

NIEPRZYJAZNE PASOŻYTOM A PRZYJAZNE ŚRODOWISKU TRANSGENICZNE BIOINSEKTYCYDY

JOLANTA KUCIŃSKA, ELŻBIETA LONC I KATARZYNA RYDZANICZ

Zakład Parazytologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

ABSTRACT. Transgenic bioinsecticides inimical to parasites, but imical to environment. Identification of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) parasporal crystalline inclusions composed of Cry proteins (=delta-endotoxins) resulted in introduction of microbial pesticides for biological control of some parasites. Delta-endotoxins are encoded by cry genes and are active against pest and nuisance insects (mostly mosquitoes and black flies – vectors of still important infectious diseases). The recent significant progress in DNA recombination technique may overcome limitations (a short residual persistence and a narrow spectrum of activity) associated with application of *Bt* conventional products.

An introduction of cry genes from mosquitocidal subspecies *B. th. israelensis* (*Bti*) to the aquatic microorganisms inhabiting the same water bodies as mosquito and fly larvae (*Diptera*), has considerably improved the toxin delivery system to target insects. However, in the first experiments, in which *Bti* genes were cloned in cyanobacteria (*Agmenellum quadruplicatum*, *Synechocystis* PCC6803), a low gene expression was observed. Thus, it was necessary to integrate cry genes with strong promoters or to increase the number of vector-introduced copies. To overcome the obstacles of low gene expression and regulatory restriction for recombinant organisms, *Bti* spore/crystal formulations were encapsulated in the aquatic protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. Large numbers of crystals (180 to 240/cell) were accumulated in its food vacuoles. This system resulted also in an increase in toxin persistence from 24 to 71 h. Cloning *Bti* genes in *B. sphaericus* (which also produces mosquitocidal proteins) was another way of an increasing *Bt* crystal residual activity. In this case, the crystals were additionally protected by *B. sphaericus* exosporium. These transgenic bacteria produced large amounts of delta-endotoxins that remained under water surface longer than the wild *B. sphaericus* strains. Moreover, they had a broader spectrum of insecticidal activity, because *B. sphaericus* is toxic mostly to *Culex* and *Anopheles*, and *Bti* – mostly to *Culex*, *Aedes* and some Simuliidae. Gram-negative bacteria (*Asticca-*caulis* excentricus*, *Caulobacter crescentus* and *Ancylobacter aquaticus*) turned out also to be effective delta-endotoxin producers. They grow on simple media and do not contain proteases which could degrade Cry proteins. In some cases, 100% mosquito larvae mortality was observed as a result of an exposure to transgenic microorganisms containing *Bti* genes.

However, transgenic techniques are still not very popular in the world, despite their efficacy in biological control of insects. The transgenic organism construction is expensive and time-consuming. Genetic engineering is still raising a lot of anxieties and doubts concerning inappropriate use of modified organisms. On the other hand, this technology could solve many problems associated with vectors of important diseases, which are still unapproachable to contemporary medicine.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, biological control of vectors, Cry proteins, crystalline inclusions, transgenic bioinsecticides.

