

HENRYK MALINOWSKI

## Postępy w zakresie biopreparatów opartych na bakterii *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Progress in Biopreparations Based  
on the Bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

### Wstęp

Negatywne dla środowiska skutki stosowania chemicznych insektycydów spowodowały szersze zainteresowanie się biopreparatami opartymi na bakteriach, wirusach i grzybach. Koncepcja ograniczania populacji szkodliwych owadów za pomocą preparatów biologicznych nie jest nowa. W ostatnim dwudziestoleciu nastąpił jednak wyraźny postęp w rozwoju metod biologicznych, zwłaszcza w odniesieniu do preparatów opartych na bakterii *Bacillus thuringiensis*. Wydaje się, że w najbliższych latach znajdą one szersze zastosowanie w ochronie upraw rolniczych, warzywniczych, sadowniczych, a zwłaszcza w ochronie lasu ze względu na właściwości pozwalające na zakwalifikowanie do grupy ekologicznie akceptowanych środków ochrony roślin.

### Charakterystyka biopreparatów *Bacillus thuringiensis*

Czynnikiem toksycznym dla owadów w preparatach *Bacillus thuringiensis* dopuszczonych dotychczas do stosowania w Polsce i w wielu innych krajach są kryształki białkowe tzw. delta-endotoksyna, produkowana równoległe z przetrwalnikami przez wszystkie podgatunki (odmiany) tej bakterii (4). Delta-endotoksyna jest wrażliwa na wysoką temperaturę, natomiast w temperaturze umiarkowanej zachowuje toksyczność przez pewien czas. Nie rozpuszcza się w wodzie, jest natomiast rozpuszczalna w środowisku alkalicznym występującym w jelicie niektórych gatunków owadów. Wykazuje wysoką selektywność działania owadobójczego, nietoksyczna dla ssaków, ptaków i ryb. Działa na wrażliwe gatunki owadów jako trucizna pokarmowa.

Biopreparaty owadobójcze zawierające delta-endotoksynę należą do najbezpieczniejszych i najbardziej selektywnych spośród znanych obecnie insektycydów zarówno z punktu widzenia zdrowia człowieka jak i zagrożenia dla środowiska. Nie przewiduje się dla nich

okresu karencji, mogą więc być stosowane do dnia zbioru plonów. W związku z tymi właściwościami preparaty te są również zalecane do zwalczania owadów na terenach rekreacyjnych, w pobliżu zbiorników wodnych oraz w parkach narodowych (6). Jednakże, preparaty tego typu nie były dotychczas dostatecznie wykorzystywane w ochronie roślin. Zaleca się je głównie w ochronie lasu oraz upraw w ogródkach przydomowych. Nie zaleca się stosowania biopreparatów w sadach towarowych oraz przy dużym nasileniu szkodnika.

Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest mniejsza od tradycyjnych insektycydów skuteczność oraz wolniejszy efekt ich działania. Ponieważ działają przez żołądek, efekt zwalczania jest widoczny dopiero po kilku lub kilkunastu dniach w zależności od pobrania odpowiedniej dawki. W związku z tym można się liczyć w niektórych przypadkach z pewnymi stratami. Ponadto w grę wchodzi większe koszty zabiegów tymi preparatami oraz przyzwyczajenia użytkowników do stosowania insektycydów (działających na układ nerwowy) dających szybki i bardzo wysoki (ok. 100% śmiertelności) efekt zwalczania szkodliwych gatunków. Ten ostatni argument przestaje być aktualny, gdyż obecnie stosuje się wolno działające preparaty z grupy acylomocznikowych.

