

Received: 21.08.2024 / Accepted: 07.11.2024

ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

Od bakterii do biopreparatu – *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin

From bacteria to biopreparation – *Bacillus thuringiensis* in plant protection

Lidia Florczak* 

Streszczenie

Bakterie *Bacillus thuringiensis* (Bt) są szeroko stosowane jako substancje czynne w biologicznych środkach owadobójczych. Wysoka skuteczność oraz selektywność działania sprawiły, że preparaty te stanowią obecnie około 90% światowego rynku bioinsektycydów. Biorąc pod uwagę obecne zapotrzebowanie na biologiczne środki ochrony roślin wynikające z uregulowań prawnych w wielu krajach, szacuje się że do 2030 roku wielkość globalnego rynku insektycydów Bt wzrośnie o 5,2%. Obecnie prowadzone badania nad Bt skupiają się na genetycznym doskonaleniu znanych i stosowanych już szczepów *B. thuringiensis*, opracowywaniu nowych formułacji biopreparatów oraz poszukiwaniu nowych, bardziej wirulentnych szczepów. Preparaty Bt są szeroko wykorzystywane w rolnictwie i leśnictwie do ochrony roślin przed szkodnikami, zwłaszcza motylami, a w mniejszym stopniu przed chrząszczami i muchówkami.

Słowa kluczowe: bioinsektycydy, *Bacillus thuringiensis*, toksyny Cry, integrowana ochrona roślin

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) bacteria are widely used as active substances in biological insecticides. Their high efficacy and selectivity have led these products to constitute approximately 90% of the global bioinsecticide market. Given the current demand for biological crop protection products driven by legal regulations in many countries, it is estimated that by 2030, the size of the global Bt insecticide market will increase by 5.2%. Current research on Bt focuses on the genetic improvement of known and used *B. thuringiensis* strains, the development of new biopesticide formulations and the search for new, more virulent strains. Bt products are widely used in agriculture and forestry to protect plants from pests, particularly lepidopterans and, to a lesser extent, beetles and flies.

Key words: bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis*, Cry toxins, Integrated Pest Management

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Nauk o Zwierzętach, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*corresponding author: lidia_florczak@sggw.edu.pl

Wstęp / Introduction

Chemiczne zwalczanie owadów szkodliwych przyniosło wiele korzyści gospodarczych oraz ekonomicznych zarówno w leśnictwie, jak i rolnictwie (Piwowar 2018). Jednak, po wielu latach nadmiernego stosowania chemicznych środków owadobójczych, zaczęto dostrzegać ich nieodwracalne oddziaływanie na środowisko naturalne. Mała selektywność, różnorodne właściwości farmakodynamiczne, wysoka trwałość, a także niska biodegradowalność to główne właściwości insektycydów, które zaburzają równowagę biologiczną całych ekosystemów. Jednym z ważniejszych zagrożeń wynikających z chemicznego zwalczania owadów szkodliwych jest zanieczyszczenie środowiska toksycznymi substancjami czynnymi. Ich długotrwałe utrzymywanie się w wodzie i/lub glebie prowadzi do tzw. bioakumulacji, czyli nagromadzenia się ksenobiotyków w tkankach organizmów na kolejnych poziomach łańcucha pokarmowego (Makles i Domański 2008). Ponadto, stosowanie mało selektywnych insektycydów chemicznych ma niewątpliwą wpływ na liczebność organizmów niebędących celem zwalczania. Redukcja pożytecznych stawonogów w połączeniu z uodparnianiem się szkodników na powszechnie stosowane środki ochrony roślin może doprowadzić w niedalekiej przyszłości do niekontrolowanego wzrostu liczebności ważniejszych fitofagów owadzi (Jones i wsp. 2011). Nadmierne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin stało się problemem globalnym, wymagającym pewnych uregulowań prawnych. Już w 2006 roku Komisja Europejska opracowała i przyjęła strategię tematyczną w sprawie zrównoważonego stosowania pestycydów, której głównym celem było zminimalizowanie zagrożeń wynikających ze stosowania chemicznych środków ochrony roślin poprzez ograniczenie chemizacji środowiska oraz zastępowanie niebezpiecznych substancji czynnych, niechemicznymi środkami alternatywnymi (Matyjaszczyk 2008; Pruszyński i Pruszyński 2013). W 2009 roku cele strategii tematycznej znalazły odzwierciedlenie w dwóch aktach prawnych Unii Europejskiej: dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE ustanawiającej ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów oraz rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczącym wprowadzenia do obrotu środków ochrony roślin (Dyrektywa 2009/128/WE; Rozporządzenie 1107/2009). Dokumenty te są częścią tzw. „pakietu pestycydowego”, obowiązującego we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej od 2011 roku (Matyjaszczyk 2008; Pruszyński i Pruszyński 2013). Implementacja nowych aktów prawnych przyczyniła się do stopniowego wycofywania większości chemicznych środków ochrony roślin, a co za tym idzie ograniczenia ich stosowania. Ponadto, państwa członkowskie Unii Europejskiej zostały zobligowane do zaostrożenia zasad dotyczących rejestracji pestycydów, przez co sama procedura dopuszczenia ich do obrotu jest znacznie utrudniona. Mając na uwadze

obowiązujące wymagania unijne, w wielu krajach Europy rozpoczęto poszukiwania skutecznych i bezpiecznych dla środowiska metod zwalczania owadów szkodliwych (Matyjaszczyk 2008; Pruszyński i Pruszyński 2013; Skwiercz i Zapałowska 2018). Wzrost świadomości na temat konsekwencji wynikających z nadmiernego stosowania chemicznych środków ochrony roślin oraz wprowadzenie w życie nowych uregulowań prawnych dotyczących zrównoważonego stosowania pestycydów, przyczyniły się do wzrostu zainteresowania biologicznymi metodami zwalczania owadów szkodliwych.

Alternatywą dla chemicznych insektycydów są biopreparaty na bazie mikroorganizmów entomopatogenicznych (Święcicka 2012; Gęsicka i wsp. 2020). Szczególną uwagę zwrócono na bakterie *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bt), które ze względu na wysoką aktywność owadobójczą, stały się czynnikiem aktywnym wielu bioinsektycydów (Święcicka i wsp. 2001; Święcicka 2012). Produkty na bazie bakterii *B. thuringiensis* są obecnie najlepiej sprzedającymi się bioinsektycydami na świecie, przy czym w największych ilościach stosowane są w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Brazylii (Fernández-Chapa i wsp. 2019; de Oliveira i wsp. 2021).

Charakterystyka bakterii *Bacillus thuringiensis* / Characteristics of *Bacillus thuringiensis*

Bakterie *B. thuringiensis* zostały wyizolowane po raz pierwszy z martwych gąsienic *Bombyx mori* L., w 1901 roku przez japońskiego biologa Sigetane Ishiwata (Kashyap i wsp. 2017). Nazwa gatunkowa *B. thuringiensis* została wprowadzona kilka lat później przez Ernsta Berlinera (Berliner 1915).

Bakterie *B. thuringiensis* to tlenowe, gram-dodatnie, sporujące laseczki należące do rodziny Bacillaceae (Święcicka i wsp. 2001; NCBI 2023). Ze względu na różnice morfologiczne wytwarzanych form przetrwalnikowych, rodzaj *Bacillus* został podzielony na trzy grupy. Gatunek *B. thuringiensis* został zaklasyfikowany do grupy *Bacillus cereus* (ang. *Bacillus cereus* group), obejmującej patogenne laseczki występujące w różnorodnych środowiskach, takich jak gleba, wody słodkie i słone, organizmy owadów i kręgowców oraz żywność. Do tej grupy zaliczane są m.in. *Bacillus cereus* (Frankland i Frankland, 1887), *Bacillus mycoides* (Flügge, 1886) oraz *Bacillus anthracis* (Cohn, 1872). Wszystkie gatunki należące do grupy *B. cereus* są niemal identyczne pod względem cech fenotypowych (Helgason i wsp. 2000; Wei i wsp. 2019). Cechą wyróżniającą *B. thuringiensis* od pozostałych gatunków bakterii jest zdolność do wytwarzania toksyn owadobójczych Cry (Crystal) i Cyt (Cytolytic), określanych jako ciała lub kryształki parasporalne, a także białek Vip (ang. Vegetative insecticidal proteins). Dodatkowo, niektóre szczepy *B. thuringiensis* wytwarzają chitynazy uczestniczące w przełamaniu barier anatomo-

miczno-fizjologicznych żywiciela (Konecka i wsp. 2011; Dubois i wsp. 2012; Bravo i wsp. 2015). Gatunek *B. thuringiensis* obejmuje obecnie aż 85 podgatunków, do których zaklasyfikowano ponad 50 000 izolatów bakteryjnych z całego świata (Kashyap i wsp. 2017; Lone i wsp. 2017).

Przez wiele lat uważano, że *B. thuringiensis* to typowe bakterie glebowe o bardzo szerokim zasięgu geograficznym (Sierpińska 2000). Występowanie owadobójczych szczepów tego gatunku potwierdzono bowiem w rozmaitych siedliskach i strefach klimatycznych na niemalże wszystkich kontynentach. Bakterie te wyizolowano nawet z gleb Antarktydy (Martin i Travers 1989; Forsyth i Logan 2000; Sierpińska 2000). Poza glebą, bakterie Bt izolowano również z wielu innych środowisk, takich jak: liście roślin (zwłaszcza drzew), martwe lub zamierające bezkręgowce, zbiorniki wodne, młyny oraz magazyny zbóż (Sierpińska 2000; Kashyap i wsp. 2017). Owadobójcze szczepy *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* wykryto nawet w osadach morskich (Mada i wsp. 2000). Badania przeprowadzone przez Smith i Couche (1991) wykazały, że właściwą niszą ekologiczną tych bakterii nie jest gleba, a powierzchnia roślin. Środowisko glebowe stanowi jedynie rezeruar form przetrwalnikowych tego gatunku, ale nie jest miejscem jego namnażania (Smith i Couche 1991). Liczne dane literaturowe potwierdzają, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy występowaniem owadów a liczebnością bakterii *B. thuringiensis*. Miejsca, takie jak silosy paszowe, młyny czy przechowalnie roślin zbożowych stanowią doskonałe środowisko dla tych mikroorganizmów (Meadows 1993). Warto wspomnieć, że to właśnie z larw mkliku mącznego *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 pozyskanych z młyna, po raz pierwszy wyizolowano *B. thuringiensis* na terenie Europy (Berliner 1915).