Postęp w naukach medycznych, jaki nastąpił w XX wieku, doprowadził do ograniczenia występowania wielu chorób infekcyjnych i inwazyjnych oraz wynikającej z ich szerzenia się śmiertelności ludzi. Problem chorób tropikalnych, w których pasożyty często są przenoszone na makroorganizm – żywiciela – poprzez wektory, głównie owady, pozostał wciąż nierozwiązany. Dotyczy to głównie malarii przenoszonej przez komary z rodzaju *Anopheles* (Tenenbaum 2002, Trape i wsp. 2002). Komary ponadto są przenosicielami wirusa żółtej febry (w Ameryce – *Aedes aegypti*, w Afryce – *A. luteocephalus*, *A. furcifer*, *A. taylori*), gorączki krwotocznej dengi (*A. aegypti*) i wirusa zachodniego Nilu (*Culex pipiens*, *A. vexans*, *Anopheles* sp.) oraz mikrofilarii nicieni *Wuchereria bancrofti* (*C. quinquefasciatus*, czasami: *Anopheles gambiae*, *A. funestus* i *Aedes polynesiensis*) i *Brugia malayi* (*Anopheles* sp., *Aedes togoi*, *Mansonia* sp.). Meszki *Simulium damnosum* są z kolei wektorami przede wszystkim mikrofilarii *Onchocerca volvulus* (powodujących onchocerkozę), a meszka *Odagmia ornata* – laseczek wąglika *Bacillus anthracis*. W wielu regionach komary są postrzegane także jako owady niezwykle uciążliwe i dokuczliwe (Lonc i Rydzanicz 1999). Uporczywe brzęczenie krwiopijnych samic komarów może wywoływać u ludzi reakcje nerwicowe. Ślina komarów zawiera składniki silnie drażniące, które u ludzi powodują odczyny uczuleniowe i świąd skóry. Rozdrapanie ran może prowadzić do wtórnych zakażeń drobnoustrojami. Meszki są szczególnie kłopotliwe, gdyż latają chmarami wokół głów, wpadają do uszu, nosa, gardła, pod powieki, dostają się również przez otwory w ubraniu. Ich ukłucia są dość bolesne, pozostawiają wyraźny, krwawiący ślad, opuchliznę i znacznie trudniej się goją niż rany powstałe po ukąszeniu komarów; czasem działają także destrukcyjnie na układ nerwowy. Przy dużym stężeniu substancji toksycznych może nawet dojść do śmierci.

Stosowane na szeroką skalę środki chemiczne niewątpliwie umożliwiły ograniczenie występowania tych owadów w rejonach świata, w których stanowiły prawdziwe zagrożenie (Mulla 1991, Misztal i wsp. 1996). Jednak wieloletnie praktyki w wykorzystaniu insektycydów chemicznych pokazały ich wysoką szkodliwość dla środowiska. W wielu przypadkach były one mało wybiórcze i wywoływały uboczne – bójcze – działanie na organizmy współwystępujące w danym biotopie, a nie będące przedmiotem zwalczania, kumulowały się w biosferze, stanowiąc zagrożenie dla życia ludzi i zwierząt oraz wywoływały oporność owadów. Równoległe do metod chemicznych na Zachodzie Europy, w Ameryce Północnej i b. ZSRR opracowywano metody biologiczne, polegające na wykorzystaniu przeciw wektorom ich naturalnych wrogów i patogenów. Największe znaczenie praktyczne w biologicznej kontroli komarów i meszek mają obecnie bakterie – kryształotwórcze, gramdodatnie laseczki z rodzaju *Bacillus*, głównie *Bacillus thuringiensis israelensis* i *B. sphaericus* (Becker i Margalit 1993). [Warto dodać, że *B. thuringiensis* obejmuje wiele podgatunków zróżnicowanych pod względem biochemicznym i serologicznym. Opisano już 69 – różnych pod względem budowy antygeny rzęskowego

H – serotypów *B. thuringiensis* (Lecadet i wsp. 1999), z których wiele znalazło praktyczne zastosowanie jako składnik bioinsektycydów skierowanych głównie przeciwko szkodnikom roślin uprawnych i lasów z rzędów: łuskoskrzydłych (Lepidoptera) i chrząszczy (Coleoptera)]. Entomopatogenna aktywność laseczek uwarunkowana jest obecnością w ich komórkach krystalicznych toksyn (tzw. delta-endotoksyn lub białek Cry), których produkcja zachodzi podczas sporulacji (Charles i De Barjac 1982, Schnepf i wsp. 1998, De Maagd i wsp. 2001). Natywne kryształy występują w formie nieaktywnych protoksyn. Na działanie delta-endotoksyn najwrażliwsze są wczesne stadia larwalne owadów. Po dostaniu się do jelita owada kryształ rozpuszcza się przy odpowiednim (zwykle silnie alkalicznym) pH przewodu pokarmowego. Dzięki działaniu specyficznych proteaz jelitowych, protoksyna ulega rozcięciu do aktywnej cząsteczki, która wiąże się z odpowiednim receptorem występującym na powierzchni nabłonka jelitowego u wrażliwych owadów, a następnie tworzy w nim pory. Powstałe pory zapoczątkowują proces koloidalno-osmotycznej lizy komórek epitelialnych, której następstwem jest śmierć owada. Kryształy, które nie zostały rozpuszczone, nie uległy aktywacji, bądź nie związały się z receptorem, są wydalane do środowiska i ze względu na swą fotolabilność ulegają szybkiej biodegradacji.