Należy nadmienić, że zmieniły się również poglądy odnośnie do konieczności uzyskiwania bardzo wysokiej redukcji populacji (ok. 100%) zwalczanych gatunków owadów. Obecnie uważa się, że 90% redukcja populacji jest wystarczająca do ochrony większości kultur, a jednocześnie pozwala na zachowanie pewnej liczby osobników wrażliwych, które krzyżując się z pozostałymi przy życiu heterozygotami i ewentualnie homozygotami odpornymi opóźniają powstawanie odporności na stosowane środki ochrony roślin (12). Jedynie w przypadku bardzo cennych upraw istnieje potrzeba wysokiej redukcji populacji szkodnika za pomocą środków działających radykalnie. Stosowanie preparatów *B. thuringiensis*, podobnie jak związków acylomocznikowych działających przez żołądek, wymaga od użytkownika znacznie szerszego zakresu wiedzy niż stosowanie klasycznych insektycydów chemicznych. Wynika to z faktu, że aktywność biopreparatów jest w większym stopniu uzależniona od wrażliwości zwalczanych gatunków owadów i warunków środowiska niż to ma miejsce w przypadku klasycznych insektycydów chemicznych.

## Postępy w rozwoju biopreparatów *Bacillus thuringiensis*

Postępy w rozwoju biopreparatów *B. thuringiensis* wiążą się z lepszym rozeznaniem czynników wpływających na ich aktywność owadobójczą. Końcowy efekt działania biopreparatu jest uzależniony od interakcji trzech grup czynników związanych: ze zwalczanym gatunkiem owadów, z właściwościami bakterii jako patogena, z formą użytkową, aparaturą opryskową oraz warunkami środowiska.

### Postępy związane z czynnikami odnoszonymi się do zwalczanego gatunku owadów

Biopreparaty oparte na bakterii *B. thuringiensis* są selektywne w stosunku do owadów. Wrażliwe na biopreparaty są w zasadzie gatunki owadów należące do trzech rzędów: *Lepidoptera*, *Diptera* i *Coleoptera*, chociaż ciągle wykrywa się nowe szczepy bakterii *B. thuringiensis*, na które wykazują wrażliwość coraz to nowe gatunki owadów. Do lat osiemdziesiątych biopreparaty *B. thuringiensis* stosowano głównie do zwalczania owadów z pierwszych dwu rzędów. Najwięcej gatunków wrażliwych występuje w rzędzie *Lepidop-*

tera; gatunki te należą jednocześnie do najgroźniejszych szkodników liściożernych. Spośród owadów z rzędu *Diptera*, omawianymi biopreparatami zwalczane są jedynie komary (*Culicidae*), a w ostatnich latach spośród owadów z rzędu *Coleoptera* — stonkowate (*Chrysomelidae*), głównie stonka ziemniaczana. Wrażliwość owadów na biopreparaty zależy od ich stadium rozwojowego. Działają one jedynie na młodociane stadia rozwojowe. Młodsze stadia rozwojowe są znacznie bardziej wrażliwe niż starsze; biopreparaty zaleca się więc do zwalczania najmłodszych larw. Zasada ta jednak nie zawsze musi być słuszna.

Badania (15) wykazały, że gąsienice trzeciego stadium wyłogówki *Choristoneura fumiferana* (Clem.) spasożytowane przez *Apanteles fumiferanae* (Vier.) w znacznym stopniu przeżywały zabieg biopreparatem *B. thuringiensis*, gdyż pobierały mniej pokarmu i prawdopodobieństwo pobrania dawki letalnej było mniejsze. Jednocześnie stosowanie biopreparatu redukowało populację pasożyta w 60% zabijając gospodarza przed wyjściem z niego *A. fumiferanae*. Ten negatywny wpływ biopreparatu na pasożyta był zmniejszony, gdy zabieg wykonano na gąsienice będące nie w trzecim, lecz w czwartym stadium, co pozwoliło na wylot pasożyta przed wyginięciem gospodarza. W takim przypadku należy opóźnić wykonanie zabiegu biopreparatem, gdyż uzupełnia on jedynie efekt redukcji *Ch. fumiferana* przez omawianego pasożyta, lecz z nim nie współdziała. Należy dodać, że pasożyt ten może zredukować ponad 50% populacji *Ch. fumiferana* przed spowodowaniem przez nią dużych strat w aparacie asymilacyjnym drzewostanów.

