

Bezpieczeństwo ekologiczne komarobójczych biocydów *Bacillus thuringiensis israelensis*

Ecological safety of mosquitocidal biocides based on *Bacillus thuringiensis israelensis*

Katarzyna Rydzanicz, Elżbieta Lonc

Zakład Ekologii Drobnoustrojów i Ochrony Środowiska, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148, Wrocław

Adres do korespondencji: Katarzyna Rydzanicz; E-mail: katarzyna.rydzanicz@microb.uni.wroc.pl

ABSTRACT. *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) has been developed into many products for the biological control of dipteran larvae, including mosquitoes (Culicidae), black flies (Simuliidae), and midges (Chironomidae) in various parts of the World. *Bti* appears to pose significantly less of a risk than other chemical pesticides used for mosquito control and eradication programs. Bioproducts based on *Bti* are highly selective with short environmental persistence, and thus they have very little potential to cause damage to populations of non-target organisms. So far, no example of an unexpected pathogenic organism being developed in the field as well as no examples of resistance to *Bti* both laboratory and field populations of mosquitoes have been documented. There are some indications that large declines in insect biomass can occur after long-term use of *Bti* in freshwater wetlands. However, no evidence for permanent damage to ecosystem function has been found. Organisms that utilized insects for food, adapted to the declines and either switched to other food sources or migrate (birds) outside of the treated zones to acquire insects. Even though over 40 tons of *Bti* have been applied in West Africa alone, no indications of human health or non-target effects have been reported.

Key words: *Bacillus thuringiensis israelensis*, mosquito control, conservation biodiversity, target and non-target organisms, microbial larvicides

Wstęp

Potrzeba zwalczania komarów, wynikająca z ich uciążliwości i wektorowej roli w transmisji wielu chorób tropikalnych, w tym pasożytniczych, głównie malarii [1] jest szeroko kontestowana także w wymiarze europejskim w związku z dynamicznie rozwijającym się zjawiskiem globalizacji oraz zmianami klimatu [2,3]. Zagrożeniem jest możliwość przenoszenia także chorób infekcyjnych i inwazyjnych nieznanymi dotychczas w klimacie umiarkowanym przez gatunki komarów, które nie występowały dotychczas w składzie europejskiej fauny [4].

Skuteczną profilaktyką przeciwkomarową są ra-

jonalne, choć niełatwe i kosztowne rozwiązania zmierzające do ograniczania liczebności uciążliwych gatunków, za pomocą metod i środków bezpiecznych dla ludzi oraz środowiska [5,6]. Przykładem są propagowane na Zachodzie i w Stanach Zjednoczonych, już w latach 60. XX w. tzw. integrowane, czyli łączone sposoby kontroli. Polegają one na umiejętnym ograniczaniu liczebności gatunków plagowych na określonym obszarze, a nie na całkowitej ich eliminacji z biocenoz. W tych dopuszczalnych procedurach dominują jednak selektywne, a więc przyjazne środowisku metody biologiczne, a rolę uzupełniającą pełnią niespecyficzne chemiczne środki, podobnie jak fizyczne i mechaniczne sposoby zwalczania.

Wśród powszechnie znanych i zalecanych przez gremia Światowej Organizacji Zdrowia już w latach 80. XX w. największe znaczenie praktyczne mają mikrobiologiczne preparaty zawierające kryształy delta-endotoksyn produkowane przez laseczki z rodzaju *Bacillus*, w tym głównie przez *B. thuringiensis israelensis* H-14 (*Bti*) i *B. sphaericus* – *Bs* [7–9]. Skuteczne zastosowanie tych mikrobiologicznych preparatów potwierdzono w Europie (m.in. w takich krajach jak Niemcy, Szwajcaria, Francja, Czechy, Austria, Szwecja, Włochy), a także w wielu programach zwalczania malarii w Chinach, Peru, Indonezji, Malezji i Ekwadorze, jak i realizowanego pod auspicjami WHO w latach 1975–2002 w Afryce Zachodniej, międzynarodowego programu zwalczania onchocerkozy na terenie 11 państw położonych wzdłuż rzeki Volty [10].

