

BACILLUS THURINGIENSIS – NOWY POTENCJAŁ APLIKACYJNY

Aleksandra Gęsicka, Agata Henschke, Zuzanna Barańska,
Agnieszka Wolna-Maruwka*

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w październiku 2020 r.

Streszczenie: Owadobójcze właściwości *Bacillus thuringiensis* (Bt) sprawiają, że jest to cenny gatunek bakterii dla rozwoju rolnictwa. Produkowane przez Bt białka Cry i Cyt działają w sposób selektywny, dlatego ich stosowanie prowadzi do wyeliminowania tylko larw owadów docelowych. Znane są również inne substancje produkowane przez bakterie Bt, które mogą się przyczynić do eliminacji agrofagów i promowania wzrostu roślin. Ponadto podejmowane są próby stosowania szczepów *B. thuringiensis* w procesie bioremediacji terenów skażonych toksycznymi związkami organicznymi oraz w medycynie, w zwalczaniu patogenów ludzkich i zwierzęcych oraz komórek nowotworowych.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka gatunku *Bacillus thuringiensis*. 3. Czynniki wirulencji *Bacillus thuringiensis*. 4. Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie 5. Nowe możliwości wykorzystania bakterii *Bacillus thuringiensis*. 6. Podsumowanie

BACILLUS THURINGIENSIS – NEW APPLICATION POTENTIAL

Abstract: One of essential bacteria used in modern agriculture, in particular because of its ability to eradicate insects, is *Bacillus thuringiensis*. Cry and Cyt proteins produced by Bt are selective, therefore using those proteins eliminates only larvae of target insects. There are various other known substances produced by Bt bacteria, that may help with further elimination of pests and promoting plant growth. Furthermore, there are attempts being made to use Bt strains in bioremediation of contaminated sites as well as in medicine, especially in combating human and animal pathogens, or cancer cells.

1. Introduction. 2. Characteristics of *Bacillus thuringiensis*. 3. Virulence factors of *Bacillus thuringiensis*. 4. Applications of *Bacillus thuringiensis* in modern agriculture 5. Novel possible applications of *Bacillus thuringiensis*. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: *Bacillus thuringiensis*, białka Cry, bioinsektycydy, bioremediacja, medycyna

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Cry proteins, bioinsecticides, bioremediation, medicine

1. Wprowadzenie

Intensywne rolnictwo konwencjonalne polega na stosowaniu na szeroką skalę pestycydów, które poprzez eliminację patogenów umożliwiają pozyskanie wysokiego plonu roślin uprawnych. Według danych GUS, w 2018 roku ogólna ich produkcja w Polsce wyniosła 23178,4 ton. Stosowanie pestycydów, pomimo skuteczności ich działania cechuje wiele wad, przede wszystkim wykazują toksyczny wpływ na organizm człowieka, a także mogą kumulować się w glebie, doprowadzając do zaburzenia jej równowagi biologicznej [68, 82]. Związki zawarte w pestycydach cechują się dużą rozpuszczalnością w wodzie, przez co z łatwością przedostają się do organizmów żywych. Z tego powodu niewłaściwe stosowanie pestycydów, przykładowo podczas opadów deszczu lub nawadniania pól, powoduje zanieczyszczenie wód powierzchniowych i prowadzić może do zachwiania prawidłowego funkcjonowania procesów biologicznych. Istnieje również ryzyko ich przedostawania się do wód gruntowych [5]. W celu

regulacji racjonalnego stosowania pestycydów wprowadzono integrowaną ochronę roślin, która wykorzystuje różne metody i środki promujące odporność roślin na patogeny i szkodniki. Idea ta nie dąży do całkowitego wykluczenia stosowania związków chemicznych, ale do ograniczenia ich aplikacji na rzecz przyjaznych środowisku metod nie chemicznych [64].

Alternatywą dla pestycydów są preparaty przygotowane na bazie mikroorganizmów, które nie kumulują się w środowisku i nie wykazują antagonistycznego oddziaływania w stosunku do mikrobioty glebowej oraz organizmu ludzkiego i zwierzęcego. Od wielu lat dużym zainteresowaniem cieszą się preparaty zawierające szczepy bakterii *Bacillus thuringiensis* (Bt), stosowanych jako insektycydy. Działanie Bt opiera się na produkcji toksycznych białek krystalicznych Cry i cytotoksycznych białek Cyt, które selektywnie zwalczają owady niszczące uprawy roślin, nie oddziałując negatywnie na organizmy inne niż docelowe. Wyżej wymienione białka działają jedynie na stadium larwalne owadów, podczas gdy jaja oraz dorosłe osobniki nie są na

* Autor korespondencyjny: dr hab. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań; tel. 618466724; email: amaruwka@up.poznan.pl

niewrażliwe [24]. Działanie Cry opiera się na paraliżu mięśni układu pokarmowego, który uniemożliwia larwie dalsze żerowanie [20, 49], jak również uszkodzeniu nabłonka jelitowego, co prowadzi do śmierci larwy [24]. Bt jest wykorzystywany także w inżynierii genetycznej, gdzie odpowiedzialne za owadobójcze działanie geny są włączane do nasion roślin uprawnych, czyniąc je odpornymi na działanie agrofagów [41]. Do innych możliwych aplikacji *B. thuringiensis* należy promowanie wzrostu roślin oraz antagonistyczny wpływ na grzyby patogenne [44]. Ze względu na produkcję bakteriocyn, lipopeptydów oraz parasporyn niniejsze bakterie znalazły również zastosowanie w medycynie [31, 47]. Na uwagę zasługuje ponadto możliwość ich stosowania w bioremediacji terenów zanieczyszczonych toksycznymi związkami organicznymi [33].

2. Charakterystyka gatunku *Bacillus thuringiensis*

Bakterie *B. thuringiensis* zostały po raz pierwszy wyizolowane przez japońskiego naukowca Shigetane Ishiwata w 1901 roku z martwych larw jedwabnika *Bombyx mori*. Kilka lat później, w 1911 roku Bt został ponownie wyizolowany przez Ernsta Berlinera, również z martwych larw śródziemnomorskiej ćmy mącznej *Anagasta kuehniella*, pochodzących z młyna w Turynii. Ernst Berliner nazwał wyizolowany mikroorganizm *B. thuringiensis* na cześć tej niemieckiej prowincji. Odkrycia te przyczyniły się do opisanie biobójczych właściwości Bt wobec larw owadów, co zasugerowało jego możliwe zastosowanie jako biologiczny środek ochrony roślin [41, 65].