Entomopatogenność *B. thuringiensis* uwarunkowana jest zdolnością do syntezy toksyn Cry i Cyt, zwanych także δ -endotoksynami. Ze względu na ich wysoką specyficzność, nie stanowią one zagrożenia dla innych organizmów, w tym ludzi. Ponadto są całkowicie biodegradowalne, przez co nie kumulują się w środowisku naturalnym. Toksyny wytwarzane przez dany szczep *B. thuringiensis* oddziałują jedynie na wąską grupę żywicieli. Wykazano, że owady należące do rzędu motyli są wysoce wrażliwe na szczepy z podgatunku *kurstaki* oraz *aizawai*, natomiast muchówki oraz chrząszcze na Bt subsp. *israelensis* i Bt subsp. *tenebrionis*, odpowiednio (Bravo i wsp. 2015; Kashyap i wsp. 2017). Kluczowe czynniki wpływające na skuteczność owadobójczą *B. thuringiensis* to: temperatura i wilgotność powietrza, promieniowanie UV, opady atmosferyczne oraz rodzaj pobieranego pokarmu przez dany gatunek owada. Wykazano, że temperatura powietrza ma istotny wpływ na szybkość przemian metabolicznych tych mikroorganizmów, co powoduje, że w wyższej temperaturze (22–25°C), owady zamierają nawet do 5 razy szybciej niż w niższej (12–15°C). Wyższa temperatura sprzyja podziałom komórkowym *B. thuringiensis*, co znacząco skraca czas

uśmiercania owadów. Jednym z ważniejszych czynników wpływających na aktywność owadobójczą bakterii jest promieniowanie UV. Długotrwałe działanie promieni słonecznych ma skracać okres półtrwania toksyn białkowych i form przetrwalnikowych *B. thuringiensis* (Sierpińska 2000).

Cykl rozwojowy i czynniki wirulencji *Bacillus thuringiensis* / Life cycle and virulence factors of *Bacillus thuringiensis*

Cykl życiowy bakterii *B. thuringiensis* podzielono na dwa zasadnicze etapy (Sierpińska 2000; Świącicka 2012). Pierwszy z nich określany jako „faza metabolicznej aktywności” (następuje w momencie przedostania się bakterii do przewodu pokarmowego żywiciela) rozpoczyna się od germinacji (kiełkowania), czyli przekształcania endospor w komórki wegetatywne. Najczęściej proces ten inicjowany jest przez węglowodany bądź aminokwasy, których obecność w środowisku stanowi sygnał o dostępności substancji niezbędnych do wzrostu i rozwoju bakterii. Przyłączenie związków węglowych do receptorów cytoplazmatycznych przetrwalników wyzwała kaskadę reakcji prowadzącą do podjęcia aktywności metabolicznej przez komórki bakteryjne (Bulla i wsp. 1980; Świącicka 2012; Bartoszewicz i Czyżewska 2017). Po degradacji warstw ochronnych następuje wzrost bakterii, któremu towarzyszy powielanie materiału genetycznego oraz biosynteza białek. Komórki wegetatywne dzielą się intensywnie w ciele żywiciela, zarówno podczas patogenezy, jak i po jego śmierci. Wyczerpanie substancji pokarmowych lub nagromadzenie końcowych produktów przemiany materii jest sygnałem do rozpoczęcia drugiego etapu cyklu, czyli „fazy metabolicznego uspienia”. W tym czasie bakterie przedostają się do środowiska glebowego, gdzie rozpoczyna się proces sporulacji komórek. W trakcie sporulacji powstają pierwsze inkluzje białkowe, zwane δ -endotoksynami. Proces kończy się lizą komórki wegetatywnej i uwolnieniem dojrzałej endospor i kryształów parasporalnych do środowiska (Bulla i wsp. 1980; Ibrahim i wsp. 2010; Maughan i Van der Auwera 2011; Gęsicka i wsp. 2020). Endospor nie tylko umożliwiają przetrwanie w niekorzystnych warunkach, ale także ułatwiają rozprzestrzenianie i przedostawanie się prokariontów do organizmów potencjalnych żywicieli. Obecność grubych osłon, wysoce swoistych białek ochronnych, a także silne odwodnienie form przetrwalnikowych powoduje, że bakterie *B. thuringiensis* mogą przetrwać w środowisku glebowym przez wiele lat (Sierpińska 2000; Świącicka 2012; Bartoszewicz i Czyżewska 2017). Ważną rolę w ochronie materiału genetycznego Bt przed uszkodzeniami pełnią białka SASP (ang. small acid-soluble spore proteins), które syntetyzowane są podczas sporulacji. Białka te, wiążą się z materiałem genetycznym przetrwalników i chronią je przed szkodliwym działaniem m.in. wysokich

temperatur, dehydracją oraz promieniowaniem UV. Co ciekawe, białka SASP zaangażowane są również w dostarczanie węgla i energii w czasie przekształcania endospor w komórki wegetatywne (Cucchi i Sanchez de Rivas 1998). Takie przystosowanie fizjologiczne sprawia, że formy przetrwalnikowe charakteryzują się ponadprzeciętną trwałością, a co za tym idzie długowiecznością.

Wytwarzanie kryształów parasporalnych przez bakterie *B. thuringiensis* to prawdopodobnie forma kompensacji utraty wody, która ma miejsce podczas wytwarzania endospor (Ibrahim i wsp. 2010). Pomimo, iż entomopatogeniczność *B. thuringiensis* opiera się głównie na δ -endotoksynach Cry, to mikroorganizmy te syntetyzują także inne czynniki wirulentne oraz białka enzymatyczne (Nielsen-LeRoux i wsp. 2012; Gęsicka i wsp. 2020). Kryształy parasporalne wykazują toksyczność wobec owadów z rzędów: Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Mallofaga, Coleoptera, Homoptera, Orthoptera, a także dla niektórych gatunków nicieni i roztozczy (Gęsicka i wsp. 2020; Mendoza-Almanza i wsp. 2020). W zależności od szczepu *B. thuringiensis*, kryształy różnią się kształtem, rozmiarem oraz toksycznością wobec organizmów żywicielskich. Przykładowo szczepy patogenne dla owadów szkodliwych z rzędu motyli syntetyzują inkluzje białkowe o kształcie dwupiramidowym, z kolei szczepy aktywne wobec chrząszczy wytwarzają toksyny przypominające sześciiany lub spłaszczone prostopadłościany. Dodatkowo, formy wegetatywne mogą produkować od jednego do nawet kilku typów kryształów białkowych, różniących się właściwościami owadobójczymi (Sierpińska 2000).

Białka Cry uwalniane są do środowiska w postaci protosyn, których przekształcenie do formy czynnej wymaga solubilizacji (rozpuszczenia), a następnie aktywacji proteolitycznej w przewodzie pokarmowym owadów żywicielskich. Solubilizacja następuje w ściśle określonych warunkach fizykochemicznych np. przy odpowiednio wysokim pH płynów jelitowych. Z tego względu tylko owady wytwarzające soki trawienne zdolne do rozpuszczania kryształów parasporalnych wykazują wrażliwość na toksyny produkowane przez poszczególne szczepy *B. thuringiensis*. Pod wpływem obecnych w jelicie enzymów proteolitycznych następuje rozkład białek Cry, któremu towarzyszy skracanie łańcuchów polipeptydowych i zmniejszenie ich masy cząsteczkowej (Lonc i Lachowicz 1993; Sierpińska 2000; Pinos i wsp. 2021). U motyli i muchówek do enzymów hydrolizujących kryształy białkowe należą proteazy serynowe, natomiast u chrząszczy do aktywatorów proteolitycznych zaliczane są proteazy asparaginowe i cysteinowe (de Maagd i wsp. 2001; Konecka i wsp. 2011). Zaktywowane fragmenty białek Cry wykazują silne powinowactwo do receptorów cytoplazmatycznych komórek epitelialnych jelita środkowego owadów (Knowles i Ellar 1987). Związanie toksyny z nabłonkiem jelitowym żywiciela wywołuje zmiany konformacyjne cząsteczek Cry, co umożliwia ich wbudowanie w błonę cytoplazmatyczną (de Maagd i wsp. 2001). U owa-

dów, białka receptorowe wiążące toksyny *B. thuringiensis* to: fosfataza alkaliczna (ALP, ang. alkaline phosphatase), aminopeptydaza N (APN, ang. aminopeptidase N) oraz białka podobne do kadheryn (CLP, ang. cadherin-like protein) (Chen i wsp. 2009). Następnie toksyny oligomeryzują i tworzą pory (kanały) zakłócające przepuszczalność błon. W efekcie dochodzi do niekontrolowanego przepływu jonów i zaburzenia równowagi osmotycznej (Knowles i Ellar 1987; Lonc i Lachowicz 1993). Po związaniu δ -endotoksyny z białkiem receptorowym jelita owada dochodzi do degradacji wewnętrznych struktur komórki jelita, a następnie jej lizy (Castella i wsp. 2019; Fernández-Chapa i wsp. 2019; Mendoza-Almanza i wsp. 2020). Perforacja układu pokarmowego prowadzi do przedostania się treści jelitowej (wraz z bakteriami *B. thuringiensis*) do hemolimfy owadów, czego konsekwencją jest porażenie przewodu pokarmowego lub całkowity paraliż żywiciela. Sparaliżowane larwy przestają żerować, po czym zamierają w przeciągu kilkudziesięciu godzin (Lonc i Lachowicz 1993; Sierpińska 2000).