Na efektywność działania biopreparatów *B. thuringiensis* ma również wpływ stan fizjologiczny larw. Owady osłabione np. niekorzystnymi czynnikami środowiska, czy subletalnymi dawkami insektycydów, są bardziej podatne na rozwój choroby wywołanej zjedzeniem biopreparatu. Zostało to wykorzystane w praktyce w Kanadzie przy zwalczaniu *Ch. fumiferana* na ogromnych obszarach leśnych. Efektywność zwalczania zwiększano stosując najpierw niskie dawki fenitrotonu a następnie biopreparatu. Skuteczność zabiegu w lesie ocenia się tam na podstawie obserwacji aparatu asymilacyjnego przyjmując, że zabieg jest udany jeżeli defoliacja nie przekracza 40%. W Kanadzie próbowano również zwiększać aktywność biopreparatów *B. thuringiensis* przez dodawanie enzymu chitynazy (w niskich stężeniach), który uszkodzając nabłonek jelita ułatwia przenikanie do jamy ciała (17,8).

### Postępy związane z czynnikami odnoszącymi się do właściwości bakterii jako patogena

Aktywność biopreparatów *B. thuringiensis* w stosunku do poszczególnych gatunków owadów zależy przede wszystkim od podgatunku (odmiany) bakterii. Spośród znanych ok. 30 podgatunków większość wykazuje działanie w stosunku do gąsienic motyli, a spośród nich dwa: *kurstaki* i *thuringiensis* są najaktywniejsze. W ramach poszczególnych podgatunków aktywność owadobójcza jest również zróżnicowana w zależności od szczepu lub izolatu. W latach osiemdziesiątych wykryto nowy szczep HD-1 var. *kurstaki*, charakteryzujący się wyższą aktywnością owadobójczą od znanych w owym czasie izolatów. Szczep ten jest powszechnie wykorzystywany do chwili obecnej w biopreparatach handlowych (*Dipel*, *Thuricidae*) do zwalczania larw motyli.

W 1981 r. wyodrębniono w USA z larw *Ch. fumiferana* nowy izolat NRD-12 var. *kurstaki*. Szczep ten został wprowadzony do USDA kolekcji kultur *B. thuringiensis* pod numerem HD-945 (3). Posiada on charakterystykę serologiczną identyczną jak szczep HD-1. Jego

aktywność przeciwko *Trichoplusia ni* (Hübner) jest zbliżona do HD-1, ale jest on wielokrotnie bardziej aktywny przeciwko *Heliothis virescens* F., *Choristoneura fumiferana* Cl. i *Lymantria dispar* L. Szczep ten jest również skuteczny przeciwko *Spodoptera exigu*a (Hübner). Nowy szczep NRD-12 ze względu na szersze spektrum działania i większą aktywność owadobójczą może zastąpić w przyszłości izolat HD-1, stosowany dotychczas w preparatach handlowych przeciwko larwom motyli.

Wykryto również nowe szczepy *B. thuringiensis* działające na owady z rzędu *Coleoptera* (rodzina *Chrysomelidae*), a zwłaszcza na stonkę ziemniaczaną. W 1982 r. w Niemczech wyizolowano sobs. *tenebrionis* (9), który jest stosowany w płynnym preparacie Novodor przeznaczonym do zwalczania larw młodszych stadiów stonki ziemniaczanej. W 1986 roku opublikowano również wyniki badań prowadzonych w USA nad *B. thuringiensis* var. *san diego* działającym na owady z rzędu *Coleoptera* (7). Szczegółowe badania przeprowadzone w Niemczech wykazały jednak, że oba opisane szczepy są identyczne (10). Wstępne badania wykazały przydatność biopreparatu Novodor do zwalczania stonkowatych w leśnictwie.

### **Postępy związane z czynnikami odnoszącymi się do formy użytkowej, stosowanej aparatury opryskowej i warunków środowiska**

W początkowym okresie stosowania biopreparatów (we wczesnych latach sześćdziesiątych) nie zawsze uzyskiwano odpowiednią skuteczność zwalczania. Wynikało to z niezbyt dokładnego standaryzowania tych preparatów na podstawie liczenia żywotnych przetrwalników, które nic nie mówią o aktywności delta-endotoksyny. Począwszy od 1965 r. wszystkie formułacje *B. thuringiensis* są standaryzowane na podstawie badań, w których ocenia się również aktywność kryształów delta-endotoksyny w stosunku do wybranych gatunków owadów testowych (11), co pozwala na dostarczanie użytkownikowi biopreparatów o stałej aktywności.