Gatunek *B. thuringiensis* należy do domeny *Bacteria*, typu *Firmicutes*, klasy *Bacilli*, rzędu *Bacillales*, rodziny *Bacillaceae* i rodzaju *Bacillus* [67]. Rodzaj *Bacillus* dzieli się na trzy grupy, przy czym *B. thuringiensis* jest zaliczany do grupy *B. cereus*, do której należą *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. toyonensis*, oraz *B. weihenstephanensis* [86]. Przez ostatnie 100 lat, ze względu na różnice w morfologii ich kolonii, właściwości metaboliczne, w tym oporność na penicylinę, bakterie te opisywano jako odrębne gatunki [58]. Cechą odróżniającą szczep *B. thuringiensis* od *B. cereus* jest obecność genów kodujących owadobójcze toksyny, zwykle znajdujących się na plazmidach [37]. Jarret i Stephenson [43] wykazali, że podczas hodowli *B. thuringiensis* z innymi bakteriami w obrębie grupy *B. cereus* może dochodzić do transferu plazmidu zawierającego geny *cry*, tym samym doprowadzając do produkcji owadobójczych białek przez inne mikroorganizmy. Z tego względu zidentyfikowanie bakterii jako *B. thuringiensis* jedynie na podstawie wykazywania zdolności do produkcji białek Cry może być niewiarygodne. Lepszym rozwiązaniem jest zastosowa-

nie nowoczesnych technik, takich jak real-time PCR z wykorzystaniem specyficznych biomarkerów, dzięki którym możliwe jest zidentyfikowanie obecności Bt w badanej próbce [86].

Bakterie *B. thuringiensis* można klasyfikować określając podgatunek, odmianę czy serotyp (odmiana mikroorganizmu, którą można określić za pomocą reakcji z użyciem przeciwciał). Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu charakterystycznych cech biochemicznych, różnych antygenów bakterii (serotypowanie H, antygeny kryształów parasporalnych) oraz identyfikacji produkowanych przez nie antybiotyków i esteraz [10, 51, 79]. Typową metodą stosowaną do klasyfikacji Bt jest serotypowanie H, które polega na wywołaniu reakcji immunologicznej wobec bakteryjnego antygeny – flagelliny, białka kodowanego przez gen *hag* [41]. Serotypowanie H ma jednak pewne ograniczenia, wynikające z nierozróżniania szczepów pochodzących z tego samego serotypu [10, 41, 53, 81].

Komórki *B. thuringiensis* są ruchliwymi, urzęsionymi na całej powierzchni, przetrwalnikującymi pałeczkami (d. laseczkami) o długości 2–5 µm oraz szerokości około 1 µm, które zwykle układają się w pary lub krótkie łańcuchy [21, 41]. Cykl życiowy tych Gram-dodatnich bakterii składa się z dwóch faz: wegetatywnego podziału komórki oraz rozwoju spor, inaczej zwanego cyklem sporulacji, który zachodzi przykładowo kiedy w środowisku nie ma wystarczającej ilości składników odżywczych [11, 21]. W trakcie rozmnażania komórka wegetatywna dzieli się na dwie identyczne komórki potomne przez uformowanie nowej ściany komórkowej w połowie błony plazmatycznej. W fazie sporulacji podział komórki przebiega nieco inaczej, jest on asymetryczny i składa się z 7 etapów. W I etapie powstaje filament aksjalny, w etapie II formuje się septum, a w III powstają kryształy parasporalne oraz prespora. Następnie, w etapie IV formuje się egzospora, pierwotna ściana komórkowa, nukleoid oraz osłony białkowe, a jąderko spory ulega przekształceniu. W ostatniej fazie sporulacji (VII) następuje dojrzewanie spor, liza komórki i uwolnienie form przetrwalnych [13, 41, 58].

Kryształy parasporalne są inkluzjami wewnątrzkomórkowymi, zbudowanymi ze skryształizowanego polipeptydu, składającego się z białek Cry, który warunkuje bioaktywność *B. thuringiensis* [65, 84]. Białka Cry są toksyczne dla insektów z rzędów *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Dictyoptera*, *Ortoprea* i *Mallofaga* oraz dla niektórych nicieni, pierwotniaków i roztoczy [3, 84]. Z prowadzonych badań wiadomo, że konkretny szczep *B. thuringiensis* może być wykorzystany do walki z konkretnym gatunkiem owada, np. na *Lepidoptera* działa *B. subsp. kurstaki* oraz *aizawai*, na *Coleoptera* z kolei *B. subsp. tenebrionis*, a na *Diptera* *B. subsp. israelensis* [34]. Wiele toksyn Cry wykazuje niskie aktywności toksyczne przeciwko

komarom, a najbardziej użytecznym w ich zwalczaniu jest szczep *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Jest on wysoce toksyczny w stosunku do różnych gatunków tych owadów, szczególnie dla: *Aedes*, *Culex* i *Anopheles*, które stanowią wektory dla takich chorób, jak żółta febra oraz denga, ale charakteryzuje się jedynie średnią toksycznością względem wektorów malarii [19, 20].

3. Czynniki wirulencji *Bacillus thuringiensis*

Owadobójcze zdolności bakterii z gatunku *B. thuringiensis* opierają się na produkowanych przez nie w procesie sporulacji parasporalnych kryształach, przeważnie złożonych z jednego lub paru białek Cry (Crystal) lub Cyt (Cytolitic) [19]. Toksyny te nazywane są także δ -endotoksynami. Niniejsze nazewnictwo wprowadzone zostało przez Heimpel'a w 1967 roku, ze względu na fakt, że białka te formowane są wewnątrz komórek oraz dlatego, że odkryto je jako czwarte z kolei toksyczne komponenty u tego gatunku bakterii [41]. Toksyny Cry oficjalnie definiuje się jako parasporalne kryształy białek o aktywności owadobójczej [25]. Natomiast do toksyn Cyt zalicza się parasporalne białka Bt, wykazujące aktywność hemolityczną. Stwierdzono, że niniejsze toksyny są wysoce specyficzne w działaniu, w stosunku do docelowych owadów, nieszkodliwe dla ludzi, kręgowców i roślin oraz kompletnie biodegradowalne [19].

