

Invenția se referă la microbiologie și biotehnologie, și poate fi utilizată în agricultură pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Mai multe soiuri de fructe semănătoare, inclusiv de mere, pere și gutui, sunt cultivate în zonele cu climă temperată. O diversitate bogată de insecte atacă aceste tipuri de fructe în toată lumea. Lepidopterele sunt considerate dăunători abundenți în multe state din Europa și inclusiv în Republica Moldova (Жигальцева М.И. Комплекс листовой вредителей плодового сада в Молдавии с обоснованием методов борьбы//М.И.Жигальцева: Автореф.дис. канд. с.-х. наук. Я, 1959. - 20 с).

Numeroase specii de lepidoptere pot provoca daune pomilor fructiferi, cele mai susceptibile specii depind atât de tipul de pomi fructiferi, cât și de zona geografică (David J. Carter *Pest Lepidoptera of Europe: with special reference to the British Isles*. Springer Science&Business media, 1984, 431 p.).

Împotriva lepidopterelor se utilizează un spectru larg de insecticide, însă aplicarea acestor preparate manifestă acțiuni negative asupra organismelor nevizate (Гулий В.В., Памужак Н.Г. Справочник по защите растений для фермеров. - Кишинев: Universitas, М.: Росагросервис, 1992. - 464 с.)

Elaborarea metodelor inofensive și totodată efective de combatere a lepidopterelor este una dintre problemele stringente și actuale.

Controlul microbiologic al insectelor dăunătoare a fost adesea considerat ca o alternativă favorabilă folosirii insecticidelor chimice, care posedă acțiune nespecifică, poluează mediul ambiant și se acumulează în aer, apă și sol.

Bacillus thuringiensis (Bt) este o bacterie cunoscută ca un agent important în controlul biologic. Aceasta este utilizată pe scară largă ca bioinsecticid pentru combaterea multor insecte dăunătoare, și constituie baza a peste 90% din biopesticidele disponibile în comerț, datorită absenței efectelor toxice asupra omului și altor organisme homeoterme, și lipsei poluării mediului ambiant.

Este cunoscută tulpina Bt. subsp. *kurstaki* Z-52, utilizată pentru obținerea preparatului "Lepidocid", insecticid biologic pentru combaterea lepidopterelor [1].

Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul tehnic este tulpina de bacterii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* B-159/252Bt, activă împotriva dăunătorilor din ordinul *Lepidoptera* [2].

Dezavantajul acestor tulpini constă în faptul că activitatea lor insecticidă este mai puțin eficientă. Respectiv, pentru obținerea tulpinii în cantități industriale se vor consuma mai mulți reactivi pentru mediul de cultivare, implicând cheltuieli suplimentare, și ca urmare sporind costul produsului. Un alt dezavantaj este cantitatea majorată de spori per mililitru introdusă în mediul ambiant, pentru asigurarea efectului insecticid.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea, din mediul natural, a unei tulpini autohtone noi de bacterii - *Bacillus thuringiensis*, care ar asigura producerea de proteine cu efecte insecticide, cu o activitate mai înaltă contra lepidopterelor.

Esența invenției constă în faptul că se propune o tulpină nouă de bacterii Bt. *thuringiensis* subsp. *kurstaki* Po4, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM sub nr. CNMN BB-04 în calitate de bioinsecticid pentru combaterea lepidopterelor din genul *Lymantria*.

Rezultatul tehnic al invenției constă în faptul că tulpina propusă:

- posedă o activitate insecticidă mai înaltă asupra lepidopterelor față de cea mai apropiată soluție.

- este o tulpină autohtonă, ceea ce reduce semnificativ costurile pentru obținerea bioinsecticidelor și asigură micșorarea gradului de poluare al mediului ambiant.

Rezultatul tehnic (efectul insecticid) obținut este determinat de particularitățile biochimice ale tulpinii și anume, capacitatea de a sintetiza δ -endotoxine.

Cultura propusă nu este patogenă pentru organismele homeoterme și se păstrează în tuburi pe medii agarizate T3 (Travers R., Martin P., Reichelderfer C. Selective process for efficient isolation of soils *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53 (6), p. 1263-1266), la temperatura de 4°C în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Phyllobius oblongus* L. (Thiery I., Frachon E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, pp. 55-73. In: Lacey A.L. (eds) *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, London.), colectate pe teritoriul Republicii Moldova.

Pentru cultivarea tulpinii poate fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență (g/l): Trypton (sau Casein Tryptic Peptone) – 3, triptoză – 2; extract de drojii – 1,5; NaH₂PO₄ × H₂O – 6,9; MnCl₂ × 4H₂O – 0,008; agar – 15; pH – 6,8.

Caracterele morfo-culturale ale tulpinii: Bacterii gram-pozitive cu spori. Celulele vegetative sunt mari și mobile, dispuse câte una, în perechi sau în lanțuri. Mărimea celulelor variază de la 1,5-1,7 până la 3,6-6,2 mkm. Formează și produc incluziuni proteice cristalice de formă bipiramidală. Pe mediul NA peste 24 ore tulpina formează colonii de culoare albă-gri cu marginea filiformă și suprafața mată.

