

Edyta Konecka<sup>1\*</sup>, Adam Kaznowski<sup>1</sup>, Jakub Baranek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla bezkręgowców i jej uwarunkowanie. 3. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla kręgowców. 4. *B. thuringiensis* w zwalczaniu szkodników upraw roślin. 5. Podsumowanie

#### The usage of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide production

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that produces crystal inclusions during sporulation. The protein crystals of Cry toxins are active against insect pests but not against non-target organisms. The activity of Cry proteins makes the *B. thuringiensis* crystalline toxins useful in producing pesticides containing crystals and spores. The toxicity of *B. thuringiensis* for insects is also determined by substances synthesized during the vegetative stage of bacteria growth: Sip protein, chitinase or Vip protein. Some *B. thuringiensis* strains produce virulence agents that affect vertebrates. Enterotoxin or  $\beta$ -exotoxin could be responsible for harmful impact on human health, therefore insecticides should not contain bacterial spores.

1. Introduction. 2. The pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* for invertebrates and its determination. 3. The pathogenicity of *B. thuringiensis* for vertebrates. 4. *B. thuringiensis* in plant protection against pests. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Bacillus thuringiensis*, toksyny krystaliczne, szkodniki roślin, środek ochrony roślin

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, crystalline toxins, plant pests, insecticide

## 1. Wprowadzenie

Gatunek *B. thuringiensis* obejmuje chemoorgano-heterotroficzne Gram-dodatnie laseczki wytwarzające endospory. Bakterie zostały odkryte w materiale pobranym od larw *Bombyx mori* (jedwabnik morowy) przez Ishawata w Japonii w 1901 r. Nazwa gatunkowa została wprowadzona przez Berlina dla laseczek wyhodowanych z gąsienic *Ephestia kühniella* (mklik mączny) w Turyngii w 1911 r. [52].

Szczepy *B. thuringiensis* często były izolowane z gleby, wody, padłych owadów i powierzchni roślin [72]. Martin i Travers [53] wyisobnili *B. thuringiensis* z próbek gleby zebranych we Wschodniej Azji, Nowej Zelandii, Afryki, Ameryki Południowej i Europie. Dużą liczbę *B. thuringiensis* stwierdzono w materiale pobranym z magazynowanego zboża i mąki oraz w pyłe powstającym podczas mlenia kukurydzy. Bakterie *B. thuringiensis* wyhodowano także z gniazd ptaków i nietoperzy oraz wody pobranej ze stawu [9]. Szczepy *B. thuringiensis* obecne były również w kurzu, pajęczynie, wymazach pobranych z powierzchni ścian budynków oraz w odchodach ptaków [54] i z przewodów pokarmowych ssaków [75].

Pod względem fenotypowym i genetycznym *B. thuringiensis* wykazuje wysokie podobieństwo z *B. cereus* i *B. mycoides*. W różnicowaniu *B. cereus* i *B. thuringiensis* stwierdzono użyteczność metod molekularnych opartych na analizie sekwencji genów 16S rRNA, 23S rRNA i *gyrB* [4, 49]. Cechą wyróżniającą *B. thuringiensis* od

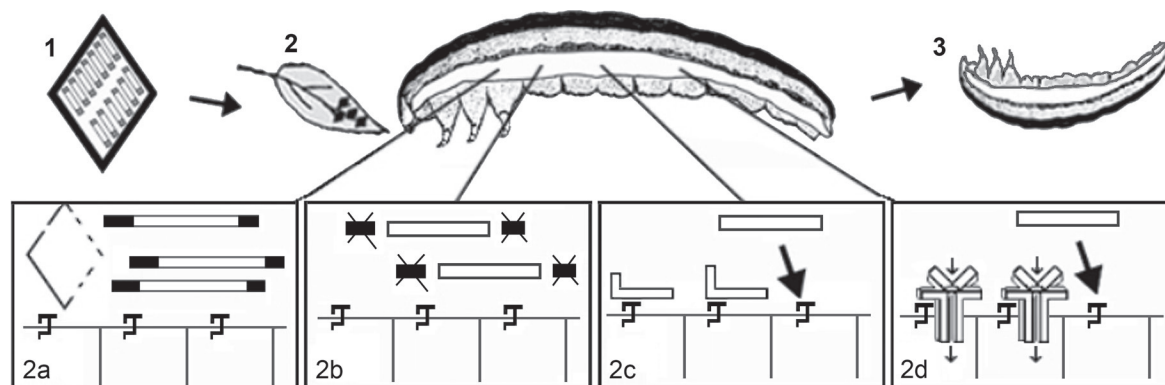
blisko spokrewnionych gatunków jest zdolność syntezy białkowych toksyn krystalicznych Cry i Cyt o aktywności owadobójczej [37, 65]. Toksyny *B. thuringiensis* są aktywne dla niektórych owadów z rzędu *Lepidoptera* (motyle), *Diptera* (muchówki), *Coleoptera* (chrząszcze), a także *Hymenoptera* (błonkoskrzydłe), *Homoptera* (równoskrzydłe), *Orthoptera* (prostoskrzydłe) i *Mallophaga* (wszoły). Ponadto, białka Cry mogą być toksyczne dla niektórych nicieni, roztoczy i pierwotniaków [67]. *B. thuringiensis* powoduje zakażenie przewodu pokarmowego bezkręgowców. Na skutek działania białek krystalicznych dochodzi do paraliżu układu pokarmowego bądź paraliżu ogólnego, larwa owada zaprzestaje żerować i zamiera [72].

## 2. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla bezkręgowców i jej uwarunkowanie

Bakterie *B. thuringiensis* mogą być chorobotwórcze dla niektórych owadów, nicieni, roztoczy i pierwotniaków. Patogenność tych bakterii uwarunkowana jest działaniem toksyn krystalicznych Cry i Cyt [79]. Ponadto, szczepy *B. thuringiensis* mogą także wytwarzać inne czynniki wirulencji dla bezkręgowców: białka Vip [67],  $\beta$ -egzotoksyna zwana turyngienzyną [15], proteina P20 [81], chitynaza [66] oraz proteiny Sip [24].