Białka Cry wydzielane są w formie rozpuszczalnej w wodzie i należą do grupy toksyn formujących kanały błonowe (pore-forming toxins, PFT) w membranie komórek gospodarza. Powstają w wyniku ekspresji genów *cry*, jako monomery zdolne do oligomeryzacji, czyli łączenia się kilku łańcuchów polipeptydowych w jedną cząsteczkę. Zdolność do zmiany konformacji tych białek jest niezbędnym elementem w procesie ich toksycznego oddziaływania na komórki larw owada, umożliwiającym im wchodzenie w strukturę membrany jelita gospodarza. Inaczej działają toksyny Cyt, które bezpośrednio wchodzą w interakcje z lipidami membrany i wnikają do niej. Badania wskazują, że białka Cyt synergizują lub przełamują odporność przeciw białkom Cry, przez funkcjonowanie jako receptor do wiązania Cry z membraną jelita owada [4, 41].

Mechanizm działania toksycznych białek wytwarzanych przez *B. thuringiensis* jest podobny u wszystkich rzędów owadów. W przeciwieństwie do chemicznych pestycydów, które w większości są toksynami kontaktowymi, białka Cry muszą zostać spożyte przez owada, żeby mogły stać się toksyczne [40]. Według Melo i wsp. [59] oraz Hung i wsp. [40] po spożyciu *B. thuringiensis* przez larwy owada, wyprodukowane przez nie kryształy białek Cry ulegają rozpuszczaniu w jelicie, a następnie w kolejnym etapie uwalniane są protoksyny, nie-

aktywne jeszcze toksyny, których przejście do formy czynnej zachodzi na drodze enzymatycznej [40, 59]. Enzymy odpowiedzialne za ten proces to trawienne proteazy gospodarza; serynowe u przedstawicieli rzędu *Lepidoptera* i *Diptera* oraz cysteinowe i asparaginowe u owadów z rzędu *Coleoptera* [49]. Tak zaktywowane toksyny wiążą się do specyficznych receptorów kadherynowych na powierzchni membrany komórek epitelialnych jelita, po czym ich konformacja ulega zmianie [41, 49]. Następnie zostają wbudowane w błonę jelita, gdzie dochodzi do ich oligomeryzacji i tworzenia kanałów [19]. Białka Cry wchodzą także w kontakt z dodatkowymi receptorami jelita – N-aminopeptydazami, które odpowiadają za zakotwiczenie formujących się kanałów w dwuwarstwie lipidowej jelita [41, 59]. Natomiast białka Cyt wiążą się bezpośrednio z lipidami membrany komórek nabłonka jelita, także tworząc kanały w ich błonie lub niszcząc ją przez oddziaływanie podobne do detergentu [19].

Już w latach 80 ubiegłego wieku Knowles i Ellar [48] stwierdzili, że powstające w błonie komórek jelita kanały są głównym elementem mechanizmu toksycznego działania endotoksyn *B. thuringiensis*, gdyż prowadzą do wystąpienia lizy osmotycznej i śmierci komórki [18, 40, 55]. Dokładnie liza komórek epitelialnych jelita wywoływana jest przez zmianę ciągłości i utratę funkcyjności membrany, powodowaną przez powstające w niej kanały [12, 36, 91]. Zhang i wsp. [92] przedstawili inny możliwy model działania białek Cry na komórki owada, który zaprzecza wcześniejszej teorii. Zdaniem niniejszych autorów samo formowanie kanałów litycznych jest niewystarczające do spowodowania śmierci komórki. Zaproponowany model zakłada, że śmierć komórek owadzych wywołana jest nie przez stres osmotyczny, a szereg reakcji zmieniających metabolizm komórkowy, do których zachodzi po związaniu toksyny Cry z receptorem jelitowym. Według tej teorii wiązanie białka Cry do kadheryn i N-aminopeptydaz wywołuje, w jeszcze dokładnie niepoznanym procesie przekaz bodźca aktywującego kanały Mg^{2+} w błonie plazmatycznej komórek epitelialnych owadów, czego następstwem jest zwiększenie poziomu komórkowego cAMP (cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan) [91, 92]. Do śmierci komórek dochodzi w wyniku działania kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP. Niniejsze zjawisko nazywamy onkozą, gdyż zaobserwowana przez Zhang i wsp. [92] śmierć poddanych transfekcji komórek pobranych z jajnika *Trichoplusia ni*, nie wykazywała cech charakterystycznych dla apoptozy ani endocytozy, a powodowana była przez ich pęcznienie oraz zwiększoną przepuszczalność membrany [85]. Niezależnie od przyjętej teorii, co do dokładnego cytotoksycznego wpływu białek Cry na komórki epitelialne jelita, wiadomo, że ich zniszczenie wywołuje paraliż jelita środkowego larw owadów i prowadzi do

śmierci w wyniku wygłodzenia. Zdaniem Raymonda i wsp. [73] niekiedy do śmierci owada może także dochodzić w wyniku postępującej infekcji bakteryjnej i wywołania posocznicy. Dzieje się tak, gdy przez zniszczone komórki nabłonka jelita do hemolimfy owada przedostają się wegetatywne komórki *B. thuringiensis*. Wówczas ich namnażanie w organizmie larwy może prowadzić do ciężkiej infekcji bakteryjnej – sepsy, skutkującej śmiercią.

Choć owadobójczość *B. thuringiensis* opiera się głównie na toksycznych białkach Cry, to bakterie te produkują także inne czynniki wirulentne. Czynniki te mogą samodzielnie wpływać biobójczo na owady, np. białka Vip, proteiny Sip oraz beta-egzotoksyna lub działać synergistycznie wraz z toksynami Bt, np. proteina P20, czy enzym chitynaza [49]. Podczas wegetatywnej fazy wzrostu bakterie *B. thuringiensis* wytwarzają białka Vip (vegetative insecticidal proteins), które wykazują działanie insektycydowe nawet na owady, które wykształciły odporność na białka krystaliczne oraz beta-egzotoksynę, stanowiącą inhibitor dla polimerazy RNA zależnej od DNA. Wspomniana wyżej egzotoksyna wpływa negatywnie nie tylko na bezkręgowce, ale także na kręgowce, dlatego szczepy charakteryzujące się ich syntezą, nie mogą być wykorzystywane do produkcji biopestycydów [32, 38]. Chitynaza poza wykazywaniem właściwości synergistycznych wobec toksyn Cry jest istotnym enzymem biorącym udział w infekcji owadów, gdyż doprowadza do powstawania perforacji w błonie komórek jelita owadów, umożliwiając przedostanie się bakterii do hemocelu (jama ciała u niektórych bezkręgowców) [77]. Natomiast ekspresja genu odpowiadającego za produkcję białka P20 wpływa na potranskrypcyjne zwiększenie akumulacji białek krystalicznych w komórce i może pełnić także funkcję stabilizującą dla białek Cry [88].

4. Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie

Postęp cywilizacyjny oraz obowiązujące prawodawstwo wymagają stosowania innowacyjnych środków ochrony roślin w rolnictwie, w tym również tych opracowanych na bazie mikroorganizmów. Ciągłe dążenie do zwiększenia produkcji żywności, w związku ze stałym wzrostem ludności na świecie pociąga za sobą nadmierne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Wysoce istotne wydaje się otrzymywanie wysokiego plonu roślin, przy zachowaniu tej samej powierzchni uprawy, zadbanie o zachowanie bezpieczeństwa ludzi, zwierząt i środowiska, a także zapewnieniu plonu wolnego od patogenów.

Obecnie często odnotowywanym zjawiskiem jest nabywanie odporności przez owady na chemiczne

środki ochrony roślin, co prowadzi do stosowania większych ich dawek, a tym samym przyczynia się do zaburzenia funkcjonowania całych agrobiocenoz [26]. W celu regulacji powyższych kwestii w dniu 21 października 2009 roku wprowadzona została dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE, zgodnie z którą niezwykle istotne jest wykazanie, że środki ochrony roślin nie wpływają negatywnie na środowisko, a jednocześnie zapewniają jednoznaczne korzyści dla produkcji rolnej [27]. W Polsce integrowaną ochronę roślin definiuje Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz. U. poz. 455) [28, 29], która nastawiona jest na wykorzystanie metod minimalizujących zużycie chemicznych środków ochrony roślin, zastosowanie odpowiedniej agrotechniki, stosowanie tolerancyjnych lub odpornych odmian roślin oraz zwalczanie patogenów na drodze biologicznej [30]. W Art. 35 wyżej wymienionej ustawy podkreślona została zasadność stosowania preparatów biologicznych, w sposób nie zagrażający środowisku, a także bezpieczny dla zdrowia ludzi i zwierząt [29].

Stosowanie biologicznych środków ochrony roślin jest doskonałą alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Preparaty zawierające w swoim składzie Bt nie wykazują negatywnego oddziaływania na człowieka oraz nie zanieczyszczają środowiska, a dodatkowym ich atrybutem jest stosunkowo niski koszt. Ponadto bardzo rzadko powodują wykształcenia odporności u larw owadzych, aczkolwiek jest to możliwe [56].

Bioinsektycydy na bazie Bt cieszą się dużą popularnością. Już w 2006 roku biopreparaty, zawierające w swoim składzie spory *B. thuringiensis* i kryształy białkowe przez nie wytwarzane, stanowiły 75% światowego rynku biologicznych środków ochrony roślin [49, 83].

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań nad sposobem produkcji bakteryjnych bioinsektycydów na bazie alternatywnych mediów, takich jak: melasa, skrobia, w tym skrobia kukurydziana, ziarna zbóż, otręby pszenne czy słoma ryżowa, a także osady ściekowe czy osady z sadzawek krewetek [7, 13, 64, 85, 94]. Surowce te dzięki temu, że stanowią odpady z produkcji rolno-przemysłowej są znacznie tańsze niż konwencjonalnie stosowane syntetyczne media zawierające soję, czystą glukozę czy ekstrakt z kukurydzy. Zastosowanie tańszych podłoży do namnażania bakterii *B. thuringiensis*, stanowiących nawet 50% całkowitych kosztów produkcji, pozwala na znaczne zmniejszenie kosztowności niniejszego procesu [95]. Dodatkowo możliwość wykorzystania odpadów jako podłoży do hodowli Bt rozwiązuje problem z ich utylizacją. Badania prowadzone przez Brar i wsp. [15] oraz Zhuang i wsp. [93, 94] wykazują, że przy zastosowaniu odpowiednich metod produkcji, także stosowanie ścieków czy różnego typu osadów komunalnych daje zadowalające rezultaty względem promowania rozwoju bakterii,

Tabela I
Przykładowe insektycydy zawierające *Bacillus thuringiensis* dostępne na rynku europejskim

Preparat	Producent	Kraj producenta	Szczep Bt	Docelowa grupa owadów
XenTari®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	<i>Lepidoptera</i>
Agree 50 WG	Mitsui AgriScience International	Belgia	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep GC-91	
Xtreem®	KENOGARD	Hiszpania	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	
DiPel®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	<i>Lepidoptera</i>
Biobit®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	
Delfin WG	Mitsui AgriScience International	Belgia	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep SA-11	
LEPINOX® Plus	CBC (Europe)	Włochy	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep EG 2348	
VectoBac®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>israelensis</i> szczep AM65-52	<i>Diptera</i>
Novodor®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>tenebrionis</i>	<i>Coleoptera</i>

Na podstawie: [51, 83, 90].

sporulacji i formowania toksyn, w porównaniu do zwykle stosowanych w tych procesach mediów sojowych. Jednym z głównych problemów w stosowaniu osadów ściekowych jako alternatywnego źródła dla produkcji mikrobiologicznych środków ochrony roślin jest obecność w nich metali ciężkich, gdyż w nieodpowiednim stężeniu mogą hamować wzrost i rozwój bakterii.

Przykładowe biologiczne środki ochrony roślin skonstruowane na bazie Bt, wykazujące selektywne oddziaływanie na poszczególne organizmy owadzie, zebrane zostały w tabeli nr I [49, 80, 87]. Insektycydy zawierające w swoim składzie szczep *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* działają biobójczo na owady z rzędu *Diptera*, do których zaliczamy lenie. Ich larwy żerują na korzeniach młodych roślin warzywnych i zbóż. Natomiast najbardziej znane spośród szkodników roślin kapustowatych larwy bielinka kapustnika oraz bielinka rzepnika (rząd *Lepidoptera*), powodujące gołozery liści, są zwalczane przez *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* lub subsp. *kurstaki* [63].

Zastosowanie mikrobiologicznych środków ochrony roślin niesie ze sobą wiele korzyści dla środowiska. Jednakże, niezwykle istotna jest wiedza i świadomość użytkowników niniejszych biopreparatów, pozwalająca na prawidłowe rozpoznanie żerujących owadów i ukierunkowane dobranie odpowiedniego szczepu *B. thuringiensis*.

