — The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i.) J. AMCA, 1, 1, 1—7.
7. MC. LAUGHLIN R. E., DULMAGE H. T., ALLS R., COUCH T. L., DAME D. A., HALL I. M., ROSE R. I., VERSOI P. L., 1984 — U.S. Standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. Bull. Ent. Soc. Am. 30, 1, 26—29.
8. NICOLESCU G., 1985 — *Bacillus thuringiensis* — agent de combatere a culicidelor. Bacteriol., Virusol., Epidemiol., XXXI, 2, 97—110.
9. RISHIKESH N., QUELENNEC G., 1983 — Introduction à une méthode normalisée pour l'évaluation de l'activité des produits à base des *Bacillus thuringiensis*, sérotype II-14. Bull. OMS, 61, 1, 99—103.
10. WEISER J., MATHA V., GELBIC J., THAM MUU U., 1985 — A mosquito pathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* isolated from silkworm rearings in Vietnam. Folia Parasitologica, 32, 284.

THE LARVICIDAL ACTIVITY AGAINST MOSQUITOES OF NEW AUTOCHTHONOUS ISOLATES OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

SUMMARY

CORNELIA CEIANU, GABRIELA NICOLESCU,
ANA-MARIA PETRESCU, E. CHIRILĂ

Three new autochthonous isolates of *Bacillus thuringiensis* were tested for larvicidal activity against *Aedes aegypti*, *Cules molestus* and *Anopheles atroparvus* fourth-stage larvae. The cultures on UG medium of the isolates Ca-27, Fa-22 and Fb-1 were highly toxic to *Aedes aegypti* larvae, having ITU values of 123000, 133300 and 129000/ml culture, compared with 15000 ITU/mg for the *B. thuringiensis* var. *israelensis* reference standard IPS-82. The LD₅₀ for the autochthonous species *Culex molestus* and *Anopheles atroparvus* varied in the new isolates between 1—2,3 ppm and 7—8,8 ppm respectively, being similar to the values recorded in the reference strain T_{31/6}.

The new strains of *B. thuringiensis* possessing high mosquitocidal activity are of great practical value in the production of bacterial insecticides.