Podczas sporulacji w komórce bakteryjnej powstaje jeden lub kilka białkowych kryształów zawierających od 1 do 5 nieaktywnych form toksyn Cry i Cyt

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii UAM; ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. (+48) 61 8295935; e-mail: edkon@amu.edu.pl



Rys. 1. Mechanizm działania toksyn Cry *B. thuringiensis*

Kryształy (1) spożywane są przez owada z pokarmem (2). W jelicie owada następuje rozpuszczenie kryształów białkowych i uwolnienie protoksyn (2a). Protoksyny ulegają aktywacji do formy czynnej poprzez proteolityczne odcięcie części łańcucha aminokwasowego (2b). Aktywne toksyny przyłączają się do receptorów błon komórek epitelialnych i zmieniają konformację przestrzenną (2c). Białka Cry wbudowują się w błony enterocytów, oligomeryzują i tworzą kanały (2d). W wyniku paraliżu owad zamiera (3).

[3, 22]. Szczepy *B. thuringiensis* mogą wytwarzać kryształy o kształcie: dwupiramidowym, sześciennym, owalnym lub nieregularnym. Owadobójcze działanie kryształu jest wyższe niż toksyczność poszczególnych białek wchodzących w jego skład, co wskazuje na synergistyczne działanie niektórych toksyn [38]. Słaby antagonizm zaobserwowano w przypadku toksyn Cry11A i Cry4B oraz Cry11A i Cyt1A [38].

Toksyny Cry różnicuje się na grupy o podobieństwie sekwencji aminokwasów wynoszącym co najmniej 45%. W obrębie grup wyróżnia się podgrupy białek o podobieństwie sekwencji aminokwasów równym 75 i 95% [17]. Liczba poznanych grup toksyn Cry wynosi 60. Wyróżnia się także 2 grupy białek Cyt [18].

Stwierdzono toksyczne działanie białek Cry1, Cry2, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry22, Cry32, Cry51 i Cry54 dla owadów należących do rzędu *Lepidoptera*, np.: *Lymantria dispar* [62], *Bombyx mori* [79], *Trichoplusia* [79, 83], *Spodoptera littoralis* [48], *Plutella xylostella* [79] i *Helicoverpa armigera* [76]. Toksyny Cry należące do grup 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 39, 40, 44, 47, 48, 49 i 54 są czynnikami etiologicznymi zakażeń u owadów z rzędu *Diptera*, np.: *Aedes aegypti* [7, 76], *Anopheles stephensi*, *Culex pipens*, *Culex quinquefasciatus* [79, 83], i *Chironomus tepperi* [38]. Wykazano także aktywność bójczą Cry1, Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 i Cry55 dla *Leptinotarsa decemlineata* [11], *Pyrrhalta luteola*, *Anomala cuprea* i innych owadów należących do rzędu *Coleoptera* [79, 83]. Toksyna Cry5 jest patogenna dla szkodników z rzędu *Hymenoptera*: *Diprion pini* oraz *Cephascia abietis* [28]. Niektóre białka krystaliczne Cry są również bójcze dla owadów z rzędu *Hemiptera*, *Siphonoptera* [79], *Homoptera*, *Orthoptera* i *Mallophaga* [67]. Ponadto, wykazano, że niektóre białka Cry mogą być toksyczne dla nicieni [43, 58, 79] roztoczy i pierwotniaków [67].

W budowie toksyn Cry wyróżnia się 3 domeny. N-końcowa domena I zbudowana jest z 7 antyrównoległych łańcuchów helis  $\alpha$ . Centralna helisa  $\alpha 5$  otoczona jest przez pozostałe. W skład domeny II wchodzi 3 antyrównoległe struktury harmonijek  $\beta$  ( $\beta$ -sheets), każda położona pod kątem ok.  $120^\circ$  względem pozostałych. Domena II zawiera 3 antyrównoległe struktury harmonijek  $\beta$  ułożonych warstwowo ( $\beta$ -sandwich). Białko Cyt zbudowane jest z pojedynczej domeny, w której 2 helisy  $\alpha$  otaczają struktury  $\beta$  [22, 67].

Domena I, II i III białek Cry rozpoznaje specyficzny receptor w błonie komórek epitelialnych jelita środkowego owada i wiąże się do niego [21]. Domena I i III biorą udział w tworzeniu kanałów w błonie komórek jelita owada [12, 22, 29, 67].

W jelicie środkowym owada kryształ ulega rozpuszczeniu i następuje proteolityczna aktywacja protoksyn do formy czynnej [48]. U owadów *Lepidoptera* i *Diptera* enzymami proteolitycznymi są proteazy serynowe, natomiast u owadów z rzędu *Coleoptera* proteazy cysteinowe i asparaginowe. Po związaniu się toksyny z receptorem błony komórki epitelialnej następuje zmiana konformacji cząsteczek toksyn i ich wbudowanie w błonę komórek jelita [22]. W błonie, cząsteczki białek oligomeryzują i tworzą kanały [29, 62]. Wykazano, że receptorem wiążącym Cry jest aminopeptydaza N [16], alkaliczna fosfataza [61] lub białko przypominające kadherynę (cadherin-like protein) [29]. U niektórych owadów toksyny mogą wiązać się do białka rąbka szczoteczki komórek nabłonka jelita BBMV (brush border membrane vesicle protein) [28, 39]. W efekcie dochodzi do zakłócenia przepuszczalności błony i lizy komórek jelita środkowego owada [37]. Mechanizm działania białka Cry przedstawiono na rysunku 1.

Toksyny Cyt różnicuje się na dwie grupy pod względem podobieństwa sekwencji aminokwasów [18]. Białka Cyt są toksyczne dla owadów z rzędu *Diptera* oraz mogą

powodować lizę komórek kręgowców [23]. Opisano synergistyczny efekt działania toksyn Cyt i białek owadobójczych Cry *B. thuringiensis* oraz *B. sphaericus* [23, 77].