5. Nowe możliwości wykorzystania bakterii *Bacillus thuringiensis*

Zastosowanie *B. thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie, jako bioinsektycydów oraz w konstruowaniu roślin GMO odpornych na szkodniki owadzie, to jeden z obszarów analiz dotyczących tego gatunku bakterii. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały ponadto możliwość zastosowania niektórych szcze-

pów Bt w biologicznej kontroli grzybów patogennych, w promowaniu wzrostu roślin, bioremediacji gleb skażonych oraz w produkcji związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej [44].

Rośliny uprawne podatne są na wiele chorób, w tym również wywołanych przez grzyby patogenne. Wykazano, że bakterie *B. thuringiensis* przejawiają aktywność przeciwgrzybiczą, głównie w stosunku do patogenów z rodzaju *Fusarium* [35, 75, 76], *Sclerotium* [74, 78] oraz *Rhizoctonia* [35]. Antagonistyczne działania Bt w stosunku do wyżej wymienionych patogenów oparte jest na produkcji chitynaz oraz proteaz, enzymów przyczyniających się do trawienia strzępek patogenów oraz wytwarzaniu lipopeptydu – fengicyny (fengycin). Wykazano, że właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze niniejszego antybiotyku dają możliwość zastosowania go jako środka biokontroli, nie tylko w rolnictwie, ale również w medycynie [47].

Niektóre szczepy *B. thuringiensis* kolonizujące korzenie roślin, zalicza się do grupy PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), które poprzez produkcję witamin oraz fitohormonów pozytywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin. Potencjał wykorzystania Bt lub ich mieszanin z innymi mikroorganizmami, w postaci nawozów biologicznych poprawiających rozwój roślin, zaobserwowano na przykładzie uprawy soi, groszku polnego, soczewicy, czy kukurydzy [6, 8, 60, 61]. Bai i wsp. [8] wykazali, że koinokulacja soi szczepami *B. thuringiensis* NEB17 oraz *Bradyrhizobium japonicum* istotnie poprawiła wzrost roślin. Pozytywny wpływ koinokulacji soi szczepem *B. thuringiensis* KR1 oraz *B. japonicum* na plon roślin zaobserwowali również w swoich badaniach Mishra i wsp. [61]. Z badań wyżej wymienionych autorów wynika ponadto, że zastosowanie Bt KR1 wraz z *Rhizobium leguminosarum*-PR1 w większym stopniu wpływało na wzrost groszku polnego i soczewicy, niż inokulacja roślin jedynie szczepem *R. leguminosarum*-PR1 [60]. Pomimo, że wyniki badań prowadzonych

nad pozyskiwaniem szczepów Bt o wysokiej aktywności PGPB są bardzo obiecujące, to na rynku bionawozów nadal nie ma preparatu, który by na nich bazował. Dlatego też dokładniejsze zrozumienie mechanizmu interakcji pomiędzy niniejszymi bakteriami a roślinami wydaje się być niezbędne [44].

Obecnie prowadzone są również badania dotyczące zastosowania bakterii *B. thuringiensis* w procesie bioremediacji gleb skażonych. Zanieczyszczenie środowiska związkami chemicznymi stanowi ogromny problem ekologiczny, dlatego poszukuje się opłacalnych i efektywnych metod usuwania tych substancji z gleby, wody czy powietrza. Do degradacji związków organicznych zanieczyszczających glebę wykorzystuje się mikroorganizmy, które na drodze bioremediacji prowadzą do całkowitej ich utylizacji [33]. *B. thuringiensis* poza właściwościami owadobójczymi wykazuje zdolność do rozkładu niektórych toksycznych związków organicznych. Z przeglądu literatury wynika, że był on stosowany do rozkładu ftalanu dimetylu [16], fipronilu [57], trifenylocyny [39], bisfenolu A [54] czy policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PHA), takich jak np. fenantren, a także niektórych pestycydów np. imidakloprydu [33] czy cyhalotryny [22]. Z badań Brar i wsp. [16] wynika, że *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* produkuje specyficzne enzymy odpowiedzialne za biodegradację DMP (ftalan dimetylu), dzięki czemu jest w stanie wzrastać na podłożu zanieczyszczonym tym związkiem i wykorzystywać go jako źródło węgla. Wyizolowany przez Chen i wsp. [22] szczep *B. thuringiensis* ZS-19 wykazywał zdolność całkowitego rozkładu cyhalotryny, już w przeciągu 72 h. Mandal i wsp. [57] zaobserwowali, że obecność bakterii *B. thuringiensis* w środowisku zanieczyszczonym fipronilem znacznie przyspiesza tempo jego rozkładu, zmniejszając wykrywalność fipronilu w glebie z ponad 56 dni do 35–42 dni. Yi i wsp. [89, 90] w badaniach z wykorzystaniem szczepu *B. thuringiensis* GIMCC1.817 uzyskali niemal 80% stopień degradacji trifenylocyny (TPT) już w ciągu 7 dni, związany z efektem zerwania przez bakteryjny cytochrom P450 wiązania węgla-metal w cząsteczce TPT. Natomiast Li i wsp. [54] uzyskali w ciągu 24 h 85% wydajność degradacji bisfenolu A, którego mineralizacja opiera się najpewniej na działaniu NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). Wyniki uzyskane przez Ferreira i wsp. [33] wskazują także na wysoki potencjał niniejszego gatunku bakterii w mineralizowaniu różnorodnych wielopierścieniowych związków aromatycznych, a także chemicznych pestycydów, co zdaniem wyżej wymienionych autorów wpływa na zwiększenie atrakcyjności tego gatunku do zastosowań w procesie bioremediacji.