Caracteristica fiziologo-biochimică a tulpinii: Microorganism facultativ anaerob. Tulpina crește în limitele de temperatură de +5...+40 °C. Temperatura optimă de creștere este de +28...+32 °C. Valoarea optimă a pH-ului pentru dezvoltarea tulpinii este de 5,2. Tulpina produce catalază, hidrolizează amidonul și caseina, lichefiază gelatina. Formează acetilmetilcarbinol, lecitinază și urează. Nu descompune esculina și salicina. Nu formează acizi și gaze din maltoză, lactoză și zaharoze. Asimilează glucoza, manoză cu formarea de acid. Nu formează sulfat de hidrogen și indol. Tulpina produce δ - endotoxine cu proprietăți insecticide.

Gradul de puritate al tulpinii:

Tulpina a fost izolată în cultură pură din corpul insectei *Phyllobius oblongus* L. (Thiery I., Frachon E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of enthomopathogenic bacteria, p. 55-73. In: Lacey A.L. (eds) Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, London), colectate pe teritoriul Republicii Moldova. Pentru cultivare necesită utilizarea mediului agarizat T3. Gradul de puritate al tulpinii a fost verificat prin Reacția de Polimerizare în Lanț cu utilizarea primerilor specifici ITS (Internal Transcribed Spacer) 16S-23S și amplificarea porțiunii de genă Cry1.

Exemplu de utilizare a invenției:

Tulpina *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Po4 este cultivată timp de o zi pe agitator la temperatura de 30°C pe mediu nutritiv agarizat T3 cu următoarea componență (g/l): Tripton (sau Casein Trypsic Peptone) – 3, triptoză – 2; extract de drojdii – 1,5; NaH₂PO₄ × H₂O – 6,9; MnCl₂ × 4H₂O – 0,008; agar – 15; pH – 6,8. Celulele sunt precipitate, resuspendate în apă distilată și incubate în agitator circular pentru o noapte la 30°C. În acest timp celulele lizează eliberând spori și cristale. Ulterior este determinată concentrația de spori și cristale de δ-endotoxină din lichidul cultural rezultat. Concentrația de spori este determinată după numărul de colonii în creștere pe mediu agarizat T3 după însămânțarea diluției. Prezența cristalelor este monitorizată prin microscopie cu contrast de fază. Prezența δ-endotoxinei este determinată prin reacția de precipitare, iar conținutul lor cantitativ - folosind ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).

Se pregătește suspensia de contaminare în apă distilată cu diferite concentrații: 0,9 × 10⁹ spori/ml, 0,9 × 10⁸ spori/ml, 0,9 × 10⁷ spori/ml, 0,9 × 10⁶ spori/ml, 0,9 × 10⁵ spori/ml. Cea mai efectivă dintre concentrațiile testate, pentru *Lymantria dispar* L. 1758, s-a dovedit a fi 0,9 × 10⁸ spori/ml.

În experiență se utilizează dăunătorul pomilor fructiferi *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera).

Efectul metodei este evaluat prin monitorizarea efectivului numeric al dăunătorilor colectați după prelucrare și cantitatea exemplarelor de insecte pierite după infestare.

Exemplul 1. Estimarea eficacității metodei de combatere a dăunătorului pomilor fructiferi *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera, Erebidae).

Evaluarea activității insecticide a tulpinii *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Po4 a fost testată pe larvele provenite din populația naturală a speciei *Lymantria dispar* L. Se prepară o serie din cinci diluții ale culturii tulpinii Po4 în soluție de 0,9% NaCl cu pasul 10 (concentrațiile indicate mai sus). În calitate de martor a fost utilizată soluția de 0,9 % NaCl. În suspensiile pregătite sunt introduse frunze de măr de aproximativ aceeași mărime, frunzele sunt uscate la temperatura de 20°C și plasate în vase Petri. Pentru fiecare diluție sunt utilizate câte 10 insecte și 2...5 frunze de măr tratate. Mortalitatea insectelor a fost cuantificată după 3 zile de incubație în incubator la 21°C și intervalul de zi 18 ore.

Activitatea biologică a tulpinii exprimată în LC50 a fost calculată după formula lui Kerber conform valorilor concentrațiilor de spori în diluțiile culturii bacteriene: $\lg LC50 = \lg CM - \Sigma (\Sigma L - 0.5)$, unde CM - concentrația maximă testată; Σ - logaritmul multiplicării diluției; ΣL - suma valorilor L pentru toate concentrațiile. Astfel o reducere cu 50% a efectivului dăunătorului *Lymantria dispar* L., poate fi obținută la aplicarea culturii bacteriene *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Po4 în concentrație de 1,392 × 10⁵ spori/ml, în soluție de 0,9% NaCl. Rezultatele sunt prezentate în Tabel.

Tabel

Nivelul peirii dăunătorului *Lymantria dispar* L. după prelucrare cu suspensie din cultura bacteriană a tulpinilor de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Nr.	Tulpina	Titrul sporilor, mlrd spori/ml	Activitatea insecticidă LC50, spori/ml
1.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Po4	0,9	1,392 × 10 ⁵
2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> B159/252Bt	4,03	2,377 × 10 ⁵

Datele Tabelului denotă că tulpina bacteriană propusă *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Po4 posedă o activitate insecticidă pronunțată asupra lepidopterelor și poate fi utilizată ca agent biologic în controlul efectivului lor numeric. Tulpina este ecologic inofensivă, deoarece a fost extrasă din mediul natural, nu este patogenă pentru plante și organismele homeoterme. În natură nu sunt introduse organisme noi, ceea ce exclude deteriorarea ecosistemelor, cum se observă în cazul utilizării altor patogeni și preparate.