Niektóre białka wytwarzane przez *B. thuringiensis* wykazują synergistyczne działanie względem białek krystalicznych. Białko P20 (20 kDa) stymuluje ekspresję genów *cry1Ac* i *cry11A*. Ponadto, stwierdzono, że aktywność toksyny Cyt1Aa jest uzależniona od obecności P20. Przypuszcza się, że to białko uczestniczy w tworzeniu kryształu [81]. Geny kodujące syntezę P20 zlokalizowane są w plazmidzie, podobnie jak geny warunkujące syntezę białek krystalicznych [8].

Enzym chitynaza wykazuje działanie synergistyczne wraz z białkami owadobójczymi *B. thuringiensis* w zwalczaniu *Lymantria dispar*, *Choristoneura fumiferana* i *Culicoides nubeculosus*. Obok *B. thuringiensis* geny kodujące syntezę chitynazy stwierdzono między innymi u *Serratia marcescens*, *Bacillus lentus* i *B. cereus*. Przypuszcza się, że chitynaza powodując perforacje w błonie komórek jelita umożliwi wejście patogena do hemocelu owada [66].

Pomimo efektywnego owadobójczego działania białek krystalicznych, niektóre szkodniki roślin nie są wrażliwe na ich działanie. Przykładem jest *Agrotis ipsilon*, powszechnie występujący szkodnik wielu upraw, w tym zbóż. Zwalczanie tego owada jest trudne, gdyż tylko stadium larwalne jest wrażliwe na działanie insektycydów. W walce z *Agrotis ipsilon* wykazano skuteczność białek Vip (vegetative insecticidal proteins) *B. thuringiensis* wytwarzanych podczas wegetatywnej fazy wzrostu bakterii. Również zwalczanie *Trichoplusia ni*, szkodnika warzyw, kwiatów ozdobnych, tytoniu i bawełny, mogłoby być skuteczne przy zastosowaniu białka Vip3. Stwierdzono wysoką aktywność tej toksyny dla larw *T. ni* odpornych na działanie proteiny Cry1Ac wytwarzanej przez rośliny transgeniczne, którymi żywią się gąsienice owada [29]. Innymi szkodnikami wrażliwymi na działanie Vip są: *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* i *Ephestia kühniella*. Białka Vip dzieli się na trzy grupy na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów [18]. Mechanizm aktywności bójczej Vip nie został w pełni wyjaśniony. Sposób działania tych toksyn różni się od białek Cry, dlatego Vip mogą stanowić alternatywę dla zwalczania owadów odpornych na działanie protein krystalicznych [26]. Po aktywacji proteolitycznej białka Vip wiążą się do protein BBMV jelita środkowego owada. Wykazano, że toksyna Vip3A-G tworzy pory w błonach komórkowych jelita, Vip3A-F nie ma takiej zdolności [51]. W wyniku działania toksyn dochodzi do paraliżu układu pokarmowego i lizy komórek epitelialnych jelita środkowego owada. Szcep *B. thuringiensis* HD1, wykorzystywany do produkcji środków ochrony roślin, zawiera gen kodujący syntezę Vip3A [56]. Geny kodujące syntezę białek Vip są obecne w plazmidach, które warunkują także wytwarzanie toksyn Cry [3] lub w chromoso-

mie [27]. Technika stosowaną do wykrycia genów *vip* pozwalającą również na różnicowanie grup genów jest PCR-RFLP [35].

Innym czynnikiem wirulencji *B. thuringiensis* dla owadów jest termostabilna  $\beta$ -egzotoksyna będąca analogiem ATP, hamująca działanie polimerazy RNA zależnej od DNA [68]. Ze względu na toksyczne działanie  $\beta$ -egzotoksyny w stosunku do kręgowców, szczepy bakteryjne wykorzystywane do produkcji środków ochrony roślin nie mogą wykazywać zdolności jej syntezy [15, 34]. Obecność tej toksyny można wykryć testem immunoenzymatycznym ELISA [5]. Część cząsteczka egzotoksyny zbudowana jest z reszty glukozy, adenozyiny i kwasu alarowego. Geny kodujące syntezę i mechanizm sekrecji toksyny typu I zlokalizowane są w plazmidzie zawierającym również geny białek krystalicznych [25]. Ich ekspresja jest częściowo zależna od sekwencji zawartych w DNA chromosomalnym. Wykazano zależność pomiędzy przynależnością danego szczepu *B. thuringiensis* do serowaru i zdolnością wytwarzania tych toksyn. Około 80% szczepów *B. thuringiensis* serowar *thuringiensis* i ok. 90% *B. thuringiensis* serowar *darmstadiensis* syntetyzuje  $\beta$ -egzotoksynę. Nie stwierdzono tej właściwości u szczepów serowarów: *alesti*, *sotto*, *aizawai*, *morrisoni* [34].

Działanie owadobójcze dla owadów z rzędu *Coleoptera* wykazuje sekrecyjne białko Sip (secreted insecticidal protein). Spektrum jego aktywności jest podobne do Cry3A i Cry3Bb. Stwierdzono toksyczność Sip w stosunku do *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi* oraz *Diabrotica virgifera virgifera* [24].

Rzadko odnotowuje się bakteriozy powodowane przez *B. thuringiensis* przebiegające jako epizoocje. Przykładem była epizoocja *Ephestia cautella* w magazynie kukurydzy w Kenii [14]. Innym przykładem wystąpienia masowego zakażenia spowodowanego *B. thuringiensis* serowar *aizawai* odnotowano u larw *Mythimna loreyi* zebranych z uprawy zboża w Hiszpanii w 1989 roku [63]. Stwierdzono także 1 przypadek epizoocji wśród *Carpocapsa pomonella* w sadzie owocowym w Czechach [84]. *B. thuringiensis* był również czynnikiem etiologicznym epizoocji *Cephalcia falleni* w Gorczańskim Parku Narodowym [72]. W latach 1990–1999 odnotowano powtarzające się epizoocje powodowane przez szczepy *B. thuringiensis* w laboratoryjnych hodowlach *Cydia pomonella* prowadzonych na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu oraz w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Poznaniu [45, 46].