Aktywność owadobójcza i długotrwałość działania biopreparatów *B. thuringiensis* naniesionych na rośliny jest w dużym stopniu uzależniona od odpowiedniej formy użytkowej, a zwłaszcza od zawartych w niej nośników i stabilizatorów, zapobiegających rozkładowi pod wpływem światła słonecznego, temperatury oraz przed zmywaniem przez opady atmosferyczne.

Największe osiągnięcie w ostatnich latach w zakresie formułacji biopreparatów *B. thuringiensis* do ultraniskoobjętościowego (ULV) opryskiwania techniką samolotową stanowi preparat Foray. Jest to formułacja płynna o zwiększonej zawartości delta-endotoksyny i obniżonym parowaniu, do stosowania bez rozcieńczania przy użyciu atomizerów dających krople o objętości około 50  $\mu\text{m}$ . Preparat przeznaczony jest do zwalczania szkodników lasu i zalecany w Polsce w dawce 2,5–4 l/ha (6).

Dotychczas stosowane formułacje *B. thuringiensis* zawierają zarówno kryształy delta-endotoksyny jak i spory bakterii, które jako żywe organizmy powodują pewne kłopoty przy opracowywaniu form użytkowych i przechowywaniu. Formułacje te mimo odpowiedniej zawartości nośników i stabilizatorów (naniesione na rośliny) charakteryzują się zbyt krótkotrwałym działaniem owadobójczym. Podjęte w latach osiemdziesiątych w USA

badania doprowadziły do opatentowania nowego sposobu przygotowywania biopreparatów *B. thuringiensis* tzw. "systemu kapsułkowania".

W systemie tym zabite komórki bakterii służą jako biologiczne mikro kapsułki lub bioopakowanie dla delta-endotoksyny (lub innych biotoksyn) chroniąc ją przed degradacją przez czynniki środowiska. Metoda ta wykorzystuje cechy dwu różnych gatunków bakterii. Bioopakowanie składa się ze ścian komórek nie patogenicznych bakterii *Pseudomonas fluorescens*, które występują powszechnie w glebie, wodzie i na powierzchni roślin. Czynniki owadobójczy natomiast pochodzi z występujących w naturze szczepów *B. thuringiensis* produkujących delta-endotoksynę. Gen odpowiedzialny za produkcję tej biotoksyny jest wprowadzony odpowiednimi metodami biotechnologicznymi do komórek bakterii *P. fluorescens*. Podczas fermentacji bakterie te produkują kryształy delta-endotoksyny wewnątrz własnych komórek. Następnie komórki bakterii są zabijane za pomocą czynników termicznych i chemicznych w taki sposób, by nie naruszyć znajdującej się w komórce biotoksyny. Proces ten utrwala jednocześnie błonę komórkową, która staje się bardziej twarda i sztywna w wyniku lepszego związania się jej komponentów. W ten sposób usztywniona błona komórkowa zabitych bakterii *P. fluorescens* służy jako ochronna, biologiczna mikro kapsułka dla delta-endotoksyny.

Dwa preparaty przygotowane według tego systemu znajdują się obecnie w szerokich badaniach aplikacyjnych. Jeden przeznaczony do zwalczania larw motyli, natomiast drugi — do zwalczania stonki ziemniaczanej. W obu przypadkach biopreparaty przygotowane według systemu kapsułkowania i naniesione na rośliny wykazały bardziej długotrwałe działanie w porównaniu do biopreparatów formułowanych tradycyjnie.