Bakterie *B. thuringiensis* poza produkcją toksycznych białek, wytwarzają także inne związki oddziałujące na organizmy żywe, wykorzystywane w medy-

cynie, takie jak bakteriocyny, nanocząsteczki srebra, czy parasporyny o aktywności przeciwnowotworowej. Cechą znacznej większości bakterii jest syntezowanie przynajmniej jednej bakteriocyny [71]. Bakteriocyny są naturalnymi peptydami wpływającymi hamująco na wzrost zarówno gatunków bakterii z nimi niespokrewnionych, jak i blisko spokrewnionych [9]. W przeciwieństwie do antybiotyków, które stanowią metabolity wtórne mikroorganizmów, bakteriocyny są produktami syntezy rybosomalnej, wykazującymi wąskie spektrum działania [14]. Do roku 2013 poznanych zostało 18 różnych bakteriocyn wytwarzanych przez szczepy *B. thuringiensis*, m.in. subsp. *morrisoni*, *kurstaki*, *entomocidus*, *tolworthi*, czy *thuringiensis* [52]. Związki te wykazują inhibicję względem wielu patogennych bakterii ludzi i zwierząt, takich jak *Staphylococcus aureus* [9], *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus larvae*, czy inne gatunki *Bacillus* [23], a także bakterie *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, czy *Shigella flexneri* [71]. Zainteresowanie badaniami nad bakteriocynami wynika z potencjału ich praktycznego stosowania w medycynie zamiast antybiotyków, w związku z coraz częstszym pojawianiem się szczepów bakterii opornych na wiele z nich [44, 52]. Poza bakteriocynami, związkami produkowanymi przez *B. thuringiensis*, przydatnymi w zwalczaniu mikroorganizmów są lipopeptydy np. kurstakina (kurstakin), czy wspomniana już wcześniej fengicyna [31]. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* wykazują również zdolność do produkcji nanocząsteczek srebra, które charakteryzują się wysoką aktywnością toksyczną względem różnych patogennych bakterii, przykładowo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, czy *E. faecalis* [42, 46, 66]. Badania przeprowadzone przez Khaleghi i wsp. [46] wykazały, że nanocząsteczki srebra o średnicy 42 nm wykazywały działanie bakteriobójcze względem wszystkich sześciu, wyżej wymienionych gatunków mikroorganizmów referencyjnych. Zdaniem niniejszych autorów rozwój technologii wytwarzania nanocząsteczek przez Bt ma duży potencjał do produkcji preparatów eliminujących i zabezpieczających powierzchnie sprzętu medycznego przed powstawaniem biofilmu, w skład którego wchodzić mogą patogenne bakterie.

Wśród szczepów *B. thuringiensis* wykryto również izolaty wykazujące aktywność cytotoksyczną względem kilku ssaczych linii komórkowych oraz zidentyfikowano parasporyny nakierowane na nowotworowe komórki ssacze [1]. Parasporyny (PS) są to białka Cry, które nie wykazują aktywności insektycydowej, ani hemolitycznej, za to charakteryzują się cytotoksycznością w stosunku do komórek nowotworów ludzkich, jednocześnie nie wpływając na zdrowe komórki organizmu [69]. Z 6 subklas tych związków, szczególnie szeroko badane są parasporyny-2 (PS2), które

wykazują przeciwnowotworowe działanie względem zmutowanych linii komórek jelita grubego [2, 17, 50, 62, 72], wątroby [2, 17], szyjki macicy [17, 50], piersi [17], prostaty [17], chłoniaka [72] oraz białaczki [62]. Badania prowadzone przez Katayama i wsp. [45] wykazały, że również parasporyny-1 (PS1) wykazują aktywność przeciwnowotworową względem tumorów szyjki macicy, wątroby, jak również białaczki. Natomiast białko Cry45Aa, zaliczane do parasporyn-4 (PS4), wyizolowane z komórek Bt przez Okumura i wsp. [70], działało cytotoksycznie na linię komórek raka jelita grubego, wątroby oraz chłoniaka. Mechanizmy działania parasporyn na komórki nowotworowe są różne i zależne od docelowego rodzaju komórek na jakie oddziałują. PS1 oddziałują cytotoksycznie na komórki nowotworowe poprzez aktywowanie sygnałów apoptozy oraz zwiększenie stężenia Ca^{2+} wewnątrz nich. PS2 przez tworzenie kanałów w membranie komórek nowotworowych, zbliżone są w swoim działaniu do insektycydowych białek Cry. Natomiast PS4 doprowadzają do śmierci komórek nowotworów przez niespecyficzne wiązanie do błony i tworzenie w nich kompleksów oligomerycznych [44]. Głębsze poznanie mechanizmu ich działania na komórki rakowe i ogólnego wpływu na organizm człowieka stwarza ogromne możliwości w zastąpieniu nimi różnego rodzaju farmaceutyków stosowanych w medycynie.

6. Podsumowanie

Wzrost świadomości społeczeństwa na temat zagrożeń wynikających z szerokiego stosowania związków chemicznych w uprawach roślin, ich wpływu na środowisko i organizm ludzki, przyczynił się do zwiększenia zainteresowania biologicznymi środkami ochrony roślin. Popularną alternatywę dla chemicznych insektycydów stanowią preparaty na bazie *B. thuringiensis*, które charakteryzują się wysoką skutecznością działania, nie kumulują się w glebie i nie doprowadzają do zaburzenia jej równowagi biologicznej. Ponadto niektóre szczepy Bt poprzez produkcję metabolitów wtórnych oraz indukowanie odporności roślin przyczyniają się do biologicznej kontroli i promowania ich wzrostu i rozwoju. W ostatnich latach wykazano szerokie możliwości zastosowania tych bakterii poza obszarem rolniczym, przykładowo w bioremediacji terenów skażonych, w medycynie; w niszczeniu patogenów bakteryjnych, czy komórek nowotworowych. Prowadzenie dalszych badań nad *B. thuringiensis* powinno się skupiać na poszukiwaniu nowych, wydajniejszych szczepów, jak również optymalizacji procesów prowadzonych z ich udziałem, zmierzających do uzyskania nowych farmaceutyków, fungicydów, bionawozów oraz preparatów stosowanych w procesie bioremediacji terenów skażonych.