### 3. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla kręgowców

W piśmiennictwie odnotowano przypadek wystąpienia zmian chorobowych u człowieka na skutek bezpośredniego rozpylenia insektycydu zawierającego spory

i kryształły do oka. Z materiału pobranego z powstałego wrzodu rogówki wyhodowano bakterie *B. thuringiensis*. Zastosowanie gentamycyny i cefazoliny pozwoliło na całkowite wyleczenie pacjenta. Wyhodowanie *B. thuringiensis* z materiału pobranego z rogówki świadczyła o obecności bakterii w rogówce, ale nie świadczyła o udziale tych bakterii w tworzeniu wrzodu. Nie wyklucza się, że inne bakterie, niż *B. thuringiensis*, mogły być odpowiedzialne za powstałe w oku zmiany chorobowe [70].

W 1995 roku wyosobniono z materiału pobranego z ropnia od francuskiego żołnierza, powstałego na skutek urazów spowodowanych eksplozją miny lądowej w byłej Jugosławii, Gram-dodatnie laseczki wytwarzające kryształy białkowe i przeprowadzające hemolizę typu beta. Izolat oznaczono jako *B. thuringiensis* subsp. *konkukian* i prowadzono dalsze badania na myszach o obniżonej odporności immunologicznej. Wyniki doświadczeń sugerują zdolność *B. thuringiensis* do wywołania martwicy tkanki mięśniowej u zakażonych myszy [32]. Śmierć zwierząt nastąpiła po ośmiu godzinach od podania donosowo zawiesziny spor bakteryjnych w liczbie  $10^8$ . Przeprowadzenie podobnego doświadczenia z użyciem mutanta *B. thuringiensis* subsp. *konkukian*, nie mającego zdolności syntezy białek krystalicznych, dało identyczne wyniki, co wskazuje na inne toksyny warunkujące patogenność tych bakterii w stosunku do myszy. Czynniki wirulencji tych bakterii może być hemolizyna, fosfolipaza C i sfingomielinaza [33]. Podanie myszom, zainfekowanym wirusem grypy A, bakterii *B. thuringiensis* subsp. *konkukian* oraz *B. thuringiensis* wyhodowanych z biopreparatu handlowego wykazało ich patogenność, co wskazuje na istnienie potencjalnego zagrożenia stosowania niektórych insektycydów dla osób chorych na gripę. Wydaje się konieczne wprowadzenie odpowiednich środków bezpieczeństwa w przypadku osób pracujących z roślinami chronionymi preparatami *B. thuringiensis* [33]. Według Siegela [70] liczba spor *B. thuringiensis* chorobotwórcza dla myszy jednak wielokrotnie przekracza liczbę spor obecną po rozpyleniu stosowanego bioinsektycydu w  $1\text{ m}^3$  powietrza, co wskazuje na niskie zagrożenie tych środków dla zdrowia ludzi.

Alergiczne reakcje skórne oraz wzrost stężenia przeciwciał IgE i IgG opisano u osób mających kontakt z bioinsektycydem *B. thuringiensis* Javelin. Z materiału pobranego od ludzi z nadwrażliwością wyhodowano bakterie o identycznym profilu DNA jak z *B. thuringiensis* wyhodowanego z pestycydu, co wskazuje, że drobnoustrój ten może być czynnikiem indukującym wyżej wymienione zmiany [6].

Obecność bakterii mających gen kodujący wytwarzanie enterotoksyny stwierdzono w kale osób pracujących w miejscu upraw chronionych insektycydami *B. thuringiensis*. Genotypowanie szczepów wykazało, że bakterie *B. thuringiensis* izolowane od ludzi i wyhodowane

z pestycydów miały identyczne wzory DNA. Nie zaobserwowano jednak objawów chorobowych u ludzi [41].

W latach 1984 i 85 wyhodowano *B. thuringiensis* z materiału pobranego od 55 osób zamieszkujących okolice Lane County w stanie Oregon (USA), gdzie stosowano insektycyd zawierający spory i kryształy *B. thuringiensis*. U 52 osób nie odnotowano objawów chorobowych. U pozostałych trzech osób stwierdzono zapalenie płuc, zapalenie pęcherzyka żółciowego i kamicę żółciową oraz wystąpienie ropnia. Brak jednoznacznych przesłanek wskazujących na *B. thuringiensis* jako czynnika etiologicznego wyżej wymienionych chorób nie pozwala zaliczyć tych bakterii do patogenicznych dla człowieka [30].

Niektórzy autorzy odnotowali jednak przypadki szkodliwego wpływu *B. thuringiensis* dla zwierząt. Opisano jeden śmiertelny przypadek krowy wskutek zapalenia gruczołu mlecznego spowodowanego przez *B. thuringiensis* [19]. Wyhodowany szczep bakteryjny z biopreparatu Dipel indukował stres oksydacyjny w komórkach wątroby szczura. Obecność patogena prowadziła do powstania reaktywnych form tlenu oraz wpływała na aktywność enzymów detoksyfikacyjnych: peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy lipidowej i reduktazy glutationowej [69]. Wykazano także potencjalną chorobotwórczość szczepów *B. thuringiensis* wytwarzających  $\beta$ -egzotoksynę. W komórkach kory mózgowej szczura toksyna powodowała wzrost aktywności cykazy adenylowej i zwiększenie stężenia cAMP, co może zaburzać transdukcje sygnałów w układzie neuroendokrynowym, w których pośredniczy cAMP. Toksyna podawana wziewnie powodowała zaburzenia funkcjonowania układu oddechowego szczura [78].