Zgodnie z najnowszą teorią, zaktywowane białka Cry oddziałują na komórkę na dwa sposoby: poprzez formowanie kanałów zakłócających gospodarkę jonową, a także poprzez zmianę metabolizmu komórkowego. Wykazano, że związanie toksyny do aminopeptydazy N lub białka przypominającego kadherynę aktywuje szlak sygnałowy zależny od jonów magnezu (Mg^{2+}), który doprowadza do wzrostu poziomu cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP, ang. cyclic adenosine monophosphate) syntezowanego przez cyklazę adenylową (AC, ang. adenylate cyclase). Z kolei cyklazy adenylowe to enzymy ściśle współdziałające z heterotrimerycznymi białkami G (GTP-azy), które katalizują hydrolizę GTP (guanozy-5'-trifosforanu) do GDP (guanozy-5'-difosforanu). Uważa się, że związanie δ -endotoksyn z receptorami komórek nabłonka jelitowego jest bodźcem stymulującym białko G, które poprzez pobudzenie cyklazy adenylowej zwiększa pośrednio wytwarzanie cAMP. Jest to szczególnie istotne dla całego szlaku sygnałowego, ponieważ śmierć komórki następuje w wyniku działania kinaz białkowych A (PKA, ang. protein kinase A), których aktywacja wymaga obecności cząsteczek cAMP. Kinazy te inicjują proces apoptozy poprzez otwieranie kanałów Mg^{2+} oraz destabilizację cytoskieletu (Castella i wsp. 2019; Fernández-Chapa i wsp. 2019; Mendoza-Almanza i wsp. 2020). Niezależnie od przyjętego mechanizmu działania białek Cry spożycie toksyn powoduje perforacje jelita i przedostanie się treści jelitowej wraz z bakteriami *B. thuringiensis* do hemolimfy owada. Z tego względu, niekiedy śmierć żywiciela jest wynikiem postępującej infekcji bakteryjnej, określanej mianem sepsy bądź posocznicy. Zjawisko to obserwowane jest podczas intensywnego namnażania się mikroorganizmów w płynach ustrojowych owada (Gęsicka i wsp. 2020).

Specyficzne działanie toksyn Cry uwarunkowane jest przede wszystkim ich solubilizacją w przewodzie pokar-

momym, ale równie istotne jest ich powinowactwo do receptorów cytoplazmatycznych komórek nabłonkowych owada (Lonc i Lachowicz 1993). Mechanizm działania δ -endotoksyn jest podstawową zaletą bioinsektycydów Bt, które w przeciwieństwie do chemicznych środków owadobójczych oddziałują jedynie na wąską grupę żywicieli. Ponadto, większość chemicznych substancji czynnych zaliczanych jest do toksyn kontaktowych, co potęguje ich niespecyficzne działanie. Z kolei, kryształy parasporalne wytwarzane przez bakterie *B. thuringiensis* dopiero po spożyciu przez żywiciela, stają się dla niego toksyczne (Lonc i Lachowicz 1993; Hung i wsp. 2016; Gęsicka i wsp. 2020).

Toksyny Cry wytwarzane przez bakterie *B. thuringiensis* należą do klasy białek wykazujących toksyczne działanie poprzez formowanie kanałów w błonie cytoplazmatycznej (PFT, ang. pore-forming toxins) (Gęsicka i wsp. 2020). Wykazano jednak, że ich entomopatogeniczne właściwości maleją wraz z wiekiem owadów, przez co najwyższą podatność na owadobójcze działanie δ -endotoksyn wykazują larwy w początkowych stadiach rozwojowych. Przypuszcza się, że zjawisko to spowodowane jest redukcją receptorów błonowych bądź ich potranslacyjną modyfikacją następującą podczas wzrostu i rozwoju owadów (Święcicka i wsp. 2001). Geny odpowiedzialne za powstawanie białek Cry zlokalizowane są na dużych, samoreplikujących się plazmidach. W wyniku ich ekspresji powstają produkty białkowe zdolne do oligomeryzacji. Zdolność ta jest istotnym elementem pozwalającym na wbudowywanie się toksyn bakteryjnych w błonę komórek epitelialnych jelita środkowego (Adang i wsp. 2014; Hung i wsp. 2016). Bakterie *B. thuringiensis* charakteryzują się ogromną heterogennością pod względem genów kodujących δ -endotoksyny. Do tej pory zsekwencjonowano ponad 800 genów *cry*, których produkty zaklasyfikowano do 75 klas białkowych (Cry1–Cry75) w oparciu o homologię sekwencji aminokwasowej (Kashyap i wsp. 2017; Sajid i wsp. 2018; Fernández-Chapa i wsp. 2019). Przykłady toksyn Cry wraz

z ich spektrum aktywności zostały przedstawione w tabeli 1. Wśród bakterii *B. thuringiensis* dominują szczepy z genem *cryI* kodującym kryształy parasporalne wykazujące toksyczne działanie wobec gąsienic z rzędu motyli (Święcicka 2012).

Niektóre wielkocząsteczkowe związki organiczne syntetyzowane przez bakterie *B. thuringiensis* potęgują aktywność owadobójczą toksyn Cry poprzez współdziałanie synergistyczne. Do takich związków należą m.in. białka Cyt wykazujące właściwości cytolityczne i hemolityczne (Święcicka i wsp. 2001; Gęsicka i wsp. 2020). Ponadto, białka te pełnią kluczową rolę w przełamaniu odpowiedzi immunologicznej owada, ułatwiając tym samym wiązanie białek Cry z błoną cytoplazmatyczną komórek epitelialnych jelita (Ibrahim i wsp. 2010; Adang i wsp. 2014). Białka Cyt syntetyzowane w postaci protoksyn, pod wpływem obecnych w jelicie żywiciela enzymów proteolitycznych, przekształcane są w formy aktywne zdolne do bezpośredniego wiązania się z elementami dwuwarstwy fosfolipidowej komórek. Dokładny mechanizm działania toksyn Cyt nie jest jeszcze w pełni poznany, niemniej jednak uważa się, że białka te wnikając do błony cytoplazmatycznej tworzą kanały jonowe bądź doprowadzają do degradacji wewnętrznych struktur komórki poprzez oddziaływanie podobne do surfaktantu (Bravo i wsp. 2015; Mendoza-Almanza i wsp. 2020).

Bakterie *B. thuringiensis* wytwarzają także szereg innych czynników wirulentnych, takich jak: proteiny Sip (ang. secreted insecticidal protein), β -egzotoksyny, białka Vip oraz proteiny P20 (Konecka i wsp. 2011). Najczęściej związki te wzmagają aktywność owadobójczą toksyn Cry poprzez działanie synergiczne. Wykazano, że niektóre szczepy *B. thuringiensis* w trakcie wzrostu wegetatywnego uwalniają termostabilne β -egzotoksyny, zwane również thuringiensinami. Są to niskocząsteczkowe analogi adenozyno-5'-trifosforanu (ATP, ang. adenosine-5'-triphosphate), które działają inhibując na polimerazę RNA zależną od DNA. Ze względu na obecność polimeraz RNA zarówno

Tabela 1. Białka Cry i Cyt wykazujące toksyczne działanie wobec owadów należących do rzędów: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera (Palma i wsp. 2014; Jouzani i wsp. 2017; Kashyap i wsp. 2017; Fernández-Chapa i wsp. 2019)

Table 1. Cry and Cyt proteins exhibiting toxic effects against insects from the orders: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera (Palma et al. 2014; Jouzani et al. 2017; Kashyap et al. 2017; Fernández-Chapa et al. 2019)

Grupa docelowa Target group	Białka Cry Cry proteins
Lepidoptera	Cry1(A-K), Cry2(A-B), Cry7(B), Cry8(D), Cry9(A-C,E), Cry15(A), Cry19(A-C), Cry20(A-B), Cry22(A), Cry32(A), Cry51(A), Cry54(A-B), Cry59(A-B), Cyt2(B)
Coleoptera	Cry1(A-I), Cry2(A), Cry3(A-C), Cry7(A), Cry8(A-G), Cry14(A), Cry18(A-C), Cry23(A), Cry26(A), Cry28(A), Cry34(A-B), Cry35(A-B), Cry36(A), Cry37(A), Cry43(A-C), Cry55(A), Cyt1(A), Cyt2(C)
Diptera	Cry1(A-C), Cry2(A-B), Cry4(A-C), Cry10(A), Cry11(A-B), Cry16(A), Cry17(A), Cry19(A-C), Cry20(A), Cry21(A-H), Cry24(A-C), Cry25(A), Cry27(A), Cry30(A-G), Cry39(A), Cry40(A-D), Cry44(A), Cry47(A), Cry48(A), Cry49(A), Cry52(A-B), Cyt1(A-D), Cyt2(A-D), Cyt3(A)
Hymenoptera	Cry2(A), Cry3(A), Cry11(A)
Hemiptera	Cry3(A), Cry5(A), Cry22(A)

w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, β -egzotoksyny mogą wykazywać działanie toksyczne nie tylko na owady, ale również na inne organizmy żywe. Z tego względu, szczepy *B. thuringiensis* uwalniające thuringiensiny nie mogą być wykorzystywane w biopreparatach owadobójczych (Palma i wsp. 2014).