Opisana w literaturze duża różnorodność delta-endotoksyn jest efektem nasilonej w latach 90. izolacji laseczek *B. thuringiensis* z miejsc ich naturalnego występowania (gleba, liście, jelito owadów). W badaniach tych uczestniczył również wrocławski ośrodek, w którym zgromadzono kilkadziesiąt liściowych i glebowych izolatów *B. thuringiensis* z terenu Wrocławia, z lasów w okolicy Osoli oraz z Karonoskiego Parku Narodowego (Doroszkievicz i Lonc 1999). Spośród nich, dwa szczepy – w oparciu o budowę antygeny rzęskowego H – zostały opisane jako nowy podgatunek *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* H-47 (Lonc i wsp. 1997). Krajowe, potencjalnie entomopatogenne izolaty *B. thuringiensis* są wciąż testowane pod kątem ich przydatności do kontroli gatunków wektorowych (Lonc i wsp. 2001). Produkowane przez nie delta-endotoksyny mogą w przyszłości wzbogacić światową kolekcję białek Cry. Obecnie w tej kolekcji znajduje się ponad 100 delta-endotoksyn, które – na podstawie budowy i spektrum owadobójczej aktywności – zostały zaklasyfikowane do 40 klas (Crickmore i wsp. 1998). Każde nowo rejestrowane białko otrzymuje unikalną nazwę odzwierciedlającą jego podobieństwo do wcześniej poznanych (np. Cry1Aa2). Cyfra arabska, umieszczona bezpośrednio po nazwie Cry (pozycja 1) oznacza klasę, do której należy dane białko. Białka zaliczane do tej samej klasy (np. Cry1Aa1, Cry1Ba2, Cry1Ea4) są toksyczne dla owadów z tego samego rzędu. Podobieństwo sekwencji ich aminokwasów wynosi nie więcej niż 45%. Różnice w kolejnych pozycjach: 2 (wielka litera), 3 (mała litera) i 4 (cyfra arabska) świadczą o zróżnicowanej aktywności tych białek względem poszczególnych gatunków owadów. Toksyny, których nazwa różni się dopiero w pozycji 3 i 4 (np. Cry1Aa1, Cry1Ab2, Cry1Ac4) mają, przynajmniej w 75%, podob-

ną sekwencję aminokwasów. Nazwy białek o prawie identycznej (powyżej 95%) lub identycznej sekwencji, ale wyizolowane niezależnie, różnią się od siebie cyfrą w pozycji 4 (np. CryAa1, CryAa2, CryAa3). Geny toksyn otrzymują identyczną nazwę, ale zapisywane są od małej litery (np. cry1Aa1).