Określono zdolność wytwarzania enterotoksyny chorobotwórczej dla zwierząt, w tym ludzi, przez szczepy *B. thuringiensis* wykorzystywane do produkcji środków ochrony roślin [19, 20]. Wykazano, że bakterie wyhodowane bioinsektycydów Bactimos, Dipel, Florbac i Foray mają zdolność syntezy tej toksyny. Pomimo braku danych o udziale enterotoksyny w chorobotwórczości *B. thuringiensis* dla ludzi, sugeruje się wprowadzenie zakazu stosowania szczepów wytwarzających tą toksynę do produkcji pestycydów [19]. Bakterie *B. thuringiensis* syntetyzujące enterotoksynę izolowano także z produktów żywnościowych [20]. Niektóre *B. thuringiensis* obok enterotoksyny mają także zdolność wytwarzania hemolizyny [31].

Ze względu na duże podobieństwo fenotypowe i genetyczne *B. thuringiensis* i *B. cereus* oraz brak możliwości różnicowania tych dwóch gatunków przy użyciu konwencjonalnych testów, przypuszcza się, że *B. thuringiensis* może być czynnikiem etiologicznym chorób powodowanych przez szczepy identyfikowane mylnie jako *B. cereus* [20].

W ostatnich latach podjęto badania nad możliwością wykorzystania białek *B. thuringiensis* w leczeniu niektórych chorób człowieka. Szczepy bakteryjne reprezentujące serowary: *dakota*, *neoleonensis*, *shandongensis* i *coreanensis* wytwarzają białko wchodzące w skład kryształu wykazujące aktywność cytotoksyczną w stosunku do białaczkowych limfocytów T człowieka. Białko to rozpoznawało i specyficznie wiązało się do komórek nowotworowych nie powodując uszkodzenia „zdrowych” limfocytów T. Ponadto, nie hemolizowało erytrocytów owczych i nie miało właściwości owadobójczych. Nie stwierdzono jego podobieństwa z toksynami Cry i Cyt [50, 57]. Wykazano także, że kryształy zawierające białko o aktywności cytotoksycznej dla komórek nowotworowych miały kształt dwupiramidowy o zaokrąglonych końcach. To samo białko miało zdolność niszczenia komórek raka szyjki macicy [82]. Zidentyfikowano także białko o identycznych, jak wyżej wymienione, właściwościach, które dodatkowo wykazywało aktywność cytotoksyczną dla komórek nowotworowych okrężnicy [40] oraz wątroby [44].

#### 4. *B. thuringiensis* w zwalczaniu szkodników upraw roślin

Środki ochrony roślin zawierające spory i kryształy białkowe *B. thuringiensis* stanowią alternatywę dla chemicznych insektycydów [80]. Selektywne działanie

[42] i duża skuteczność w walce ze szkodnikami upraw roślinnych sprawiają, że zainteresowanie biopestycydami zwiększa się. Syntetyczne preparaty chemiczne, w przeciwieństwie do insektycydu biologicznego, zaburzają oddziaływanie w łańcuchach pokarmowych w ekosystemach, mają negatywny wpływ na organizmy nie będące szkodnikami, a ich długotrwałe stosowanie indukuje odporność u owadów [72]. Pestycydy oparte na *B. thuringiensis* nie indukują pojawienia się odporności u owadów (odnotowano tylko jeden przypadek wystąpienia odporności u *Plutella xylostella*) [67]. Produkcja biopreparatu nie wymaga dużych nakładów finansowych w porównaniu z wytwarzaniem chemicznych środków ochrony roślin, np.: koszt produkcji insektycydu zawierającego spory i kryształy *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* jest około czterdziestokrotnie mniejszy niż pestycydu chemicznego [67].

Aktualnie preparaty zawierające spory i kryształy *B. thuringiensis* są najczęściej stosowanymi wśród biologicznych środków ochrony roślin. W 1995 ogóln światowa sprzedaż bioinsektycydów przyniosła zysk 90 milionów dolarów i stanowiła 2% na rynku pestycydów. Szacuje się, że rocznie do celów ochrony upraw wykorzystuje się  $2,3 \times 10^6$  kg biopreparatów. W 1998 roku, w Stanach Zjednoczonych było 200 zarejestrowanych produktów opartych na *B. thuringiensis* [67]. Preparaty owadobójcze zawierające spory i toksyny *B. thuringiensis* zostały wymienione w tabeli I.

Tabela I  
Handlowe preparaty oparte na *B. thuringiensis* stosowane w ochronie upraw roślin [42, 59]

Bioinsektycyd	Producent	Szczep <i>B. thuringiensis</i>	Zwalczana grupa owadów
Biobit, Dipel, Foray	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>
Bactec Bernan	Bactec Corp.		
BMP 123	Becker Microbial Products, Inc.		
Condor, Crymax, Cutlass, Raven	Ecogen Inc.		
Forwabit	Forward International Ltd.		
Costar, Javelin, Thuricide, Vault	Thermo Trilogry		
Bactosid K	Sanex Inc.		
Agrobac	Tecomag		
Troy-BT	Troy Biosciences Inc.		
MVP, MVP II, M-Peril	Mycogen Corp.		
Bactimos, Gnatrol, Skeetal, VectoBac	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	<i>Diptera</i>
Aquabac, Aquabac Primary Powder	Becker Microbial Products, Inc		
Vectocide	Sanex Inc.		
Novodor	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	<i>Coleoptera</i>
M-trak	Mycogen Corp.		
Bactec Corp.	Bactec Bernan		
Xen Tari	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>
Agree, Design	Thermo Trilogry		
Mattch	Mycogen Corp.		

W ochronie upraw leśnych najczęściej stosowanym pestycydem jest biopreparat oparty na szczepach *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 wytwarzających toksyny Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac oraz Cry2Aa. Insektycyd zawierający spory i kryształki *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 jest stosowany do zwalczania *Choristoneura fumiferana* w Kanadzie, *Lymantria monacha* w Polsce, *Lymantria dispar* w USA i Kanadzie oraz na Dalekim Wschodzie, *Thaumetopea pityocampa* w Hiszpanii i Francji [67].