Lokalizacja genów *cry* i ich potencjalne zastosowanie / Localization of *cry* genes and their potential application

Geny kodujące toksyny Cry zlokalizowane są na plazmidach, czyli autonomicznie replikujących się cząsteczkach DNA. W związku z tym, identyfikacja *B. thuringiensis* jedynie na podstawie obecności genów *cry* może być niewystarczająca, ponieważ plazmidy te mogą być przenoszone między różnymi szczepami Bt, a nawet między gatunkami bakterii poprzez horyzontalny transfer genów (HGT) (Vilas-Bôas i Santos 2012; Gęsicka i wsp. 2020; Guerrero i wsp. 2024). Koniugacja jako jeden z głównych mechanizmów HGT umożliwia nabywanie egzogenego DNA, prowadząc do powstawania bakterii rekombinowanych o nowych cechach fenotypowych (Guerrero i wsp. 2024). Proces ten odgrywa kluczową rolę w zwiększaniu różnorodności genetycznej Bt, umożliwiając adaptację do nowych nisz ekologicznych oraz powstawanie szczepów o rozszerzonym spektrum aktywności owadobójczej (Mendoza-Almanza i wsp. 2020; Guerrero i wsp. 2024).

Lokalizacja genów *cry* na plazmidach otwiera szerokie możliwości biotechnologiczne, szczególnie w zakresie zwalczania szkodników oraz chorób przenoszonych przez owady (Mendoza-Almanza i wsp. 2020; Guerrero i wsp. 2024). Ostateczny skład genów *cry* w danym szczepie *B. thuringiensis* jest kluczowym czynnikiem determinującym jego specyficzność oraz toksyczność względem organizmów docelowych (Mendoza-Almanza i wsp. 2020).

Transfer genów za pośrednictwem plazmidów koniugacyjnych umożliwia tworzenie nowych szczepów zdolnych do syntezy zróżnicowanych kombinacji toksyn, co ma istotne znaczenie w opracowywaniu biopreparatów o szerokim spektrum działania. Ponadto, zwiększenie różnorodności genetycznej toksyn Cry w środowisku naturalnym przyczynia się do zmniejszenia presji selekcyjnej, ograniczając ryzyko pojawienia się populacji owadów odpornych na działanie pojedynczych toksyn (Peng i wsp. 2019; Guerrero i wsp. 2024; Miranda i wsp. 2024).

Plazmidy koniugacyjne odgrywają kluczową rolę w poziomym transferze genów między bakteriami umożliwiając wymianę materiału genetycznego zarówno pomiędzy różnymi szczepami, jak i gatunkami bakterii. Mechanizmy te mają szczególne znaczenie nie tylko w rolnictwie, ale również w biologicznej kontroli owadów będących wektorami chorób zakaźnych, takich jak malaria, denga czy gorączka

Zachodniego Nilu. Wykazano, że synergiczne działanie toksyn produkowanych przez *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) oraz *Lysinibacillus sphaericus* (Bs) stanowi jedną z najskuteczniejszych i najbezpieczniejszych metod zwalczania tych wektorów (Guerrero i wsp. 2024; Miranda i wsp. 2024).

Wykorzystanie preparatów Bt w rolnictwie i leśnictwie / Use of Bt preparations in agriculture and forestry

Na początku XXI wieku odnotowano znaczący wzrost wykorzystania biologicznych środków owadobójczych pochodzenia mikrobiologicznego (Neale 1997; Hernández-Fernández 2016). Już w 2008 roku wartość globalnego rynku bioinsektycydów Bt wyceniono na około 550 milionów dolarów (Sanchis i Bourguet 2008). Z kolei, w 2021 roku światowa sprzedaż biopreparatów *B. thuringiensis* przekroczyła miliard dolarów. Biorąc pod uwagę obecne zapotrzebowanie na biologiczne środki ochrony roślin wynikające z uregulowań prawnych w wielu krajach, szacuje się że do 2030 roku wielkość globalnego rynku insektycydów Bt wzrośnie o 5,2% (DataIntelto 2021).

Bakterie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) i w mniejszym stopniu *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* są substancjami czynnymi licznych bioinsektycydów stosowanych do zwalczania owadów z rzędu Lepidoptera w uprawach warzyw i owoców (Kabaluk i Gazdik 2007; de Maagd 2014; Lacey i wsp. 2015; do Nascimento i wsp. 2022). Biopreparaty Btk są powszechnie wykorzystywane w ekologicznej produkcji roślinnej i coraz częściej znajdują zastosowanie w uprawach prowadzonych przez konwencjonalnych rolników (Lacey i wsp. 2015). Zabiegi z użyciem *B. thuringiensis* są obecnie prowadzone w zwalczaniu owadów (z rzędu Lepidoptera) wyrządzających największe straty gospodarcze w rolnictwie. Do takich owadów należą: taniś krzyżowiaczek *Plutella xylostella* (L.), bielinek kapustnik *Pieris brassicae* (L.), bielinek rzepnik *Pieris rapae* (L.), słonecznica orężówka *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808), światłówka naziemnica *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), rolnica gwoździówka *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766), omacnica prosowianka *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796), piętnówka kapustnica *Mamestra brassicae* (L.), błyszczka jarzynówka *Autographa gamma* (L.) i skóśnik pomidorowy *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Kabaluk i Gazdik 2007; Szejda 2014; Arakere i wsp. 2022; Kowalska 2023). W przypadku owadów szkodliwych należących do rzędu Coleoptera stosowanie komercyjnych preparatów Bt jest ograniczone. Obecnie preparaty te znalazły zastosowanie jedynie do zwalczania chrząszczy z rodziny stonkowatych (Chrysomelidae), w szczególności stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Wraight i wsp. 2009; Lacey i wsp. 2015). Bakterie *B. thuringiensis* subsp.

tenebrionis (Btt), produkujące toksynę Cry3Aa o wysokiej aktywności wobec chrząszczy, stanowią substancję czynną w bioinsektycydach, takich jak Novodor i Trident (Lacey i wsp. 2015; Nault i Seaman 2019; Domínguez-Arrizabala-ga i wsp. 2020; Gęsicka i wsp. 2020; Arakere i wsp. 2022). Regularne stosowanie tych środków owadobójczych przeciwko wczesnym stadium larwalnym stonki ziemniaczanej zapewnia skuteczną ochronę roślin psiankowatych przed uszkodzeniami spowodowanymi żerowaniem tego szkodnika (Lacey i wsp. 2015).

Preparaty Bt są również stosowane przeciwko różnym szkodnikom, które atakują drzewa ziarnkowe, drzewa pestkowe i rośliny jagodowe. Działają głównie na larwy motyli, które powodują znaczne uszkodzenia liści, kwiatów i owoców (de Maagd 2014; Lacey i wsp. 2015; do Nascimento i wsp. 2022). Środki ochrony roślin oparte na *B. thuringiensis* są szczególnie skuteczne w zwalczaniu takich szkodników, jak: owocówka jabłkowieczka *Cydia pomonella* L., zwójka siatkóweczka *Adoxophyes orana* (Fischer v. Röslerstamm, 1834), skośnik brzoskwiniacek *Anarsia lineatella* Zeller, 1839 i owocówka południoweczka *Grapholita molesta* Busck, 1916 (Kabaluk i Gazdik 2007; Lacey i wsp. 2007; Niemiec 2024). Dzięki selektywnemu działaniu preparaty Bt zapewniają bezpieczną i skuteczną ochronę sadów, pozwalając na produkcję owoców o wysokiej jakości i pozbawionych pozostałości chemicznych.

Rozwój badań nad *B. thuringiensis* w latach 70. i 80. XX wieku znacząco przyczynił się do ich komercjalizacji i szerszego zastosowania w leśnictwie (Lacey i wsp. 2015). Obecnie, spośród wszystkich niechemicznych środków owadobójczych, biopreparaty zawierające bakterie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* są najczęściej stosowanymi preparatami do zwalczania owadów szkodliwych należących do rzędu motyli (Lepidoptera) (Lacey i wsp. 2015; Skrzecz i wsp. 2024). W Polsce, w ciągu ostatnich 40 lat zabiegi z użyciem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* objęły ponad 600 000 hektarów lasów, skutecznie redukując populacje szkodników, takich jak brudnica mniszka *Lymantria monacha* (L.), barczatka sosnowka *Dendrolimus pini* (L.), poproch cetyniak *Bupalus piniarius* i *Bupalus piniaria* (L.). Z kolei w Stanach Zjednoczonych, w latach 2000–2020, w związku z masowymi wystąpieniami brudnicy nieparki *Lymantria dispar* (L.) zastosowano Btk na powierzchni 433 milionów hektarów (Skrzecz i wsp. 2024). Obecnie w ochronie lasów przed gradacjami brudnicy mniszki i brudnicy nieparki wykorzystuje się kilka zarejestrowanych formułacji biopreparatu Foray o zwiększonej aktywności owadobójczej (Głowacka 2012; Olivieri i wsp. 2021). Biopreparaty Btk są również stosowane do zwalczania innych foliofagów leśnych z rzędu Lepidoptera, w tym m.in. strzygoni choińki *Panolis flammea* (Denis i Schiffermüller, 1775) i zwójki zieloneczki *Tortrix viridana* (L.) (Lacey i wsp. 2015; Skrzecz i wsp. 2020).

Biopreparaty Btk są powszechnie stosowane do zwalczania ćmy bukszpanowej *Cydalima perspectalis* (Walker,

1859) na różnych obszarach zieleni, takich jak ogrody prywatne, parki i zieleń miejska (Las Heras i wsp. 2019; Coyle i wsp. 2022; Tabone i wsp. 2022; Barbero i wsp. 2024). Preparaty te dostępne w formie proszku lub granulatu do sporządzania zawiesin wodnych są łatwe w aplikacji przy użyciu opryskiwaczy, dzięki czemu mogą być stosowane zarówno przez profesjonalistów, jak i działkowiczów (Coyle i wsp. 2022; Tabone i wsp. 2022). Jednym z najczęściej stosowanych biopreparatów Bt przeciwko ćmie bukszpanowej jest preparat Lepinox (Kowalska 2023).

Wszystkie zarejestrowane w Polsce preparaty Bt zostały przedstawione w tabeli 2.