Otwartym wciąż zagadnieniem – obok skuteczności biopreparatów – jest ich środowiskowe bezpieczeństwo. Dylematy dotyczą głównie wpływu biocydów *Bti*, czyli oddziaływania bakterii i ich metabolitów (krystalicznych białek toksycznych dla larw komarów) na współbytujące w wodzie organizmy nie będące przedmiotem zwalczania, tzw. *non-target organisms*. Określenie zakresu i rodzaju reakcji różnych grup kręgowców i bezkręgowców, zwłaszcza wodnych polega na badaniu, głównie warunkach laboratoryjnych, ich wrażliwości na protoksyny laseczek, które dopiero po dostaniu się do wnętrza ulegają aktywacji w zależności od warunków fizjologicznych (pH) w jelicie testowanych gatunków. Zakres i rodzaj wpływu zależy od biologicznych właściwości bakteryjnych szczepów, które wykorzystuje się w przemysłowej produkcji mikrobiologicznych preparatów.

Charakterystyka mikrobiologicznych czynników

Obecna produkcja mikrobiologicznych komarobójczych larwicydów wiąże się z odkryciem specyficznego szczepu laseczek *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14 w 1976 r. oraz wcześniejszych (w 1960 r.) równie silnie działających szczepów *B. sphaericus* [10]. Warto wspomnieć, że *Bti* wyizolowano z larw martwych komarów na pustyni Negev w Izraelu, ale te kosmopolityczne laseczki występują w różnych środowiskach. Szczepy *B. thuringiensis* są izolowane nie tylko z jelit owadów, ale także z gleby, powierzchni liści, przechowywanych produktów (ziaren zbóż), a także z odchodów zwierząt [11,12]. Powszechnie wiadomo, że większość

z nich, głównie *B. th. kurstaki* wykazuje aktywność bójczą wobec gąsienic motyli, *B. th. tenebriosis* wobec larw chrząszczy (stonki ziemniaczanej), a tylko *Bti* wobec niektórych muchówek (komary, meszki).

Podstawą specyficzności *B. thuringiensis*, warunkującej toksyczność tylko wobec określonych gatunków owadów, jest zróżnicowana budowa parasporalnych białkowych inkluzji wytwarzanych przez te laseczki podczas sporulacji [13]. Kryształy te zbudowane są z białek znanych jako białka Cry (ang. *crystal proteins*) lub delta-endotoksyny, mających trójdomenową budowę [14]. Entomopatogenność *Bti*, który działa specyficznie na larwy komarów i meszek jest wynikiem produkcji toksycznych białek o masie Cry4A (125 kDa), Cry4B (135 kDa), Cry10A (58 kDa) i Cry11A (68 kDa), które wiążą się ze specyficznymi receptorami glikoproteinowymi na błonie nabłonka apikalnego owada, i które powstają podczas trzeciego etapu sporulacji, agregując w postaci ciał parasporalnych lub kryształów [15]. Piąta toksyna – CytA (27 kDa) – wykazuje powinowactwo lipidowe i nie bierze udziału w mechanizmie wiązania ze specyficznymi receptorami nabłonka jelitowego owadów.

Każdy z etapów formowania się toksycznych białek w komórce bakteryjnej ma podłoże genetyczne i biochemiczne [16]. Przekształcenie się tych protoksyn w aktywną toksynę zachodzi po rozpuszczeniu kryształu, a następnie proteolizie białek w jelicie środkowym larw owadów, przy wysokim zasadowym pH [17]. W praktyce tłumaczy to pełne bezpieczeństwo, np. dla ssaków, w których przewodzie pokarmowym dominuje odczyn kwaśny. Toksyna zmieniając konformację wiąże się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek kolumnowych tkanki nabłonkowej jelita środkowego larw owadów prowadząc do zaburzeń w selektywnej przepuszczalności jonów przez błonę białkowo-lipidową i częściowego lub całkowitego paraliżu. U larw komarów potraktowanych preparatami na bazie *Bti* obserwowano wstrzymanie pobierania pokarmu po około godzinie, redukcji aktywności następującej po 2 godz., aż do całkowitego paraliżu – po 6 godz. od momentu wnikięcia zawiesiny preparatu do jelita [18].

U organizmów niebędących obiektem zwalczania (*non-target organisms*) nie dochodzi do aktywacji protoksyn do stadium aktywnej toksyny wskutek braku odpowiedniego pH lub też odpowiednich receptorów na powierzchni komórek nabłonkowych jelita niezbędnych do związania się z aktywną toksyną [13]. Uważa się również, że owady mogą po-

siadać kilka receptorów dla jednej toksyny lub osobny receptor każdej z toksyn.