Piśmiennictwo

- 1 Abe Y., Inoue H., Ashida H., Maeda Y., Kinoshita T., Kitada S.: Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *J. Invertebr. Pathol.* **142**, 71–81 (2017)
- 2 Abe Y., Shimada H., Kitada S.: Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity. *J. Biochem.* **143**, 269–275 (2008)
- 3 Ackermann H.W., Azizbekyan R.R., Bernier R.L., de Barjac H., Saindoux S., Valéro J.R., Yu M.X.: Phage typing of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*. *Res. Microbiol.* **146**, 643–657 (1995)
- 4 Adang M.J., Crickmore N., Jurat-Fuentes J.L.: Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Adv. Insect Phys.* **47**, 39–87 (2014)
- 5 Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., García-Río L.: The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* **123**, 247–260 (2008)
- 6 Armada E., Azcón R., López-Castillo O.M., Calvo-Polanco M., Ruiz-Lozano J.M.: Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **90**, 64–74 (2015)
- 7 Azmi N.U., Ghafar N.S.A., Yin C.J., Yakubu S., Adli A.A., Aziz N.A.A., Mustafa M.: Toxicity of *Bacillus thuringiensis* biopesticide produced in shrimp pond sludge as alternative culture medium against *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Acta Biol. Malaysiana.* **4**, 5–16 (2015)
- 8 Bai Y., Zhou X., Smith D.L.: Crop ecology, management and quality: Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **43**, 1774–1781 (2003)
- 9 Barboza-Corona J.E., de la Fuente-Salcido N., Alva-Murillo N., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E.: Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **138**, 179–183 (2009)
- 10 de Barjac H., Frachon E.: Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* **35**, 233–240 (1990)
- 11 Bartoszewicz M., Czyżewska U.: Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* sensu lato. *Post. Mikrobiol.* **56**, 440–450 (2017)
- 12 Baxter S. W., Badenes-Pérez F.R., Morrison A., Vogel H., Crickmore N., Kain W., Wang P., Heckel D.G., Jiggins C.D.: Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics* **189**, 675–679 (2011)
- 13 Bechtel D. B., Bulla L. A.: Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation. *J. Ultrastructure Res.* **79**, 121–132 (1982)
- 14 Błaszczuk U., Moczarny J.: Bakteriocyliny bakterii Gram-ujemnych – struktura, mechanizm działania i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **55**, 157–171 (2016)
- 15 Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y.: Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Res.* **40**, 1310–1320 (2006)
- 16 Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y.: Concurrent degradation of dimethyl phthalate (DMP) during production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *J. Hazard. Mater.* **171**, 1016–1023 (2009)
- 17 Brasseur K., Auger P., Asselin E., Parent S., Côté J.C., Sirois M.: Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces

- caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*. **10**, 1–22 (2015)
- 18 Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón M.: Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1667**, 38–46 (2004)
 - 19 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)
 - 20 Bravo A., Likitvivanavong S., Gill S.S., Soberón M.: *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 423–431 (2011)
 - 21 Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I., Fitz-James P.C.: Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**, 147–204 (1980)
 - 22 Chen S., Deng Y., Chang C., Lee J., Cheng Y., Cui Z., Zhou J., He F., Hu M., Zhang L.H.: Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015)
 - 23 Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A.: Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol. Res.* **163**, 684–692 (2008)
 - 24 Ciesielska J., Malusá E., Sas – Paszt L.: Środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie ekologicznym. Opracowanie innowacyjnych technologii dla ekologicznej produkcji roślin sadowniczych. praca **3**, 1–81 (2011)
 - 25 Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
 - 26 Dominik A., Schönthaler J.: Integrowana ochrona roślin w gospodarstwie. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie (2012)
 - 27 Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej: Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG, z dnia 21.10.2009 roku (2009)
 - 28 Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej: Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (2009)
 - 29 Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej: Ustawa o środkach ochrony roślin z dnia 8.03.2013 roku, Warszawa (2013)
 - 30 Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej: Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o ochronie roślin z dnia 12.03.2014 roku, Warszawa (2014)
 - 31 Fagerlund A., Dubois T., Økstad O.A., Verplaetse E., Gilois N., Bennaceur I., Perchat S., Gominet M., Aymerich S., Kolstø A.B., Lereclus D., Gohar M.: SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, **9**, e87532 (2014)
 - 32 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)
 - 33 Ferreira L., Rosales E., Danko A.S., Sanromán M A., Pazos M.M.: *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. *Process Saf. Environ. Prot.* **101**, 19–26 (2016)
 - 34 Frankenhuyzen K. van: Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* **101**, 1–16 (2009)
 - 35 Gomaa E.Z.: Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* **50**, 103–111 (2012)
 - 36 Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M.: Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**, 242–246 (2002)
 - 37 Helgason E., Økstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2627–2630 (2000)
 - 38 Hernández C. S., Martínez C., Porcar M., Caballero P., Ferré J.: Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *J. Invertebr. Pathol.* **82**, 57–62 (2003)
 - 39 Huang J., Ye J., Ma J., Gao J., Chen S., Wu X.: Triphenyltin bio-sorption, dephenylation pathway and cellular responses during triphenyltin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* and tea saponin. *Chem. Eng. J.* **249**, 167–173 (2014)
 - 40 Hung T.P., Truong L.V., Binh N.D., Frutos R., Quiquampoix H., Staunton S.: Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. *Environ. Pollut.* **208**, 318–325 (2016)
 - 41 Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A.: *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs.* **1**, 31–50 (2010)
 - 42 Jain D., Kachhwaha S., Jain R., Srivastava G., Kothari S.: Novel microbial route to synthesize nanoparticles using spore crystal mixture of *Bacillus thuringiensis*. *Indian J. Exp. Biol.* **48**, 1152–1156 (2010)
 - 43 Jarrett P., Stephenson M.: Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1608–1614 (1990)
 - 44 Jouzani G. S., Valijanian E., Sharafi R.: *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 2691–2711 (2017)
 - 45 Katayama H., Yokota H., Akao T., Nakamura O., Ohba M., Mekada E., Mizuki E.: Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* **137**, 17–25 (2005)
 - 46 Khaleghi M., Khorrami S., Ravan H.: Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **18**, 101047 (2019)
 - 47 Kim P. I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.T.: Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 942–949 (2004)
 - 48 Knowles B.H., Ellar D.J.: Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* **924**, 509–518 (1987)
 - 49 Konecka E., Kaznowski A., Baranek J.: Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis*. *Post. Mikrobiol.* **50**, 303–311 (2011)
 - 50 Krishnan K., Ker J.E.A., Mohammed S.M., Nadarajah V.D.: Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–11 (2010)
 - 51 Krywienczyk J., Dulmage H.T., Fast P.G.: Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3 ab var. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* **31**, 372–375 (1978)