Odporność owadów na biopreparaty Bt / Insect resistance to Bt biopreparations

Pomimo licznych korzyści ekonomicznych, środowiskowych i społecznych związanych ze stosowaniem biopreparatów opartych na *B. thuringiensis*, już w ubiegłym stuleciu zwrócono uwagę na potencjalne zagrożenia wynikające z rozwoju odporności owadów na substancje czynne zawarte w tych bioinsektycydach (Tabashnik i wsp. 1990; Guo i wsp. 2020). Problem ten stanowi istotne wyzwanie, gdyż może znacząco ograniczyć długoterminową skuteczność produktów Bt, prowadząc do wzrostu użycia chemicznych środków owadobójczych. Wyselekcjonowanie odpornych populacji owadów jest naturalną konsekwencją ewolucyjnego przystosowania się (adaptacji) organizmów do niesprzyjających warunków środowiska, takich jak długotrwałe stosowanie tych samych insektycydów (Malinowski 1997; Tabashnik i wsp. 2013; Horikoshi i wsp. 2019).

Preparaty Bt stosowane od lat 30. XX wieku jako biologiczne środki ochrony roślin, są powszechnie uznawane za bezpieczne i skuteczne narzędzie w zwalczaniu szkodliwych populacji owadów (Sanchis 2011). Jednakże pierwsze doniesienia o wystąpieniu odporności owadów na toksyny Bt w warunkach polowych znacząco zmieniły sposób postrzegania tych biopreparatów jako długoterminowego rozwiązania w ochronie roślin. Zjawisko to podkreśla konieczność opracowania strategii zarządzania odpornością, które pozwolą utrzymać wysoką skuteczność biopreparatów Bt w przyszłości (Tabashnik i wsp. 1990; Sanchis i Bourguet 2008; Guo i wsp. 2020; Ahmad i wsp. 2022; Afzal i wsp. 2024).

Pierwszym szkodnikiem, który w warunkach naturalnych rozwinął odporność na preparaty Bt (Javelin – szczep NRD-12 i Dipel – szczep HD-1) był tantniś krzyżowiaczek (*Plutella xylostella*), uznawany za jeden z najgroźniejszych agrofagów roślin z rodziny kapustowatych. Kluczowym czynnikiem prowadzącym do zmniejszenia skuteczności preparatów Bt był brak rotacji środków owadobójczych oraz intensywna, wielokrotna aplikacja tych samych biopreparatów. Taka praktyka wywierała silną presję selekcyjną, sprzyjającą powstawaniu i rozprzestrzenianiu się odpor-

ności w populacjach tego szkodnika (Kirsch i Schmutterer 1988; Tabashnik i wsp. 1990).

Mechanizm rozwoju odporności u owadów jest procesem złożonym, w którym kluczową rolę odgrywają zmia-

Tabela 2. Wszystkie zarejestrowane w Polsce biopreparaty Bt wraz z przykładami szkodników docelowych oraz z wybranym zastosowaniem w uprawach

Table 2. All Bt-based biopesticides registered in Poland, along with examples of target pests and selected applications in crops

Nazwa handlowa Trade name	Mikroorganizm Microorganism	Przykłady szkodników docelowych Examples of target pests	Wybrane uprawy Selected crops
Agree 50 WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep GC-91	tantniś krzyżowiaczek (<i>Plutella xylostella</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Autographa gamma</i>), piętnówka kapustnica (<i>Mamestra brassicae</i>), piędzik przedzimek (<i>Operophtera brumata</i>)	drzewa pestkowe (brzoskwinia, wiśnia, śliwa, morela, nektarynka) drzewa ziarnkowe (jabłoń, grusza) krzewy owocowe (agrest, borówka wysoka, porzeczka czarna, porzeczka czerwona, porzeczka biała) rośliny ozdobne stone fruit trees (peach, cherry, plum, apricot, nectarine) pome fruit trees (apple, pear) berry bushes (gooseberry, highbush blueberry, blackcurrant, redcurrant, white currant) ornamental plants
XenTari WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	piędzik przedzimek (<i>Operophtera brumata</i>), zwójka siatkóweczka (<i>Adoxophyes orana</i>), owocówka jabłkóweczka (<i>Cydia pomonella</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Autographa gamma</i>), tantniś krzyżowiaczek (<i>Plutella xylostella</i>)	drzewa ziarnkowe (jabłoń, grusza) drzewa pestkowe (wiśnia, morela, brzoskwinia, śliwa) warzywa kapustne (kapusta, kalafior, brokuł) warzywa psiankowe (pomidor) pome fruit trees (apple, pear) stone fruit trees (cherry, apricot, peach, plum) brassica vegetables (cabbage, cauliflower, broccoli) solanaceous vegetables (tomato)
Delfin WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep SA-11	brudnica nieparka (<i>Lymantria dispar</i>), kuprówka rudnica (<i>Euproctis chrysorrhoea</i>), brudnica mniszka (<i>Lymantria monacha</i>), ćma bukszpanowa (<i>Cydalima perspectalis</i>), tantniś krzyżowiaczek (<i>Plutella xylostella</i>)	drzewa liściaste drzewa iglaste drzewa ozdobne drzewa ziarnkowe (jabłoń, grusza) deciduous trees coniferous trees ornamental trees pome fruit trees (apple, pear)
DiPel DF DiPel WG	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	skośnik pomidorowy (<i>Tuta absoluta</i>), owocówka jabłkóweczka (<i>Cydia pomonella</i>), bielinek kapustnik (<i>Pieris brassicae</i>), bielinek rzepnik (<i>Pieris rapae</i>)	warzywa psiankowe (pomidor) drzewa ziarnkowe (grusza) warzywa kapustne (kapusta brukselska, brokuł, jarmuż, kalarepa, kapusta głowiasta, kalafior) solanaceous vegetables (tomato) pome fruit trees (pear) brassica vegetables (Brussels sprout, broccoli, kale, kohlrabi, cabbage, cauliflower)
Foray 76B	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	brudnica nieparka (<i>Lymantria dispar</i>), brudnica mniszka (<i>Lymantria monacha</i>), oprzędnica jesienna (<i>Hyphantria cunea</i>), barczatka sosnówka (<i>Dendrolimus pini</i>), zwójka zieloneczka (<i>Tortrix viridana</i>)	drzewa liściaste drzewa iglaste rośliny ozdobne deciduous trees coniferous trees ornamental plants

Tabela 2. Wszystkie zarejestrowane w Polsce biopreparaty Bt wraz z przykładami szkodników docelowych oraz z wybranym zastosowaniem w uprawach – cd.

Table 2. All Bt-based biopesticides registered in Poland, along with examples of target pests and selected applications in crops – continuation

Nazwa handlowa Trade name	Mikroorganizm Microorganism	Przykłady szkodników docelowych Examples of target pests	Wybrane uprawy Selected crops
Lepinox Plus	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> szczep EG 2348	ćma bukszpanowa (<i>Cydalima perspectalis</i>), słonecznica orężówka (<i>Helicoverpa armigera</i>), błyszczka jarzynówka (<i>Autographa gamma</i>), bielinek kapustnik (<i>Pieris brassicae</i>), piętnówka kapustnica (<i>Mamestra brassicae</i>)	rośliny ozdobne (bukszpan) drzewa ziarnkowe (jabłoń, grusza) warzywa psiankowate (pomidor) warzywa kapustne (kapusta) rośliny jagodowe (truskawka) ornamental plants (boxwood) pome fruit trees (apple, pear) solanaceous vegetables (tomato) brassica vegetables (cabbage) berry plants (strawberry)
BioBit	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	skośnik pomidorowy (<i>Tuta absoluta</i>), owocówka jabłkowieczka (<i>Cydia pomonella</i>), ćma bukszpanowa (<i>Cydalima perspectalis</i>)	warzywa psiankowate (pomidor, bakłażan) drzewa ziarnkowe (jabłoń, grusza) rośliny ozdobne (bukszpan) solanaceous vegetables (tomato, aubergine) pome fruit trees (apple, pear) ornamental plants (boxwood)
BioDor Pro	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	bielinek kapustnik (<i>Pieris brassicae</i>), bielinek rzepnik (<i>Pieris rapae</i>)	warzywa kapustne (kapusta głowiasta, kalafior, brokuł, kapusta brukselska) brassica vegetables (cabbage, cauliflower, broccoli, Brussels sprout)
Thurinox	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> szczep EG 2348	skośnik pomidorowy (<i>Tuta absoluta</i>), słonecznica orężówka (<i>Helicoverpa armigera</i>)	warzywa psiankowate (pomidor) drzewa ziarnkowe (jabłoń) solanaceous vegetables (tomato) pome fruit trees (apple)
Florbac	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	błyszczka jarzynówka (<i>Autographa gamma</i>), tantniś krzyżowiaczek (<i>Plutella xylostella</i>), bielinek rzepnik (<i>Pieris rapae</i>), bielinek kapustnik (<i>Pieris brassicae</i>) i inne gąsienice uszkadzające liście	warzywa dyniowate (ogórek, cukinia) warzywa korzeniowe (burak ćwikłowy) rośliny strączkowe (fasola szparagowa, bób) warzywa kapustne (kapusta głowiasta, kalafior, brokuł, jarmuż, kalarepa) drzewa ziarnkowe (grusza, pigwa) rośliny jagodowe (malina, jeżyna) cucurbit vegetables (cucumber, courgette) root vegetables (beetroot) leguminous vegetables (green bean, broad bean) brassica vegetables (cabbage, cauliflower, broccoli, kale, kohlrabi) pome fruit trees (pear, quince) berry plants (raspberry, blackberry)

ny strukturalne w receptorach jelitowych. Szczególne znaczenie mają mutacje oraz zmniejszona ekspresja genów kodujących białka receptorowe, takie jak aminopeptydaza N, fosfataza alkaliczna oraz białka podobne do kadheryn. Zmiany te mogą zakłócać wiązanie toksyn Cry z komórkami nabłonkowymi jelit owadów, co prowadzi do obniżenia skuteczności toksyn i rozwoju odporności u szkodników (Guo i wsp. 2020).