Produkty handlowe oparte na *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* okazały się najbardziej efektywne z biopestycydów w walce z komarowatymi (*Culicidae*) i meszkowatymi (*Simuliidae*) należącymi do rzędu *Diptera*. Odkrycie *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* miało miejsce w 1977 roku, w którym odnotowano pojawienie się odporności owadów należących do *Diptera* na stosowane syntetyczne pestycydy chemiczne. Wykazano, że toksyny Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A i Cyt1A wytwarzane przez *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mają aktywność bójczą dla *Diptera*. Obserwowana aktywność toksyczna białek krystalicznych stała się szczególnie interesująca ze względu na udział komarowatych i meszkowatych w przenoszeniu czynników chorobotwórczych dla człowieka. Dalsze badania wykazały, że inne niż *israelensis* szczepy *B. thuringiensis* także syntetyzują białka krystaliczne o aktywności bójczej dla *Diptera*. Zaskakującym było odkrycie, że toksyny Cry17A, Cry18A i Cry19A owadobójcze w stosunku do komarowatych są wytwarzane także przez *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* [67].

Badania przeprowadzone w Peru i Ekwadorze wykazały skuteczność preparatu Abate, zawierającego spory i kryształki *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, w zwalczaniu owadów *Anopheles* przenoszących *Plasmodium vivax*, czynnik etiologiczny malarii. Jednocześnie nie zaobserwowano szkodliwego wpływu insektycydu na ludzi, ptaki, ryby, krewetki i pszczoły [47].

Szczepy *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* używane są w produkcji insektycydów zwalczających *Galleria mellonella* i *Plutella xylostella*. Liczebność szkodników z rzędu *Coleoptera*, głównie *Leptinotarsa decemlineata* jest ograniczana przy zastosowaniu biopreparatów zawierających *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* [71].

Warunkiem wprowadzenia pestycydu do użycia jest brak jego szkodliwego wpływu na zdrowie ludzi. Ze względu na możliwość wytwarzania przez *B. thuringiensis* czynników wirulencji dla człowieka dąży się do opracowania bioinsektycydu pozbawionego spor bakterijnych.

W 1996 roku po raz pierwszy wprowadzono na rynek rośliny transgeniczne zawierające w swoim genomie geny kodujące syntezę toksyn Cry. Wprowadzenie roślin zmodyfikowanych genetycznie redukuje koszty, czas i wysiłek poświęcony ochronie upraw oraz stanowi przyjazny

dla środowiska sposób zwalczania szkodników [60]. Sądzi się, że transgeniczne uprawy mogą przyczynić się do mniejszego rozprzestrzeniania się mykotoksyn powodujących nowotwory wątroby u ludzi. Szkodniki zbóż żerując na łodygach i kłosach roślin powodują ich uszkodzenia, co umożliwia kiełkowanie zarodników grzyba *Fusarium* sp. wytwarzającego toksyny. Zmniejszenie liczebności szkodników przyczynia się do ograniczenia kiełkowania zarodników grzyba, co wykazano w doświadczeniu z użyciem transgenicznego zboża [10]. Ekspresja genów *cry* w komórkach ryżu pozwoliła na podniesienie ilości plonów w wyniku negatywnego wpływu toksyn krystalicznych na szkodniki: *Scirophaga incertulans*, *Chilo suppressalis*, *Cnaphalocrocis medinalis* oraz *Marasmis* spp. [1], co ma szczególne znaczenie, gdyż ryż jest podstawowym składnikiem diety dla blisko dwóch miliardów ludzi na świecie [36]. Wysoką skuteczność w walce ze szkodnikami roślin zaobserwowano w następstwie wprowadzenia genów *cry* do genomu bawełny [2], topoli, kawy, kukurydzy i rzepaku [73].

Zwiększająca się liczba roślin zmodyfikowanych genetycznie może przyczynić się do powstania odporności u owadów na białka Cry [13, 74]. Poszukuje się związków, które działając łącznie z toksyną krystaliczną zmniejszą ryzyko wystąpienia oporności u szkodników roślin. Przykładem jest integracja Cry1Ac z domeną wiążącą galaktozę łańcucha rycyny, która stanowi dodatkowe miejsce wiążące białko Cry do komórek owada [55].

Prawdopodobieństwo pojawienia się oporności u owadów na białka Cry wytwarzane przez rośliny modyfikowane jest większe niż na insektycydy zawierające kryształki *B. thuringiensis* ze względu na to, że rośliny transgeniczne wywierają ciągłą presję selekcyjną na populacje owadów [60].

Jednym ze sposobów poprawy jakości roślin jest otoczkowanie nasion przed ich wysianiem. Dodanie białka Cry do warstwy otoczki lub do nasion przed otoczkowaniem chroni nasiona przed szkodnikami. Przykładem są nasiona kukurydzy, do których wprowadzono toksyny Cry zapewniając im ochronę przed atakiem ploniarki zbożówki [64].

## 5. Podsumowanie

Bakterie *B. thuringiensis* mogą syntetyzować zróżnicowaną gamę czynników wirulencji dla owadów. Największe zainteresowanie wzbudzają białka Cry z powodu wysokiej toksyczności tych protein dla szkodników upraw roślinnych oraz braku szkodliwego wpływu na komórki kręgowców. Kryształki białkowe *B. thuringiensis* znalazły zastosowanie w produkcji efektywnych biopestycydów stając się alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Trwają intensywne poszukiwania

nowych szczepów *B. thuringiensis*, które mogłyby być wykorzystane do produkcji skuteczniejszych preparatów owadobójczych niż te dostępne na rynku. Istnieje również tendencja do eliminowania z preparatów owadobójczych form przetrwalnych *B. thuringiensis* ze względu na możliwość wytwarzania przez formy wegetatywne czynników warunkujących chorobotwórczość tej bakterii dla człowieka. Ponadto, toksyny krystaliczne mogą być wytwarzane przez rośliny transgeniczne stanowiąc skuteczny sposób ochrony upraw, ale rośliny modyfikowane genetycznie, w przeciwieństwie do pestycydów opartych na *B. thuringiensis*, mogą indukować pojawienie się oporności na białka Cry u owadów. Dodatkowo, aktywność niektórych toksyn krystalicznych dla nicieni może być użyteczna w walce z pasożytami roślin i zwierząt.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2012 jako projekt badawczy Nr N N310 079936.