- 52 de la Fuente-Salcido N.M., Casados-Vázquez L.E., Barboza-Corona J.E.: Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can. J. Microbiol.* **59**, 515–522 (2013)
- 53 Lecadet M.M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiéry I.: Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 660–672 (1999)
- 54 Li C., Lu Q., Ye J., Qin H., Long Y., Wang L., Ou H.: Metabolic and proteomic mechanism of bisphenol A degradation by *Bacillus thuringiensis*. *Sci. Total Environ.* **640**, 714–725 (2018)
- 55 De Maagd R. A., Bravo A., Crickmore N.: How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* **17**, 193–199 (2001)
- 56 Malinowski H.: Powstawanie odporności na insektycydy u owadów. *Pr. Inst. Badaw. Leśnictwa*. seria A, **1** [908–912], 5–40 (2001)
- 57 Mandal K., Singh B., Jariyal M., Gupta V.K.: Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **93**, 87–92 (2013)
- 58 Maughan H., Van der Auwera G.: *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 789–797 (2011)
- 59 Melo A.L.D.A., Soccol V.T., Soccol C.R.: *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 317–326 (2016)
- 60 Mishra P.K., Mishra S., Selvakumar G., Bisht J.K., Kundu S., Gupta H.S.: Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 753–761 (2009)
- 61 Mishra P.K., Mishra S., Selvakumar G., Kundu S., Shankar Gupta H.: Enhanced soybean (*Glycine max* L.) plant growth and nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*-SB1 in presence of *Bacillus thuringiensis*-KR1. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* **59**, 189–196 (2009)
- 62 Moazamian E., Bahador N., Azarpira N., Rasouli M.: Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines. *Curr. Microbiol.* **75**, 1090–1098 (2018)
- 63 Mrówczyński M., Wachowiak H., Pruszyński G.: Atlas szkodników owadów pożytecznych i zapylających szkodniki rzepaku. Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, ISBN 978-83-89867-97-1 (2014)
- 64 Mucha S.: Integrowana ochrona roślin. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/integrowana-ochrona-roslin>
- 65 Nakamura L.K.: DNA Relatedness among *Bacillus thuringiensis* Serovars. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 125–129 (2009)
- 66 Nayak P.S., Arakha M., Kumar A., Asthana S., Mallick B.C., Jha S.: An approach towards continuous production of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis*. *RSC Adv.* **6**, 8232–8242 (2016)
- 67 NCBI Taxonomy: *Bacillus thuringiensis* Taxonomy. ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1428&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock (2019)
- 68 Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L.: Chemical Pesticides and Human Health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health.* **4**, 148 (2016)
- 69 Ohba M., Mizuki E., Uemori A.: Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* **29**, 427–433 (2009)
- 70 Okumura S., Saitoh H., Ishikawa T., Wasano N., Yamashita S., Kusumoto K.I., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Inouye K.: Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6313–6318 (2005)
- 71 Pacheco-Cano R.D., de la Fuente-Salcido N.M., Salcedo-Hernández R., León-Galván M.F., Bideshi D.K., Hernández-Guzmán G., Barboza-Corona J.E.: Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthicin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Microbiol. Res.* **169**, 948–953 (2014)
- 72 Poornima K., Selvanayagam P., Shenbagarathai R.: Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 348–354 (2010)
- 73 Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N.: *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**, 189–194 (2010)
- 74 Reyes-Ramírez A., Escudero-Abarca B. I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., Barboza-Corona J.E.: Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food Sci.* **69**, M131–M134 (2006)
- 75 Rocha L.O., Tralamazza S.M., Reis G.M., Rabinovitch L., Barbosa C.B., Corrêa B.: Multi-method approach for characterizing the interaction between *Fusarium verticillioides* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *PLoS One.* **9**, e92189 (2014)
- 76 Sadif N., Cherif M., Fliss I., Boudabbous A., Antoun H.: Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* **83**, 101–117 (2001)
- 77 Sampson M.N., Gooday G.W.: Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiol.* **144**, 2189–2194 (1998)
- 78 Shrestha A., Sultana R., Chae J.C., Kim K., Lee K.J.: *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. *Eur. J. Plant Pathol.* **142**, 577–589 (2015)
- 79 Sierpinska A.: *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*. seria A, **2** [895–899], 71–99 (2000)
- 80 Singh B., Arora R., Gosal S.S.: Biological and molecular approaches in pest management. Scientific Publisher (2015)
- 81 Soufiane B., Côté J.C.: Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **95**, 33–45 (2009)
- 82 Sułowicz S., Piotrowska-Seget Z.: Oddziaływanie fungicydów na mikroorganizmy w środowisku glebowym. *Post. Mikrobiol.* **55**, 12–18 (2016)
- 83 Thakore Y.: The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.* **2**, 194–208 (2006)
- 84 Vilas-Bôas G.T., Peruca A.P.S., Arantes O.M.N.: Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**, 673–687 (2007)
- 85 Weerasinghe P., Buja L. M.: Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp. Mol. Pathol.* **93**, 302–308 (2012)
- 86 Wei S., Chelliah R., Park B.J., Kim S.H., Forghani F., Cho M.S., Park D.S., Jin Y.G., Oh D.H.: Differentiation of *Bacillus thuringiensis* from *Bacillus cereus* group using a unique marker based on Real-Time PCR. *Front. Microbiol.* **10**, 1–8 (2019)
- 87 Weinzierl R., Henn T., Koehler P.G., Tucker C.L. Microbial insecticides. Cooperative Extension Service, University of Illinois at Urbana-Champaign. **1295** (1989).
- 88 Xu Y., Nagai M., Bagdasarian M., Smith T.W.: 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 Env. Microbiol.* **67**, 3010–3015 (2001)
- 89 Yi W., Li C., Ye J., Long Y., Qin H.: Correlation between triphenyltin degradation and cellular metabolic responses of *Bacillus thuringiensis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **122**, 61–68 (2017)
- 90 Yi W., Yang K., Ye J., Long Y., Ke J., Ou H.: Triphenyltin degradation and proteomic response by an engineered *Escherichia coli* expressing cytochrome P450 enzyme. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **137**, 29–34 (2017)
- 91 Zhang X., Candas M., Griko N.B., Rose-Young L., Bulla L.A.: Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**, 1407–1416 (2005)
- 92 Zhang X., Candas M., Griko N.B., Taussig R., Bulla L.A.: A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9897–9902 (2006)
- 93 Zhuang L., Zhou S., Wang Y., Chang M.: Mosquito biolarvicide production by sequential fermentation with dual strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* using sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **102**, 1574–1580 (2011)
- 94 Zhuang L., Zhou S., Wang Y., Liu Z., Xu R.: Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresour. Technol.* **102**, 4820–4826 (2011)
- 95 Zribi Zghal R., Kharrat M., Rebai A., Ben Khedher S., Jallouli W., Elleuch J., Ginibre C., Chandre F., Tounsi S.: Optimization of bio-insecticide production by Tunisian *Bacillus thuringiensis israelensis* and its application in the field. *Biol. Control.* **124**, 46–52 (2018)