Entomopatogene właściwości delta-endotoksyn *B. thuringiensis* zostały wykorzystane w produkcji bioinsektycydów przeznaczonych do zwalczania owadów szkodliwych, uciążliwych lub wektorów chorób. Konwencjonalne biopreparaty zawierają spory i natywne kryształy *B. thuringiensis*. Pierwszy preparat handlowy „Thuricide” wyprodukowano w 1957 roku w oparciu o motylobójczy szczep *B. th. kurstaki* (Beegle i Yamamoto 1992). W 1995 roku światową sprzedaż preparatów *B. thuringiensis* oszacowano na 90 milionów dolarów, co stanowiło ok. 2% globalnego rynku insektycydów, ale przewiduje się że w obecnej dekadzie ich udział wzrośnie do 10–15% (Copping i Menn 2000). W latach 1961–1995 Agencja Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych (EPA) zarejestrowała aż 177 preparatów *B. thuringiensis*, a na początku 1998 roku ich liczba wzrosła do prawie 200 (Schnepf i wsp. 1998, Siegel 2001). Do zwalczania niektórych przedstawicieli Culicidae, Simuliidae, Phlebotomidae (Diptera, Nematocera) – wektorów tropikalnych chorób inwazyjnych i infekcyjnych – przeznaczone są m. in. „Bactimos”, „Gnatrol”, „Vectobac” (Abbott USA), „Tecnar” (Sandoz Inc.), „NovoSkeetal” (Novo-Nordisk A/S) i „Bactoculid” (b. ZSRR) oparte na komarobójczych szczepach *B. th. israelensis* (Tomlin 1997). Ze względu na wąskie spektrum działania, specyficzność oraz fotolabilność (kryształy ulegają biodegradacji w ciągu 24–48 godzin) są one bezpieczne dla środowiska i nie stanowią zagrożenia dla organizmów nie będących przedmiotem zwalczania (Lonc i Lachowicz 1994). Nie stwierdzono też u owadów masowej oporności na te preparaty. Stosowanie konwencjonalnych bioinsektycydów *B. thuringiensis* napotyka jednak w praktyce na szereg ograniczeń (Gelernter i Schwab 1993). Rozpuszczone w wodzie spory i kryształy mogą opadać na dno lub zostać zjedzone przez zwierzęta wodne, dla których nie są toksyczne, przez co stają się one niedostępne dla larw. Szybka biodegradacja delta-endotoksyn powoduje także konieczność kilkakrotnego stosowania tych preparatów w ciągu jednego sezonu. Ze względu na ich wysoką specyficzność i wąskie spektrum działania, zwalczanie różnych gatunków owadów współwystępujących w danym biotopie wymaga wykorzystania różnych preparatów.

Powyższe ograniczenia, jak i owadobójcza specyficzność delta-endotoksyn, stały się podstawą do stworzenia ulepszonych bioinsektycydów *B. thuringiensis*. Dzięki poznaniu i zrozumieniu mechanizmów realizacji informacji genetycznej dotyczącej toksynogenii entomopatogennych laseczek, możliwe było pozyskanie rekombinantów o odmiennym fenotypie w stosunku do szczepów macierzystych (Lonc i Lachowicz 1992). Geny kodujące toksyczne białka są głównie zlokalizowane na dużych plazmidach (od 40 do 150 MDa), rzadziej na chromosomie (Lereclus i wsp. 1993). Są to przeważnie plazmidy koniugacyjne, których biorcami mogą być różne

gatunki z rodzaju *Bacillus*. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* zawierają w komórce (przynajmniej jednego) faga, który zachowuje się jak plazmid i może pośredniczyć w przenoszeniu genów toksyn do innych szczepów (Gamel i Piot 1992). Geny cry są często połączone z sekwencjami transpozonowymi lub insercyjnymi, które także mogą być odpowiedzialne za transfer genów z chromosomu na plazmidy lub do genomu innych bakterii (Mahillon i wsp. 1994). U *B. thuringiensis*, podobnie jak u większości organizmów prokariotycznych, przekazywanie informacji genetycznej odbywa się poprzez koniugację, transdukcję i transformację. W procesie koniugacji materiał genetyczny może być przekazywany zarówno pomiędzy różnymi szczepami *B. thuringiensis*, jak i pomiędzy różnymi gatunkami. Najlepsze rezultaty uzyskiwane są wtedy, gdy dawcą jest *B. thuringiensis* a biorcą inny szczep tego samego gatunku pozbawiony plazmidów (Malinowski 2000). Metoda ta pozwala na przeniesienie zarówno genów kodujących toksyny, jak i genów regulujących ich ekspresję, zlokalizowanych na niekoniugacyjnych, ale mobilizowalnych plazmidach. Obok koniugacji, bardzo ważną rolę w przekazywaniu genów toksyn pełni transformacja. Umożliwia ona umieszczenie na indywidualnych plazmidach konkretnych genów kodujących krystaliczne białka, gdy dawcą jest aktywny szczep plazmidowy *B. thuringiensis*, a biorcą szczep bezplazmidowy. Transformanty zyskują zwykle pojedyncze plazmidy. Możliwe jest również przekazanie DNA plazmidowego z jednego szczepu toksynogennego do drugiego; wtedy transformanty mogą wykazywać poszerzony zakres działania lub zwiększoną toksyczność dla danego gatunku owadów. W komórkach biorcy gen ulega bardzo silnej ekspresji, czasem silniejszej niż w komórkach dawcy.