## Piśmiennictwo

- Alam M. F., Datta K., Abrigo E., Vasquez A., Senadhira D., Datta S.K.: Production of transgenic deepwater indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Sci.* **135**, 25–30 (1998)
- Alchanatis V., Navon A., Glazer I., Levski S.: An image analysis system for measuring insect feeding effects caused by biopesticides. *J. Agric. Engng Res.* **77**, 289–296 (2000)
- Aronson A.: Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life. Sci.* **59**, 417–425 (2002)
- Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A.: Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determinate phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3711–3730 (2004)
- Bekheit H.K.M., Lucas A.D., Gee S.J., Harrison R.O., Hammock B.D.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1530–1536 (1993)
- Bernstein I.L., Bernstein J.A., Miller M., Tierzieva S., Bernstein D.I., Lummus Z., Selgrade M.K., Doefler D.L., Seligy V.L.: Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**, 575–581 (1999)
- Berón C.M., Salerno G.L.: Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr. Microbiol.* **54**, 271–276 (2007)
- Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A.F., Murphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J.: Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5082–5095 (2002)
- Bernhard K., Jarrett P., Meadows M., Butt J., Ellis D.J., Roberts G.M., Pauli S., Rodgers P., Burges H.D.: Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. *J. Invert. Pathol.* **70**, 59–68 (1997)
- Betz F.S., Hammond B.G., Fuchs R.L.: Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* – protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 156–173 (2000)
- Bradley D., Harkey M.A., Kim M.K., Biever K.D., Bauer L.S.: The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to Coleopteran and Lepidopteran larvae. *J. Invert. Pathol.* **65**, 162–173 (1995)
- Bravo A., Gill S.S., Soberón M.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**, 423–435. (2007)
- Bravo A., Soberón M.: How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* **26**, 573–579 (2008)
- Burges H.D., Hurst J.A.: Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J. Invert. Pathol.* **30**, 131–139 (1977)
- Carlberg G., Tikkanen L., Abdel-Hameed A.H.A.: Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparations, including thuringiensin, using the *Salmonella* assay. *J. Invert. Pathol.* **66**, 68–71 (1995)
- Chen J., Aimanova K.G., Pan S., Gill S.S.: Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1IA toxin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **39**, 688–696 (2009)
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H.: Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807–813 (1998)
- Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (2010), data potwierdzenia ważności adresu: 06 sierpień 2010
- Damgaard P.H.: Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**, 245–250 (1995)
- Damgaard P.H., Larsen H.D., Hansen B.M., Bresciani J., Jørgensen K.: Enterotoxin – producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 146–150 (1996)
- de Maagd R.A., Kwa M.S.G., Van Der Klei H., Yamamoto T., Schipper B., Vlak J.M., Stiekema W.J., Bosch D.: Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1537–1543 (1996)
- de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N.: How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Gen.* **17**, 193–199 (2001)
- de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E.: Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 409–433 (2003)
- Donovan W.P., M.R. Walters: Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 713–719 (2006) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Espinasse S., Gohar M., Chaufaux J., Buisson C., Perchat S., Sanchis V.: Occurrence of a common binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins CryIA from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4182–4186 (2002)
- Fang J., Xu X., Wang P., Zhao J.Z., Shelton A.M., Cheng J., Feng M.G., Shen Z.: Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 956–961 (2007)