Cechą warunkującą bezpieczeństwo biopreparatów *Bt*, w tym komarobójczych larwicydów, jest krótki okres persystencji delta-endotoksyn w środowisku, które ulegają fotodegradacji już w ciągu 24–72 godzin [19]. Ponadto toksyczne białka łatwo utleniają się pod wpływem wolnych rodników reszt aminokwasów aromatycznych, zwłaszcza tryptofanu. Do czynników powodujących ich biodegradację należą również cykliczne zmiany temperatury i wilgotności, wiatr, a także substancje produkowane przez inne mikroorganizmy i wodne rośliny.

Wpływ *Bti* na organizmy niebędące obiektem zwalczania (*non-target organisms*)

Głony i bezkręgowce

Jak już wspomniano, *Bti* wykazuje pożądane, z punktu widzenia zwalczania, właściwości patogenne względem komarów i meszek, gatunków które rozważamy jako wektory chorób zakaźnych i pasożytniczych. Z drugiej strony istotne jest oszacowanie bezpieczeństwa ekologicznego, czyli wpływu tych biopreparatów na niektóre współbytujące w środowisku wodnym organizmy, np. glony oraz larwy innych muchówek. Ograniczający wpływ na wzrost glonów *Closterium* sp. i *Chlorella* sp. stwierdzono w warunkach sztucznego środowiska w trakcie testowania skuteczności komarobójczego działania różnych, komercyjnych mikrobiologicznych insektycydów, takich jak VectoBac G (*Bti*) w dawce 48,1 kg/ha, VectoBac WDG (*Bti*) w dawce 0,6 kg/ha oraz preparatu na bazie *Bs* w dawce 3,1 kg/ha [20].

Sporządzona przez Glare i O'Callaghan [21] szczegółowa lista bezkręgowców, które testowano, głównie w warunkach laboratoryjnych, sporadycznie w warunkach terenowych, i które wykazywały nawet niewielką wrażliwość na działanie *Bti*, wykazała że oprócz Culicidae, należących do dwuskrzydłych (Diptera) byli to także przedstawiciele rodzin: Anisopodidae, Chironomidae, Glossinidae, Muscidae, Phlebotominae, Phoridae, Psychodidae, Sciariidae, Simuliidae, Tabanidae, Tephritidae, Tipulidae, roztoczy (Acari: Argasidae, Ixodidae, Pyroglyphidae), a nawet wszołów (Mallophaga, Menoponidae) oraz nicieni (Nematoda, Meloidogynidae).

Wrażliwość larw owadów w obrębie rzędu, a nawet między rodzajami jest zróżnicowana [22,23]. Wśród najlepiej przebadanych komarów kłujących, przedstawiciele *Culex*, *Aedes* i *Ochlerotatus* wyka-

zują większą wrażliwość na *Bti* w porównaniu z widliszkami *Anopheles* [24]. Generalnie uznaje się, że gatunki komarów, których larwy nie pobierają pokarmu za pomocą filtrowania nie są wrażliwe na *Bti*. Przykładem mogą być muchówki z gatunku *Culicoides occidentalis* [25] i *Coquillettidia perturbans* [26].

Na *Bti*, podobnie jak komary, reagują wodzienice (Chironomidae) oraz komarnice (Tipulidae), które są ważnym źródłem pokarmu dla innych wodnych organizmów, a zarazem owadami uciążliwymi na niektórych terenach [27]. Przykładowo, zastosowanie dawki *Bti* w wysokości 17 µg/ml u wodzieni *Chironomus kiiensis*, *C. yoshimatsui* i gatunków z rodzaju *Paratanytarsus* skutkowało ich wysoką (70–100%) i szybką śmiertelnością w przeciągu 48 godzin [28]. W badaniach Yiallourous i wsp. [29] wartość LC₅₀ po 24 godzinach, wynosiła 0,77 mg/l dla *C. thummi thummi* i 1,17 mg/l dla *P. psilopterus*, co stanowiło wartość od 40–60-krotnie wyższą niż wartość LC₅₀ dla larw komara egipskiego, *Aedes aegypti*. Analiza zmian w strukturze komórek kolumnowych tkanki nabłonkowej jelita wodzieni, obserwowanych za pomocą mikroskopu elektronowego, potwierdziła podobne zmiany histopatologiczne jak te występujące u larw komarów. Chociaż niektóre gatunki wodzieni są wrażliwe na *Bti*, to jednak wysokość dawki śmiertelnej, skutecznej w zwalczaniu, może być nawet dziesięciokrotnie wyższa w stosunku do analogicznej, optymalnej dla komarów w tych samych warunkach [30].