Praktyczne wykorzystanie mechanizmów przekazywania informacji genetycznej *B. thuringiensis* umożliwiło pozyskanie nowych bioinsektycydów o rozszerzonym spektrum aktywności, w których znajdują się spory i kryształy różnych szczepów *B. thuringiensis*; na przykład preparaty Ecotech® i Foil® zawierają spory i toksyczne białka chrząszczobójczego szczepu *B. th. aizawai* oraz motylobójczego *B. th. kurstaki*. Rozszerzenie spektrum aktywności i zwiększenie trwałości delta-endotoksyn uzyskano także dzięki wprowadzeniu genów cry z *B. th. israelensis* do *B. sphaericus*. Jak już wspomniano, oba szczepy produkują białka toksyczne dla komarów i meszek, jednak kryształy *B. sphaericus* znajdują się w egzosporium, dzięki czemu są dodatkowo chronione przed niekorzystnym działaniem czynników środowiska. Białka są aktywne wobec komarów *Culex* i *Anopheles*, a nie wykazują aktywności wobec *Aedes* (Skovmand i Bauduin 1996). Natomiast *B. th. israelensis* jest toksyczny przede wszystkim dla komarów *Culex*, *Aedes* i meszek *Simulium*, w mniejszym stopniu dla komarów *Anopheles*.

Wprowadzenie plazmidów z genami cry *B. th. israelensis* i *B. sphaericus* do gram-ujemnych pałeczek *Ancylobacter aquaticus* zawierających pęcherzyki gazowe (YAP i wsp. 1994), oprócz rozszerzenia spektrum aktywności, znacznie uskuteczniło dystrybucję toksyn w środowisku wodnym. Zaobserwowana niższa to-

ksyczość transformantów w porównaniu ze szczepami dawców została zrekomensowana przez zdolność do utrzymywania się tych komórek pod powierzchnią wody. Konstrukcja nowych szczepów *B. thuringiensis* poprzez koniugację lub transformację ma pewne ograniczenia, ponieważ nie wszystkie geny cry są zlokalizowane na mobilizowalnych plazmidach (Kumar i wsp. 1996). Wydajność produkcji białek Cry przez transkoniuganty może być zbyt niska w stosunku do wydajności obserwowanej u naturalnych izolatów.

Najnowsza generacja biopreparatów *B. thuringiensis* powstała w oparciu o techniki inżynierii genetycznej. Umożliwia ona konstruowanie nowych, nie występujących w naturze szczepów o sztucznie zmienionym genotypie, które nabywają zdolność do syntezy bioproduktów, jakich organizmy macierzyste nigdy nie produkowały. Nowoczesne bioinsektycydy *B. thuringiensis* zawierają organizmy transgeniczne, do których wprowadzono pojedyncze geny cry oraz geny regulujące ich ekspresję. W 1981 roku po raz pierwszy sklonowano i uzyskano ekspresję tych genów w komórkach pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* (Schnepf i Whiteley 1981). Od tego czasu były one wprowadzane do różnych mikroorganizmów – od bakulowirusów do sinic (Gelernter i Schwab 1993). Badacze z Monsanto, jako system ekspresji genu cry1Ab, wykorzystali niepatogenne pałeczki z rodzaju *Pseudomonas*, które występują na korzeniach roślin. Uzyskane rekombinanty wykazywały aktywność owadobójczą względem gąsienic motyli. Podobne próby przeprowadzono w wielu innych laboratoriach; firma Mycogen, w oparciu o pozytywne wyniki badań, opracowała dla delta-endotoksyn system enkapsulacyjny – Cell-Cap®. Za pomocą środków chemicznych wytrawiana jest cytoplazma komórek *Pseudomonas*, natomiast ściana komórkowa pozostaje nienaruszona. W komórkach transgenicznych bakterii, zawierających geny cry, produkowane są delta-endotoksyny. Ściana komórkowa, którą opłaszczone są kryształy, pełni funkcję ochronną przed szkodliwym działaniem czynników środowiska. Pierwsze transgeniczne bioinsektycydy: MVP® i M-Track®, oparte na systemie Cell-Cap®, zostały zarejestrowane w Stanach Zjednoczonych w 1991 roku. Zawierają one zmodyfikowane pałeczki *Pseudomonas syringae* produkujące toksyczne białka skierowane przeciwko owadom z rzędu Lepidoptera.