27. Franco-Riviera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E.: Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Anton. v. Leeuwenhoek*, **86**, 87–92 (2004)
28. Garcia-Robles I., Sánchez J., Gruppe A., Martinez-Ramirez A.C., Rausell C., Real M. D., Bravo A.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 849–856 (2001)
29. Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M.: Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**, 242–246 (2002)
30. Green M.G., Heumann M., Sokolow R., Foster L.R., Bryant R., Kkeels M.: Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985–86. *Am. J. Public Health*, **80**, 848–852 (1990)
31. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185–189 (2001)
32. Hernandez E., Ramisse F., Ducoureaux J.P., Cruel T., Cavallo J.D.: *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotyp H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2138–2139 (1998)
33. Hernandez E., Ramisse F., Gros P., Cavallo J.D.: Super-infection by *Bacillus thuringiensis* H34 or 3a3b can lead to death in mice infected with the influenza A virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 177–181 (2000)
34. Hernández C.S., Martínez C., Pocar M., Caballero P., Ferré J.: Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I  $\beta$ -exotoxin production. *J. Invert. Pathol.* **82**, 57–62 (2003)
35. Hernández-Rodríguez C.S., Pérez-Guerrero S., Aldebis H.K., Vargas-Osuna E., Ferré J.: Binding of individual *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to the olive moth *Prays oleae* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Invert. Pathol.* **100**, 131–133 (2009)
36. High S.M., Cohen M.B., Shu Q.Y., Aitosaar I.: Achieving successful deployment of Bt rice. *Trends. Plant Sci.* **9**, 286–292 (2004)
37. Höfte H., Whiteley H.R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242–255 (1989)
38. Hughes P.A., Stevens M.M., Park H.W., Federici B.A., Dennis E.S., Akhurst R.: Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *J. Invert. Pathol.* **88**, 34–39 (2005)
39. Ihara H., Himeno M.: Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J. Invert. Pathol.* **98**, 177–183. (2008)
40. Ito A., Sasaguri Y., Kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M.: A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 21282–21286 (2004)
41. Jensen G.B., Larsen P., Jacobsen B.L., Madsen B., Smidt L., Andrup L.: *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4900–4905 (2002)
42. Joung K.B., Côté J.C.: A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Tech. Bull.* **29**: 1–18 (2000)
43. Jouzani G.S., S. Akbari: Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity of free-living and plant-parasitic nematodes. *Can. J. Microbiol.* **54**, 812–822 (2008) (praca jest dziełem 11 autorów)
44. Kitada S., Abe Y., Maeda T., Shimada H.: Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicol.* **264**, 80–88 (2009)
45. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K.: Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *J. Invert. Pathol.* **94**, 56–63 (2007)
46. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H.: Analysis of cry Gene Profiles in *Bacillus Thuringiensis* Strains Isolated During Epizootics in *Cydia pomonella* L. *Curr. Microbiol.* **55**, 217–222 (2007)
47. Kroeger A., Horstick O., Riedl C., Kaiser A., Becker N.: The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica*, **60**, 47–57 (1995)
48. Kumar N.S., Venkateswerlu G.: Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**, 113–120 (1998)
49. La Duc M.T., Satomi M., Agata N., Venkateswaran K.: *gyrB* as a polygenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J. Microbiol. Methods*, **56**, 383–394 (2004)
50. Lee D.W., Katayama H., Akao T., Maeda M., Tanaka R., Yamashita S., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M.: A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 57–63 (2001)
51. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palecar N., Chen J.S.: The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4648–4657 (2003)
52. Lonc E., Andrzejczak S.: Bioróżnorodność toksyn *Bacillus thuringiensis* i ich zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **44**, 253–263 (2005)
53. Martin P.A., Travers R.S.: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2437–2442 (1989)
54. Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarrett P., Burges H.D.: Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1344–1350 (1992)
55. Mehlo L., Gahakwa D., Nghia P.T., Loc N.T., Capell T., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R., Christou P.: An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7812–7816 (2005)
56. Milne R., Liu Y., Gauthier D., van Frankenhuyzen K.: Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *J. Invert. Pathol.* **99**, 166–172 (2008)
57. Mizuki E., Ohba M., Akao T., Yamashita S., Saitoh H., Park Y.S.: Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 477–486 (1999)
58. Mohammed S.H., M. Saedy M.A., Enan M.R., Ibrahim N.E., Ghareeb A., Salah. A., Moustafa S.A.: Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Cell. Mol. Biol.* **7**, 57–66 (2008)
59. Navon A.: *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. *Crop Protect.* **19**, 669–676 (2000)
60. Peferoen M.: Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Trends Biotechnol.* **15**, 173–177 (1997)
61. Perera O.P., Willis J.D., Adang M.J., Jurat-Fuentes J.L.: Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase



- phatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **39**, 294–302 (2009)
62. Peyronmet O., Vachon V., Schwartz J.L., Laprade R.: Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**, 45–54 (2001)
63. Pocar M., Caballero P.: Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 309–316 (2000)
64. Podlaski S.: Nowoczesne sposoby poprawy jakości nasion – otoczkowanie i taśmowanie nasion. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, **2**, 15–21 (1992)
65. Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux Ch., Lereclus D., Crickmore N.: *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**, 189–194 (2010)
66. Sampson M.N., Gooday G.W.: Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, **144**, 2189–2194 (1998)
67. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
68. Šebesta K., Sternbach H.: The specificity of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by *Bacillus thuringiensis* exotoxin. *FEBS Lett.* **8**, 233–235 (1970)
69. Shaban N.Z., Helmy M.H., El-Kersh M.A.R., Mahmoud B.F.: Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Compar. Biochem. Physiol. C*, **135**, 405–414 (2003)
70. Siegel J.P.: The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. *J. Invert. Pathol.* **77**, 13–21 (2001)
71. Sierpińska A.: *Bacillus thuringiensis*-stan obecny i perspektywy wykorzystania w ograniczaniu liczebności owadów liściożernych. *Sylwan*, **9**, 63–67 (1997)
72. Sierpińska A.: *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. *Prac. Inst. Leśn. A*, **2**, 71–99 (2000)
73. Sun M., Yu Z.: Recent developments in the biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Adv.* **18**, 143–145 (2000)
74. Świącicka I., Buczek J., Fiedoruk K.: *Bacillus thuringiensis* – w zwalczaniu owadów. *Medycyna Wet.* **57**, 859–962 (2001)
75. Świącicka I., De Vos P.: Properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from bank voles. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 60–64 (2003)
76. Tan F., Zhu J., Tang J., Tang X.: Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, *cry54Aa1* and *cry30Fa1*, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. *Curr. Microbiol.* **58**, 654–659 (2009)
77. Tanapongpipat S., Luxananil P., Promdonkoy B., Chewawiwat N., Audtho M., Panyim S.: A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 259–263 (2003)
78. Tsai S.F., Liu B.L., Liao J.W., Wang J.S., Hwang S., Wang S.C., Tzend Y.M., Ho S.P.: Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol.* **186**, 205–216 (2003)
79. van Frankenhuyzen K.: Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invert. Pathol.* **101**, 1–16 (2009)
80. Weinzierl R., Henn T., Koehler P.G.: Microbial insecticides. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN081> (1998), data potwierdzenia ważności adresu: 06 sierpień 2010
81. Xu Y., Nagai M., Bagdasarın M., Smith T.W., Walker E.D.: Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in recombinant gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3010–3015 (2001)
82. Yamashita S., Akao T., Mizuki E., Saitoh H., Higuchi K., Park Y. S., Kim H. S., Ohba M.: Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Can. J. Microbiol.* **46**, 913–919 (2000)
83. Zeigler D.R.: *Bacillus thuringiensis* & *Bacillus cereus*. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*. Seventh edition, vol. 2., The Ohio State University, USA (1999)
84. Zimmermann G., Weiser J.: Pathogens and diseases (w) Tortricide pests – their biology, natural enemies and control. World crop pests, red. L.P.S. der Geest, H.H. Evenhuis, 5, Elsevier, Amsterdam, 1991, s. 253–271