### Postępy związane z nowym podejściem do biopreparatów jako insektycydów

Innym kierunkiem badań mających na celu zwiększenie aktywności biopreparatów *B. thuringiensis* jest możliwość wprowadzenia do stosowania formułacji zawierających oprócz delta-endotoksyny również beta-egzotoksynę, znaną pod nazwą thuringiensyny i produkowaną przez niektóre podgatunki bakterii. Beta-egzotoksyna jest nukleotydem o niskim ciężarze cząsteczkowym, odpornym na wysoką temperaturę. Jest strukturalnym analogiem ATP, a mechanizm jej działania polega na blokowaniu zależnych od DNA polimeraz RNA u wielu organizmów (16). W związku z tym wykazuje ona toksyczność nie tylko dla owadów, ale również dla ssaków i ptaków. Z tego powodu handlowe biopreparaty *B. thuringiensis* dopuszczone dotychczas do stosowania w wielu krajach, w tym również w Polsce, nie mogły zawierać beta-egzotoksyny.

Obecnie nie wyklucza się możliwości praktycznego zastosowania biopreparatów zawierających delta-endotoksynę i beta-egzotoksynę, szczególnie do zwalczania szkodników odpornych na dotychczas stosowane środki z tym, że muszą one być traktowane jak insektycydy chemiczne. Stwierdzono również, że obie wymienione biotoksyny wykazują synergistyczne współdziałanie w stosunku do niektórych gatunków motyli: *Lymantria dispar* L. (2), *Zeiraphera diniana* (Guenee) (1), *Spodoptera exiqua* (Hübner) (13), *Spodoptera frugiperda* Smith (5). Synergizm ten wyraża się wzrostem procentu śmiertelności przy takiej samej dawce i krótszym czasem zamierania w porównaniu do pojedynczych składników. Mechanizm odpowiedzialny za obserwowany synergizm nie jest znany. Zarówno delta-endotoksyna jak i beta-egzotoksyna działają na wrażliwe gatunki na poziomie sub-

komórkowym. Przypuszcza się że synergistyczne działanie obu tych czynników może wynikać ze zmiany wrażliwości komórek jelita w stosunku do omawianych biotoksyn. Ponadto jedną z metod wzmocnienia aktywności owadobójczej biopreparatów opartych na delta-endotoksynie jest stosowanie ich w mieszaninie z małymi dawkami typowych insektycydów chemicznych.

Nowoczesne techniki biologii molekularnej stwarzają nowe możliwości i nowe kierunki biologicznego ograniczania populacji szkodliwych owadów. Stosując techniki inżynierii genetycznej uzyskano bakterię *B. thuringiensis* posiadającą geny aktywności owadobójczej wobec dwu gatunków szkodników: wyłogówki *Ch. fumiferana* i brudnicy nieparki (*Lymantria dispar* L.). Na bazie tej bakterii opracowano nowy biopreparat Condor, którego praktyczna przydatność do zwalczania szkodników lasu jest badana w Kanadzie.

Nowoczesne badania technikami inżynierii genetycznej pozwalają na otrzymanie transgenowych roślin uprawnych wytwarzających owadobójcze toksyny. Przykładem może być uzyskanie roślin tytoniu, produkujących białko owadobójcze, chroniące je przed owadami. Ten kierunek badań wydaje się być perspektywiczny. Aczkolwiek — biorąc pod uwagę ogromne zdolności adaptacyjne owadów, w tym możliwość wyselekcjonowania odpornych populacji na każdą toksynę — trudno już dzisiaj o tym przesądzić.

## Literatura

1. **Benz H.**, (1975): Action of *Bacillus thuringiensis* preparation against larch bud moth *Zeiraphera diniana* (Gn.) enhanced by beta-exotoxin and DDT. *Experienta*, 31: 1288–1290.
2. **Dubois N.R.**, (1986): Synergizm between beta-exotoxin and *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki (HD-1) in gypsy moth, *Lymantria dispar*, larvae. *J. Invertebr. Path.*, 48: 146–151.
3. **Dubois N.R., Reardon R.C., Kolodny-Hirsch D.M.**, (1988): Field efficacy of NRD-12 strain *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*). *J. Econ. Entomol.*, 81(6): 1672–1677.
4. **Faust R.T., Bulla C.A. (Jr)**, (1982): Bacteria and their toxin as insecticides. W: *Microbial and viral pesticides* (E. Kurstak ed.), Acad., New York.
5. **Gardner W.A.** (1988): Enhanced activity of selected combination of *Bacillus thuringiensis* and beta-exotoxin against fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae. *J. Econ. Entomol.*, 81(2): 463–469.
6. **Głowacka B.** (1992): Biologiczne metody zwalczania szkodliwych owadów leśnych. Wydawnictwo Świat, z. 16.
7. **Hernstadt C., Soares G.G., Wilcox E.R., Edwards D.L.**, (1986) A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Bio/Technology*, 4: 305–308.