Sklonowanie genów *B. th. israelensis* (*Bti*) w mikroorganizmach, których naturalnym środowiskiem są zbiorniki wodne, dało szereg korzyści w zwalczaniu komarów i meszek (Diptera). Dzięki temu delta-endotoksyny produkowane są w miejscu występowania larw. Organizmy, do których wprowadzono te geny same się rozprzestrzeniają i są skutecznym dystrybutorem toksycznych białek. Poza tym występują blisko powierzchni wody, mogą być więc zjadane przez larwy. W początkowych doświadczeniach z transgenicznymi mikroorganizmami, przeprowadzonych w 1989 roku, wprowadzono gen cry4Ba *B. th. israelensis* do komórek sinicy *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 za pośrednictwem wahadłowego plazmidu *E. coli*/*A. quadruplicatum* (Angsuthansombat i Panyim 1989). Toksyczne białka produkowa-

ne były jednak w niewielkiej ilości i wykazywały nieznaczną aktywność wobec larw *Aedes aegypti*. Niska ekspresja genu spowodowana była małą ilością wprowadzanego wektora. Rok później gen cry 4Ba wprowadzono do komórek innej sinicy – *Synechocystis* PCC6803 (Chungjatupornchai 1990). W tym przypadku gen umieszczono pod kontrolą silnego promotora psbA, izolowanego z DNA z chloroplastów tytoniu. Produkt ekspresji genu kumulował się w niewielkiej ilości, co nie pozwalało na formowanie się kryształów białkowych. Przyczyną niskiej wydajności ekspresji była zbyt mała aktywność promotora lub niewystarczająca liczba kopii genu. Oba doświadczenia pokazały, że konieczne są fuzje genów z silnym promotorem, pochodzącym z genomu dawcy lub zwiększenie liczby kopii wprowadzanego wektora. Sukcesem okazało się wprowadzenie genu cry11Aa z *B. th. israelensis* do komórek sinicy *A. quadruplicatum* PR-6 (Murphy i Stevens 1992). Gen ten połączono z sekwencją inicjującą cpcB na plazmidzie pAQE19 pochodzącym ze szczepu *A. quadruplicatum* PR-6. Uzyskano ekspresję na bardzo wysokim poziomie, z małą lub niedostrzegalną degradacją produktu genu cry11Aa. Sinice, które stanowią składnik pokarmu larw komarów *Aedes* i *Anopheles*, mogą zatem być skutecznym dostawcą delta-endotoksyn.

Innym sposobem wykorzystania genów delta-endotoksyn jest tworzenie pomiędzy nimi kombinacji. Geny cry4Aa, cry11Aa i cry4R pochodzące z *B. th. israelensis*, sklonowano w różnych kombinacjach na plazmidzie pRL488p (Wu i wsp. 1997). Plazmid ten zawierał także replikon pDU1 izolowany z sinicy *Nostoc*, który umieszczono w odwrotnej orientacji do silnego promotora psbA, uzyskanego z *Amaranthus hybridus*. Zrekombinowany plazmid wprowadzono do komórek sinic *Anabaena* PCC7120. Wykazały one silną toksyczność dla larw *A. aegypti*. Szczepy z plazmidem zawierającym gen cry4Aa (z lub bez innych genów) zabijały larwy w 95–100%. Natomiast szczepy posiadające plazmid z samym genem cry11Aa były mniej aktywne. Obecnie autorzy prowadzą podobne badania na sinicach *Anabaena siamensis* – szczepu odkrytego na polu ryżowym w Tajlandii – które mogłyby być bardzo dobrym dystrybutorem delta-endotoksyn wśród larw komarów *Anopheles* – wektorów malarii w tym regionie.