Odporność na toksyny Bt została potwierdzona u co najmniej dziewięciu gatunków owadów w warunkach polowych, zwłaszcza w regionach, gdzie przez dłuższy czas

uprawiano rośliny zmodyfikowane genetycznie, zawierające geny kodujące białka Bt (Fernández-Chapa i wsp. 2019; Guo i wsp. 2020; Jurat-Fuentes i wsp. 2021; Afzal i wsp. 2024). Możliwość adaptacji owadów na δ -endotoksyny bakteryjne należy również rozważyć w kontekście szkodników stanowiących zagrożenie w środowisku leśnym, gdzie presja selekcyjna spowodowana stosowaniem tych samych szczepów Bt przez wiele lat może zwiększać odporność niektórych owadów szkodliwych (Griffitts i Aroian 2005; Olivieri i wsp. 2021).

Skuteczne zarządzanie odpornością owadów wymaga wdrożenia długoterminowych strategii, które obejmują zintegrowane lub naprzemiennie stosowanie bioinsektycydów opartych na mikroorganizmach oraz innych entomopatogenów, takich jak nicienie czy grzyby entomopatogeniczne. Kluczowym elementem tych strategii jest zachowanie tzw. refugium – obszarów, na których populacje owadów nie są narażone na działanie toksyn Bt, co pozwala ograniczyć presję selekcyjną i spowolnić rozwój odporności (Fernández-Chapa i wsp. 2019; Olivieri i wsp. 2021; Ahmad i wsp. 2022; Tabashnik i wsp. 2023).

Bacillus thuringiensis* jako biopreparat w rolnictwie: obawy związane z pokrewieństwem z *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide in agriculture: concerns related to its relation to *Bacillus cereus

Biopreparaty zawierające *B. thuringiensis* odgrywają kluczową rolę w zrównoważonej ochronie roślin przed szkodnikami owadzimi. Pomimo licznych korzyści wynikających z ich stosowania, konieczne jest rozważenie potencjalnych zagrożeń związanych z bliskim pokrewieństwem *B. thuringiensis* z patogennym *B. cereus* oraz innymi gatunkami należącymi do grupy *Bacillus cereus sensu lato*. Szczególne znaczenie ma *Bacillus cereus sensu stricto* (*B. cereus ss*), bakteria odpowiedzialna za dwa rodzaje zatruc pokarmowych: zatrucie emetyczne, spowodowane spożyciem termostabilnej toksyny cereulidu oraz toksykoinfekcję biegunkową, wynikającą z obecności wegetatywnych komórek lub przetrwalników *B. cereus*, które po spożyciu wytwarzają enterotoksyny w przewodzie pokarmowym człowieka. Główne toksyny odpowiedzialne za zespół biegunkowy to niehemolityczna enterotoksyna (Nhe), hemolizyna BL (Hbl) oraz cytotoksyna K (CytK). Podobnie jak *B. cereus*, *B. thuringiensis* zawiera geny kodujące powyższe enterotoksyny, tj. *nhe*, *hbl* oraz *cytK* (Schwenk i wsp. 2020; De Bock i wsp. 2021). Co więcej, obie bakterie wykazują ponad 99% zgodności w sekwencji genu 16S rRNA, co znacznie utrudnia ich rozróżnienie podczas rutynowych badań diagnostycznych w zakresie bezpieczeństwa żywności (De Bock i wsp. 2021).

Wysoki poziom homologii genetycznej między *B. thuringiensis* a *B. cereus ss* wywołał debatę na temat bezpieczeństwa szerokiego stosowania biopreparatów Bt w rolnictwie. Główne obawy wynikają z możliwości spożycia produktów roślinnych zanieczyszczonych przetrwalnikami, które mogą przekształcić się w formy wegetatywne zdolne do produkcji toksyn. Jednakże, jak wskazują badania, stężenie *B. thuringiensis* na świeżych produktach po zastosowaniu biopreparatów rzadko przekracza poziom 10^5 CFU/g, który mógłby stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Zazwyczaj stężenia te mieszczą się

w zakresie 10^2 – 10^4 CFU/g, co na podstawie analiz toksykologicznych i epidemiologicznych uznaje się za bezpieczne. Nawet przy maksymalnych dawkach stosowanych w rolnictwie, ryzyko przekroczenia wartości 10^5 CFU/g, uznawanej za potencjalnie niebezpieczną, jest mniejsze niż 1% (De Bock i wsp. 2021).

Chociaż przetrwalniki *B. thuringiensis* mogą przetrwać kwaśne środowisko żołądka, ich zdolność do kiełkowania w jelicie człowieka jest ograniczona (Jessberger i wsp. 2020; Schwenk i wsp. 2020; De Bock i wsp. 2021). Badania *in vitro* wykazały, że choć przetrwalniki Bt mogą przylegać do komórek nabłonka jelitowego, większość szczepów stosowanych w biopestycydach nie wykazuje zdolności do kiełkowania w warunkach przewodu pokarmowego człowieka (Schwenk i wsp. 2020). Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach z wykorzystaniem symulatora SHIME®, w których nie zaobserwowano kiełkowania przetrwalników szczepów ABTS-1857 i ABTS-351 w warunkach symulujących środowisko jelitowe człowieka, co znacząco zmniejsza ryzyko toksykoinfekcji biegunkowej (De Bock i wsp. 2021).

Zalecana dawka aplikacyjna preparatów *B. thuringiensis* wynosi około 1 kg na hektar upraw, co odpowiada osadzeniu około 3×10^5 przetrwalników na cm^2 powierzchni roślin. Jednak liczba ta zmniejsza się w wyniku działania czynników środowiskowych, takich jak promieniowanie słoneczne, które przyspiesza degradację spor oraz opady deszczu, które powodują ich wypłukiwanie z powierzchni roślin. W rezultacie, aplikacja biopreparatów Bt we wczesnych fazach wzrostu roślin skutkuje znacznym zmniejszeniem liczby przetrwalników przed zbiorami (De Bock i wsp. 2021).

Pomimo obecności genów kodujących enterotoksyny w formach przetrwalnikowych *B. thuringiensis*, ich potencjalna patogenność jest znacząco niższa w porównaniu do *B. cereus*. Ponadto, instytucje regulacyjne, takie jak Agencja Ochrony Środowiska (EPA), wymagają szczegółowych ocen bezpieczeństwa szczepów Bt stosowanych w biopestycydach, aby zapewnić, że nie stanowią one zagrożenia dla ludzi i innych organizmów niebędących celem ich działania. Ryzyko związane z konsumpcją produktów rolnych traktowanych biopreparatami Bt pozostaje więc na niskim, kontrolowanym poziomie. Niemniej jednak, niezbędny jest ciągły monitoring oraz badania dotyczące stabilności przetrwalników *B. thuringiensis* w środowisku oraz warunków sprzyjających ich kiełkowaniu i produkcji toksyn (Schwenk i wsp. 2020; De Bock i wsp. 2021). Szczegółowe analizy genomowe i proteomiczne mogą dostarczyć dodatkowych informacji na temat obecności i ekspresji czynników wirulencji w różnych szczepach *B. thuringiensis*, co może przyczynić się do zwiększenia zaufania zarówno środowiska naukowego, jak i konsumentów do bezpieczeństwa tych biopreparatów (Fenibo i wsp. 2021; Zhao i wsp. 2022).

Podsumowanie / Summary

Z uwagi na prognozowany wzrost średnich temperatur na całym świecie, a przez to wzrost aktywności niektórych szkodników owadzi, obecnie prowadzone badania skupiają się nad możliwością ograniczenia liczebności fitofagów przy jak najmniejszym zużyciu chemicznych środków owadobójczych. Bioinsektycydy na bazie organizmów entomopatogenicznych to jedno z rozwiązań, które umożliwia skuteczne zwalczanie owadów, przy jednoczesnym zachowaniu dbałości o środowisko naturalne. W celu zwiększenia skuteczności preparatów *Bt* opracowywane są nowe formułacje, zawierające endospory i kryształy parasporalne szczepów *B. thuringiensis* o wyższej wirulencji względem owadów. Ponadto podejmowane są działania w celu zwiększenia trwałości preparatu na listowiu oraz wydłużenia czasu przechowywania. Bakterie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* oraz *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* są obecnie zarejestrowane jako czynnik biologicznych środków ochrony roślin przeznaczonych do zwalczania szkodników na trawnikach i murawach. Chociaż nie są one

jeszcze powszechnie stosowane, mogą zapewnić skuteczną ochronę, zwłaszcza jeśli zostałyby aplikowane w momencie, gdy owady znajdują się jeszcze we wczesnych stadiach larwalnych (Lacey i wsp. 2015). Nowe formułacje mogą zapewnić łatwiejszą i skuteczniejszą aplikację i tym samym przyczynić się do szerszego wykorzystywania preparatów *Bt* w biologicznej ochronie roślin przed owadami szkodliwymi (Fernández-Chapa i wsp. 2019). Ponadto, opracowywanie nowych, skuteczniejszych formułacji biopreparatów *Bt* stanowi istotny wkład w rozwój metod integrowanej ochrony roślin, której celem jest ograniczenie chemizacji środowiska naturalnego poprzez zrównoważone stosowanie pestycydów. Większość poznanych dotychczas szczepów *B. thuringiensis* wykazuje również zdolność do syntezy bakteriocynów i nanocząsteczek srebra o właściwościach antyseptycznych, które hamują wzrost i rozwój wielu gatunków bakterii. Obecnie prowadzone są badania nad praktycznym zastosowaniem tych związków w medycynie (Nayak i wsp. 2016; Jouzani i wsp. 2017; Khaleghi i wsp. 2019).