8. **Ignatowicz S.**, (1982): Zwalczenie wyłogówki *Choristoneura fumiferana* (Cl.) (*Lepidoptera: Tortricidae*) w lasach Ameryki Północnej przy użyciu bioinsektycydów. Sylwan, 1, 2, 3: 61–66.
9. **Krig A., Huger A.M., Langenbruch G.A., Schnetter W.**, (1983): *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. ang. Entomol.; 96: 500–508.
10. **Kruger A., Huger A.M., Schnetter W.** (1987): “*Bacillus thuringiensis* var. *san diego*” Stamm M-7 ist identisch mit dem zuvor in Deutschland isolierten käferwirksamen *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Stamm BJ 256–82. J. Appl. Entomol., 104: 417–424.
11. **Malinowski H.**, (1985): Oznaczenie aktywności biopreparatów *Bacillus thuringiensis* (Berliner) na młkliku mącznym *Ephesta (Anagasta) kuhniella* (Zeller), Pestycydy, 4: 33–41.
12. **Malinowski H.** (1991): Metody przeciwdziałania odporności na zoocydy w populacjach stawonogów. Mat. XXXI Sesji naukowej Inst. Ochrony Roślin w Poznaniu. Cz. I, 180–186.
13. **Moar W.J., Osbrik W.L.A., Trumble J.T.**, (1986): Potentiation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* with *thuringiensis* on beet armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). J. Econ. Entomol., 79(6): 1443–1446.
14. **Morris O.N.**, (1988): Comparative toxicity of delta-endotoxin and thuringiensin of *Bacillus thuringiensis* and mixtures of the two for bertha armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). J. Econ. Entomol., 81(1): 135–141.
15. **Nealis V., van Frankenhuyzen K.**, (1990): Interaction between *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Apanteles fumiferanae* Vier. (*Hymenoptera: Braconidae*); a parasitoid of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (*Lepidoptera: Tortricidae*). Can. Entomol., 22: 585–594.
16. **Sebesta K., Farkas J., Horska K., Vankova J.**, (1981): Thuringiensin the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, pp. 249–277. W: Microbial control of pests and plant diseases 1970–1980. (H.D. Burges ed.), Acad., London.
17. **Smirnoff W.A.**, (1977): Confirmations experimentales du potentiel du complex *Bacillus thuringiensis* et chitinase pour la repression de la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana* (*Lepidoptera: Tortricidae*). Can. Entomol., 109: 112–115.

## Summary

Progress concerning the development of biopreparations based on the bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) is presented in the paper. At the beginning, these biopreparations were mainly used to the reduction of harmful insect populations from the order of *Lepidoptera*. One subspecies (*israelensis*) was used against *Culicidae* (*Diptera*). Now, the new subspecies (*tenebrionis*) to control pests from the order of *Coleoptera* is applied. Actually, in commercial formulations against *Lepidoptera* the strain HD-1 var. *kurstaki* is

commonly used. The isolation of the new strain HD-945 var. kurstaki which is more active than HD-1 strain allow to obtain biopreparations with better activity. Lately the new formulation (Foray) for the aerial application can be applied without dillution at 2.5 to 4 liters per hectare. New other formulations contain the crystals of delta-endotoxin only, prepared with the use of an encapsulation system, are more persistent and more effective. Finally, it may be possible with the use of genetic engineering to produce transgenic plants containing cristal proteins with insecticidal activity.