Dobrym producentem toksycznych białek *Bti* okazały się też gramujemne pałeczki: *Asticcacaulis excentricus*, *Caulobacter crescentus* i *Ancylobacter aquaticus* (Romero i wsp. 2001). Zostały one wykorzystane do ekspresji genów cry *B. th. israelensis* i okazało się, że produkują delta-endotoksyny w dużych ilościach i nie zawierają proteaz, które mogłyby je degradować. Ich dodatkową zaletą jest to, że rosną na prostych podłożach bez dodatkowych aminokwasów. Pałeczki *Asticcacaulis excentricus* wykorzystywane są również jako system ekspresji genów cry11Bb z *B. th. medellin* oraz genów toksyn binarnych BinA i BinB z *B. sphaericus*. Geny te wprowadzane są do komórek *A. excentricus* metodą elektroporacji na plazmidach pSOD2 lub pEA1. Transgeniczne pałeczki, produkując bardzo duże ilości toksyn i utrzymując się pod powierzchnią wody znacznie dłużej niż dzikie szczepy *Bacil-*

lus, okazały się bardzo skuteczne w zwalczaniu komarów *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* i *Anopheles albimanus*.

Aby ominąć trudności, spowodowanych niską ekspresją genów toksyn, pojawiające się niekiedy w przypadku użycia rekombinantów, znaleziono pośrednie rozwiązanie. Przeprowadzono bioenkapsulację spor i kryształów *Bti* w komórkach wodnego pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* (Manasherob i wsp. 1998). Kryształy i spory gromadziły się w wakuolach pierwotniaka, które zapewniały im dodatkową ochronę, a trwałość toksyn wzrosła z 24 do 72 godzin. Larwy komarów po zjedzeniu *T. pyriformis* ginęły w bardzo krótkim czasie.

Mimo wielu zalet (rozszerzone spektrum aktywności, przedłużona trwałość i skuteczna dystrybucja delta-endotoksyn) metody z wykorzystaniem transgenicznym biopreparatów *B. thuringiensis* są mało powszechne. Skonstruowanie organizmów transgenicznych jest bowiem dość pracochłonne i kosztowne. Istotnym problemem są także wątpliwości natury etycznej dotyczące ich właściwego wykorzystania. Techniki inżynierii genetycznej obarczone są pewnym ryzykiem, np. niezamierzonym przenoszeniem genów pomiędzy różnymi organizmami, co budzi wiele wątpliwości i niepokojów. Można mieć jednak nadzieję, że wszystkie dzisiejsze ograniczenia zostaną w przyszłości wyeliminowane i powszechne wykorzystanie genów delta-endotoksyn jako składnika biopreparatów pozwoli skutecznie zwalczać uciążliwe owady.

LITERATURA

- Angsuthansombat C., Panyim S. 1989. Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2428–2430.
- Becker N., Margalit J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: „*Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*” (Eds. P.E. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs). John Wiley & Sons, Chichester, New York, 147–170.
- Beegle C.C., Yamamoto T.Y. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Canadian Entomologist* 124: 587–616.
- Charles J.-F., De Barjac H. 1982. Sporulation et cristallogenese de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie électronique. *Annual Microbiology* 133 A: 425–442.
- Chungjatupornchai W. 1990. Expression of the mosquitocidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide resistance gene bar in *Synechocystis* PCC6803. *Current Microbiology* 21: 283–288.
- Copping L.G., Menn J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications efficacy. Pest Management Science. West Sussex, UK: Wiley, 56: 651–676.
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J. Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807–821.
- De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193–199.
- Doroszkiewicz W., Lonc E. 1999. Biodiversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the phylloplane and soil of Lower Silesia Region (Poland). *Acta Microbiologica Polonica* 48: 355–361.