Literatura / References

- Adang M.J., Crickmore N., Jurat-Fuentes J.L. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology* 47: 39–87. DOI: 10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6
- Afzal M.B.S., Ijaz M., Abbas N., Shad S.A., Serrão J.E. 2024. Resistance of lepidopteran pests to *Bacillus thuringiensis* toxins: evidence of field and laboratory evolved resistance and cross-resistance, mode of resistance inheritance, fitness costs, mechanisms involved and management options. *Toxins* 16 (7): 315. DOI: 10.3390/toxins16070315
- Ahmad S.F., Gulzar A., Tariq M., Rasool B., Khan D., Ullah S., Asad M.J. 2022. Resistance, cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis kurstaki* in *Earias vittella* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 175: 105058. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105058
- Arakere U.C., Jagannath S., Krishnamurthy S., Chowdappa S., Konappa N. 2022. Microbial bio-pesticide as sustainable solution for management of pests: achievements and prospects. s. 183–200. W: *Biopesticides. Volume 2: Advances in Bio-Inoculants* (A. Rakshit, V.S. Meena, P.C. Abhilash, B.K. Sarma, H.B. Singh, L. Fraceto, M. Parihar, A.K. Singh, red.). Elsevier. ISBN 978-0-12-823355-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-823355-9.00016-X
- Barbero F., Pogolotti C., Bonelli S., Ferracini C. 2024. Is microbial control of the box tree moth feasible? Effectiveness and impact on non-target diurnal Lepidoptera. *Biological Control* 188: 105427. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105427
- Bartoszewicz M., Czyżewska U. 2017. Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* sensu lato. [Taxonomy, virulence and life cycles of *Bacillus cereus* sensu lato]. *Postępy Mikrobiologii* 56 (4): 440–450.
- Berliner E. 1915. Über die Schlafsucht der Mehlmotterraupe (*Ephestia Kuhnii*, Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 2 (1): 29–56. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x
- Bravo A., Martínez de Castro D., Sánchez J., Cantón P.E., Mendoza G., Gómez I., Pacheco S., García-Gómez B.I., Onofre J., Ocelotl J., Soberón M. 2015. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins and their use in the control of insect pests. s. 858–873. W: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (J.E. Alouf, D. Ladant, M.R. Popoff, red.). Elsevier Ltd., 1200 ss. ISBN 978-012-800-18-82. e-ISBN 978-012-800-58-97.
- Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I., Fitz-James P.C. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 8 (2): 147–204. DOI: 10.3109/10408418009081124
- Castella C., Pauron D., Hilliou F., Trang V.T., Zucchini-Pascal N., Gallet A., Barbero P. 2019. Transcriptomic analysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells resistant to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin reveals that extracellular Ca²⁺, Mg²⁺ and production of cAMP are involved in toxicity. *Biology Open* 8 (4): bio037085. DOI: 10.1242/bio.037085
- Chen J., Aimanova K.G., Pan S., Gill S.S. 2009. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (10): 688–696. DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.08.003
- Coyle D.R., Adams J., Bullas-Appleton E., Llewellyn J., Rimmer A., Skvarla M.J., Smith S.M., Chong J.-H. 2022. Identification and management of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) in North America. *Journal of Integrated Pest Management* 13 (1): 24. DOI: 10.1093/jipm/pmac020
- Cucchi A., Sanchez de Rivas C. 1998. SASP (small, acid-soluble spore proteins) and spore properties in *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Current Microbiology* 36: 220–225. DOI: 10.1007/s002849900298

- DataIntel 2021. Global *Bacillus thuringiensis* pesticide market by type. <https://dataintel.com/report/global-bacillus-thuringiensis-pesticide-market> [Accessed: 20.08.2024].
- De Bock T., Zhao X., Jacxsens L., Devlieghere F., Rajkovic A., Spanoghe P., Höfte M., Uyttendaele M. 2021. Evaluation of *B. thuringiensis*-based biopesticides in the primary production of fresh produce as a food safety hazard and risk. *Food Control* 130 (4): 108390. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108390
- de Maagd R.A. 2014. *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. s. 185–192. W: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture (B. Lugtenberg, red.). Springer, International Publishing, Switzerland. ISBN 978-3-319-08574-6. e-ISBN 978-3-319-08575-3. DOI: 10.1007/978-3-319-08575-3_20
- 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 (4): 193–199. DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02237-5
- de Oliveira J.L., Fraceto L.F., Bravo A., Polanczyk R.A. 2021. Encapsulation strategies for *Bacillus thuringiensis*: from now to the future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (16): 4564–4577. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c07118
- do Nascimento J., Goncalves K.C., Dias N.P., de Oliveira J.L., Bravo A., Polanczyk R.A. 2022. Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. *Biological Control* 165: 104792. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104792
- Dominguez-Arrizabalaga M., Villanueva M., Escriche B., Ancín-Azpilicueta C., Caballero P. 2020. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins* 12 (7): 430. DOI: 10.3390/toxins12070430
- Dubois T., Faegri K., Perchat S., Lemy C., Buisson C., Nielsen-LeRoux C., Gohar M., Jacques P., Ramarao N., Kolstø A.-B., Lereclus D. 2012. Necrotrophism is a *quorum-sensing*-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLOS Pathogens* 8 (4): e1002629. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002629
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów. 2009. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 309/71.
- Fenibo E.O., Ijoma G.N., Matambo T. 2021. Biopesticides in sustainable agriculture: a critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 619058. DOI: 10.3389/fsufs.2021.619058
- Fernández-Chapa D., Ramírez-Villalobos J., Galán-Wong L. 2019. Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: an overview. s. 2–22. W: Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era (Y. Jia, red.). IntechOpen, 218 ss. ISBN 978-1-78984-388-0. <https://www.intechopen.com/books/8021> [Accessed: 20.08.2024].
- Forsyth G., Logan N.A. 2000. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from northern Victoria land, Antarctica. *Letters in Applied Microbiology* 30 (3): 263–266. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2000.00706.x
- Gęsicka A., Henschke A., Barańska Z., Wolna-Maruwka A. 2020. *Bacillus thuringiensis* - nowy potencjał aplikacyjny. [*Bacillus thuringiensis* - new application potential]. *Postępy Mikrobiologii* 59 (4): 357–366. DOI: 10.21307/PM-2020.59.4.27
- Griffitts J.S., Aroian R.V. 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays* 27 (6): 614–624. DOI: 10.1002/bies.20239
- Guerrero G.G., Favela-Hernandez J.M., Balderas-Renteria I. 2024. Plasmid vector(s) in *Bacillus thuringiensis* harbor genes for insect pest control and for neglected infectious diseases in humans. *Frontiers in Tropical Diseases* 5: 1416187. DOI: 10.3389/ftd.2024.1416187
- Guo Z., Kang S., Sun D., Gong L., Zhou J., Qin J., Guo L., Zhu L., Bai Y., Ye F., Wu Q., Wang S., Crickmore N., Zhou X., Zhang Y. 2020. MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host. *Nature Communications* 11 (1): 3003. DOI: 10.1038/s41467-020-16608-8
- Helgason E., Økstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2627–2630. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000
- Hernández-Fernández J. 2016. *Bacillus thuringiensis*: a natural tool in insect pest control. s. 121–139. W: The Handbook of Microbial Bioresources (V.K. Gupta, G.D. Sharma, M.G. Tuohy, R. Gaur, red.). CABI, 720 ss. ISBN 978-1-78064-521-6.
- Horikoshi R.J., Bernardi O., Amaral F.S.D.A., Miraldo L.L., Durigan M.R., Bernardi D., Silva S.S., Omoto C. 2019. Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. *Journal of Invertebrate Pathology* 161: 1–6. DOI: 10.1016/j.jip.2018.12.008
- Hung T.P., Truong L.V., Binh N.D., Frutos R., Quiquampoix H., Staunton S. 2016. Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. *Environmental Pollution* 208: 318–325. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.09.046
- Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs* 1 (1): 31–50. DOI: 10.4161/bbug.1.1.10519
- Jessberger N., Dietrich R., Granum P.E., Märklbauer E. 2020. The *Bacillus cereus* food infection as a multifactorial process. *Toxins* 12 (11): 701. DOI: 10.3390/toxins12110701
- Jones M.M., Robertson J.L., Weinzierl R.A. 2011. Susceptibility of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) to two pyrethroids and a proposed diagnostic dose of esfenvalerate for field detection of resistance. *Journal of Economic Entomology* 104 (3): 1031–1037. DOI: 10.1603/EC10399
- Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 2691–2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y
- Jurat-Fuentes J.L., Heckel D.G., Ferré J. 2021. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 66: 121–140. DOI: 10.1146/annurev-ento-052620-073348
- Kabaluk T., Gazdik K. 2007. Directory of microbial pesticides for agricultural crops in OECD countries. Agriculture and Agri-Food Canada. https://publications.gc.ca/collections/collection_2009/agr/A42-107-2007E.pdf [Accessed: 20.08.2024].
- Kashyap L., Goswami T.N., Patel V.K., Sharma R.K. 2017. *Bacillus thuringiensis* and insect pest management. s. 331–369. W: Biopesticides and Bioagents (M.A. Anwer, red.). Apple Academic Press, 418 ss. ISBN 978-177-188-51-95.
- Khaleghi M., Khorrani S., Ravan H. 2019. 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. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18: 101047. DOI: 10.1016/j.cbab.2019.101047