- Gamel P.H., Piot J.C. 1992. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene* 120: 17–26.
- Gelernter W., Schwab G.E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae, and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: „*Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*” (Eds. P.E. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs). John Wiley & Sons, Chichester, New York, 89–104.
- Kumar P.A., Sharma R.P., Malik V.S. 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology* 42: 1–43.
- Lecadet M.-M., Frachon E.E., Cosmao Dumanior V., Ripoteau H., Hamon P., Laurent P., Thiery I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 86: 660–672.
- Lereclus D., Delécluse A., Lecadet M.-M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: „*Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*” (Eds. P.E. Enwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs). John Wiley & Sons, Chichester, New York, 37–69.
- Lonc E., Lachowicz T.M. 1992. Parasporalne kryształy *Bacillus thuringiensis* jako środek specyficznej kontroli owadów. *Postępy Mikrobiologii* 2: 265–282.
- Lonc E., Lachowicz T.M. 1994. Positive and negative implications of conventional and nonconventional *Bacillus thuringiensis* products. *Wiadomości Parazytologiczne* 40: 316–317.
- Lonc E., Rydzanicz K. 1999. Wprowadzenie do biologii warunkującej środowiskowe zwalczanie komarów. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 431–448.
- Lonc E., Lecadet M.-M., Lachowicz T.M., Panek E. 1997. Description of *Bacillus thuringiensis wra-tislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wrocław (Poland), and other *Bt* isolates from the same area. *Letters in Applied Microbiology* 24: 467–473.
- Lonc E., Doroszkiewicz W., Klowden M.J., Rydzanicz K., Gałgan A. 2001. Entomopathogenic activities of environmental isolates of *Bacillus thuringiensis* against dipteran larvae. *Journal of Vector Ecology* 26: 15–20.
- Mahillon J., Rezsöhazy R., Hallet B., Delcour J. 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. *Genetica* 93: 13–26.
- Manasherob R., Ben-Dov E., Zaritsky A., Barak Z. 1998. Germination, growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in excreted food vacuoles of the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1750–1758.
- Malinowski H. 2000. Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin: perspektywy i ograniczenia. *Biotechnologia* 3: 81–92.
- Misztal L.H., Musiał W.G., Augustyniak J. 1996. Owadobójcze toksyny *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin. *Postępy Mikrobiologii* 3: 275–293.
- Mulla S. 1991. Biological control of mosquitoes with entomopathogenic bacteria. *Chinese Journal of Entomology*, Special Publ. No.6: 93–104. Proceeding of IVth National Vector Control Symposium Taichung, Taiwan.
- Murphy R.C., Stevens S.E., Jr. 1992. Cloning and expression of the cry IVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1650–1655.
- Romero M., Gill F.M., Orduz S. 2001. Expression of Mosquito Active Toxin Genes by a Colombian Native Strain of the Gram-negative Bacterium *Asticcacaulis excentricus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 96: 257–263.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775–806.
- Schnepf H.E., Whiteley H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* 78: 2893–2897.

- Siegel J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 13–21.
- Skovmand O., Bauduin S. 1996. Efficacy of a granular formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in Western African Countries. *Journal of Vector Ecology* 22: 43–51.
- Tenenbaum D.J. 2002. Breakthroughs put the bite on malaria. *Environmental Health Perspectives* 110: A760–763.
- Tomlin Cds (Ed.) 1997. The pesticide manual, 11th ed. Farnham, Surrey, British Crop Protection Council.
- Trape J.-F., Pisson G., Spiegel A., Enel C., Rogier C. 2002. Combating malaria in Africa. *Trends in Parasitology* 18: 224–230.
- Wu X.-Q., Vennison J., Liu H.-R., Ben-Dov E., Zaritsky A., Boussiba S. 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* PCC7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4971–4975.
- Yap W.H., Thanabalu T., Porter A.G. 1994. Expression of mosquitocidal toxin genes in a gas-vacuolated strain of *Ancylobacter aquaticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4199–4202.

Zaakceptowano do druku 6 stycznia 2003