- Kirsch K., Schmutterer H. 1988. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. *Journal of Applied Entomology* 105 (1–5): 249–255. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1988.tb00183.x
- Knowles B.H., Ellar D.J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 924 (3): 509–518. DOI: 10.1016/0304-4165(87)90167-X
- Konecka E., Kaznowski A., Baranek J. 2011. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. [The usage of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide production]. *Postępy Mikrobiologii* 50 (4): 303–311.
- Kowalska J. 2023. Ochrona roślin w rolnictwie ekologicznym. s. 61–73. W: *Rolnictwo ekologiczne w Polsce. Studia i Raporty IUNG – PIB* (K. Jończyk, red.), Zeszyt 70 (24). Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, 205 ss.
- Lacey L.A., Arthurs S.P., Knight A., Huber J. 2007. Microbial control of lepidopteran pests of apple orchards. s. 557–576. W: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. 2nd Edition. Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests* (L.A. Lacey, H.K. Kaya, red.). Kluwer Academic, 932 ss. DOI: 10.1007/978-1-4020-5933-9
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1–41. DOI: 10.1016/j.jip.2015.07.009
- Las Heras S., Arimany M., Artola J., Bassols E. 2019. Desarrollo de métodos para una gestión integrada de la polilla del boj (*Cydalima perspectalis*) (Lepidoptera: Crambidae) en parques, jardines y espacios verdes. *Phytoma* 308: 56–63.
- Lonc E., Lachowicz T.M. 1993. Aktualne i potencjalne możliwości zastosowania delta-endotoksyn *Bacillus* spp. w zwalczaniu szkodliwych i uciążliwych owadów. [Current and future use of *Bacillus* spp. delta – endotoxins in control of pest and nuisance insects]. *Wiadomości Parazytologiczne* 39 (4): 345–356.
- Lone S.A., Malik A., Padaria J.C. 2017. Characterization of lepidopteran-specific *cry1* and *cry2* gene harbouring native *Bacillus thuringiensis* isolates toxic against *Helicoverpa armigera*. *Biotechnology Reports* 15: 27–32. DOI: 10.1016/j.btre.2017.05.001
- Maeda M., Mizuki E., Nakamura Y., Hatano T., Ohba M. 2000. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiology* 40 (6): 418–422. DOI: 10.1007/s002840010080
- Makles Z., Domański W. 2008. Ślady pestycydów – niebezpieczne dla człowieka i środowiska. *Bezpieczeństwo Pracy: Nauka i Praktyka* 1: 5–9.
- Malinowski H. 1997. Stan odporności ważniejszych szkodliwych owadów leśnych na insektycydy. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa, Seria A* 830: 5–44.
- Martin P.A., Travers R.S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10): 2437–2442. DOI: 10.1128/aem.55.10.2437-2442.1989
- Matyjaszczyk E. 2008. Perspektywy zmian na rynku środków ochrony roślin w Polsce w świetle nowelizacji wymagań unijnych. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Problemy Rolnictwa Światowego* 4 (18): 300–308. DOI: 10.22630/PRS.2008.4.41
- Maughan H., Van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11 (5): 789–797. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.02.001
- Meadows M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. s. 193–220. W: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice* (P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs, red.). John Wiley & Sons, Chichester, UK, 330 ss.
- Mendoza-Almanza G., Esparza-Ibarra E.L., Ayala-Luján J.L., Mercado-Reyes M., Godina-González S., Hernández-Barrales M., Olmos-Soto J. 2020. The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells. *Toxins* 12 (5): 301. DOI: 10.3390/toxins12050301
- Miranda L.S., Rudd S.R., Mena O., Hudspeth P.E., Barboza-Corona J.E., Park H.W., Bideshi D.K. 2024. The perpetual vector mosquito threat and its eco-friendly nemeses. *Biology* 13 (3): 182. DOI: 10.3390/biology13030182
- Nault B.A., Seaman A. 2019. Colorado potato beetle control with insecticides allowed for organic production, 2017 and 2018. *Arthropod Management Tests* 44 (1): tsz081. DOI: 10.1093/amt/tsz081
- Nayak P.S., Arakha M., Kumar A., Asthana S., Mallick B.C., Jha S. 2016. An approach towards continuous production of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis*. *RSC Advances* 6 (10): 8232–8242. DOI: 10.1039/C5RA21281B
- NCBI 2023. *Bacillus thuringiensis*. https://www.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 [Accessed: 20.08.2024].
- Neale M.C. 1997. Biopesticides – harmonization of registration requirements within EU Directive 91/414 – an industry view 1. *EPPO Bulletin* 27 (1): 89–93. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101047
- Nielsen-LeRoux C., Gaudriault S., Ramarao N., Lereclus D., Givaudan A. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology* 15 (3): 220–231. DOI: 10.1016/j.mib.2012.04.006
- Niemiec W. 2024. Wykorzystanie proekologicznych preparatów w ochronie roślin sadowniczych. s. 99–102. 63. Ogólnopolska Naukowa Konferencja Ochrony Roślin Sadowniczych. Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice, 15 lutego 2024, 139 ss. ISBN 978-83-67039-31-4.
- Olivieri M., Mannu R., Ruiu L., Ruiu P.A., Lentini A. 2021. Comparative efficacy trials with two different *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strains against gypsy moth in mediterranean cork oak forests. *Forests* 12 (5): 602. DOI: 10.3390/f12050602
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6 (12): 3296–3325. DOI: 10.3390/toxins6123296
- Peng Q., Yu Q., Song F. 2019. Expression of cry genes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103: 1617–1626. DOI: 10.1007/s00253-018-9552-x
- Pinos D., Andrés-Garrido A., Ferré J., Hernández-Martínez P. 2021. Response mechanisms of invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 85 (1): e00007-20. DOI: 10.1128/MMBR.00007-20
- Piwowar A. 2018. Chemiczna ochrona roślin we współczesnym rolnictwie w perspektywie ekonomicznej i ekologicznej – korzyści, koszty oraz preferencje. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, 340 ss. ISBN 978-83-7695-681-7.

- Pruszyński S., Pruszyński G. 2013. Zrównoważone stosowanie pestycydów. *Zagadnienia Doradztwa Rolniczego* 72 (2): 23–39.
- Sajid M., Geng C., Li M., Wang Y., Liu H., Zheng J., Peng D., Sun M. 2018. Whole-genome analysis of *Bacillus thuringiensis* revealing partial genes as a source of novel Cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (14): e00277-18. DOI: 10.1128/AEM.00277-18
- Sanchis V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticides *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31 (1): 217–231. DOI: 10.1051/agro/2010027
- Sanchis V., Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28 (1): 11–20. DOI: 10.1051/agro/2007054
- Schwenk V., Riegg J., Lacroix M., Märklbauer E., Jessberger N. 2020. Enteropathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from soil, animals, food and biopesticides. *Foods* 9 (10): 1484. DOI: 10.3390/foods9101484
- Sierpińska A. 2000. *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa, Seria A 2* (895–899): 71–99.
- Skrzecz I., Sierpińska A., Tumialis D. 2024. Entomopathogens in the integrated management of forest insects: from science to practice. *Pest Management Science* 80 (6): 2503–2514. DOI: 10.1002/ps.7871
- Skrzecz I., Ślusarski S., Tkaczyk M. 2020. Integration of science and practice for *Dendrolimus pini* (L.) management – A review with special reference to Central Europe. *Forest Ecology and Management* 455: 117697. DOI: 10.1016/j.foreco.2019.117697
- Skwiercz A., Zapałowska A. 2018. Nicienie entomopatogenne w lasach i szkółkach leśnych. [Entomopathogenic nematodes in the soil of forests and nurseries]. *Sylwan* 162 (12): 1018–1028.
- Smith R.A., Couche G.A. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1): 311–315. DOI: 10.1128/aem.57.1.311-315.1991
- Szwejska J. 2014. Szkodliwa entomofauna występująca na uprawach roślin warzywnych w Polsce, w latach 1861–2008. [Harmful entomofauna of vegetable crops occurring on fields in Poland, in 1861–2008]. *Progress in Plant Protection* 54 (1): 61–65. DOI: 10.14199/ppp-2014-011
- Święcicka I. 2012. *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu owadów. s. 131–143. W: *Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce* (I. Skrzecz, A. Sierpińska, red.). Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, 381 ss. ISBN 978-83-62830-11-4.
- Święcicka I., Buczek J., Fiedoruk K. 2001. *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu owadów. [*Bacillus thuringiensis* – an insecticide]. *Medycyna Weterynaryjna* 57 (12): 859–862.
- Tabashnik B.E., Brévault T., Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology* 31 (6): 510–521. DOI: 10.1038/nbt.2597
- Tabashnik B.E., Cushing N.L., Finson N., Johnson M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology* 83 (5): 1671–1676. DOI: 10.1093/jee/83.5.1671
- Tabashnik B.E., Fabrick J.A., Carrière Y. 2023. Global patterns of insect resistance to transgenic Bt crops: the first 25 years. *Journal of Economic Entomology* 116 (2): 297–309. DOI: 10.1093/jee/toac183
- Tabone E., Capelli M., Morel E., De Bodard M., Colombel E., Guerin M., Deogratias J.M. 2022. An innovative and effective strategy for the biocontrol of the box tree moth. s. 43–50. W: XXXI International Horticultural Congress (IHC2022): International Symposium on Sustainable Control of Pests and Diseases, France, 14 August 2022, 425 ss.
- Vilas-Bôas G.T., Santos C.A. 2012. Conjugation in *Bacillus thuringiensis*: insights into the plasmids exchange proces. s. 159–174. W: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology (E. Sansinenea, red.). Springer, Dordrecht, 392 ss. ISBN 978-94-007-3020-5. e-ISBN 978-94-007-3021-2. DOI: 10.1007/978-94-007-3021-2_8
- Wei S., Chelliah R., Park B.J., Kim S.H., Forghani F., Cho M.S., Park D.S., Jin Y.G., Oh D.H. 2019. Differentiation of *Bacillus thuringiensis* from *Bacillus cereus* group using a unique marker based on real-time PCR. *Frontiers in Microbiology* 10: 883. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00883
- Wraight S.P., Lacey L.A., Kabaluk J.T., Goettel M.S. 2009. Potential for microbial biological control of coleopteran and hemipteran pests of potato. *Fruit Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 3 (1): 25–38.
- Zhao X., Zervas A., Hendriks M., Rajkovic A., Van Overbeek L., Hendriksen N.B., Uyttendaele M. 2022. Identification and characterization of *Bacillus thuringiensis* and other *Bacillus cereus* group isolates from spinach by whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology* 13: 1030921. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1030921