Brak z kolei negatywnego, z punktu widzenia bioróżnorodności, wpływu na faunę wodzieni lub ich niewielką wrażliwość na *Bti* potwierdzono trakcie biotestów terenowych i rutynowych akcji zwalczania komarów z wykorzystaniem mikrobiologicznych insektycydów m.in. w Niemczech [10,11,31]. Podobny brak wpływu na wodne stadia owadów, ustalono w badaniach terenowych realizowanych za pomocą różnych metod aplikacji w innych europejskich krajach, takich jak Litwa i Serbia [32,33]. Według Bernotiene i wsp. [34] satysfakcjonujące efekty aplikacji płynnego preparatu na bazie *Bti* (VectoBac 12AS) względem larw meszek w jednym miejscu rzeki Niemen (Litwa) wywoływał ich śmiertelność już po 3 dniach na odcinku oddalonym o 150 km wzdłuż nurtu rzeki. Statystycznie istotne różnice w liczebności larw z rodziny Chironomidae zaobserwowano jedynie na odcinku oddalonym o 6 km od miejsca aplikacji po siedmiu dniach, podczas gdy na dystansie 14 km od miejsca aplikacji nie zaobserwowano żadnych zmian w liczebności larw

tej rodziny owadów należących podobnie jak meszki i komary do podrzędu Nematocera. Bezpieczeństwo komercyjnie dostępnego preparatu na bazie *Bti* (Teknar HP-D), w dawkach dawki 1; 1,5 i 2 l/ha, udokumentowano *in vitro* względem drobnych ryb karpiowatych *Gambusia affinis* oraz chrząszczy wodnych *Dytiscus marginalia*, także drapieżnych dla larw komarów [35].

We własnych badaniach efektywności trzech różnych dawek zróżnicowanych form preparatów na bazie *Bti* i *Bs* (VectoBac WDG, VectoBac 12 AS i VectoLex WDG) względem larw synantropijnych komarów kłujących, *Culex pipiens pipiens* rozwijających się w obrębie rowów ściekowych na terenie pól irygowanych ściekami we Wrocławiu, nie wykazano negatywnego oddziaływania na inne współwystępujące z larwami komarów bezkręgowce z rodzajów *Eristalomyia*, *Stratiomys* i *Tabanus* [36]. Również Merrit i wsp. [37] nie wykryli negatywnego wpływu *Bti* na inne bezkręgowce, przy okazji zwalczania meszek w jeziorze Michigan, w szczególności względem unoszących się w wodzie bezkręgowców; zmiany ich liczebności w bentosie; śmiertelności wśród różnych dryfujących i nie dryfujących owadów oraz wpływu na wzrost lub śmiertelność wśród larw jętek z rodzaju *Stenonema* sp. (Ephemeroptera). W innych badaniach, przeprowadzonych w obrębie mokradeł na Florydzie wykazano jedynie zmniejszenie liczebności populacji pływaka żółto-brzeżka (*Notonecta indica*), spośród 39 gatunków niebędących obiektem zwalczania zebranych przed zastosowaniem preparatu *Bti* do zwalczania larw komarów *Aedes taeniorhynchus* [38]. Przypuszcza się jednak, że niniejszy spadek liczebności populacji mógł być również powodowany także innymi czynnikami, np. brakiem pożywienia.

Powszechne przekonanie o braku wrażliwości motyli (Lepidoptera) na biocydy zostało częściowo zmienione po tym jak Ignoffo i wsp. [39] wykazali pewną efektywność preparatów *Bti* względem larw szkodników takich jak błyszczka ni (*Trichoplusia ni*), słonecznica amerykańska (*Heliothis zea*) i sówka tytoniu (*H. virescens*). Śmiertelność gąsienic była na poziomie porównywalnym do efektów ówczesnie, komercyjnie dostępnych produktów *B. th. thuringiensis* i *B. th. galleriae*; natomiast w porównaniu do aktualnie dostępnych specyficznych preparatów *Bt. kurstaki*, aktywność była od 1/3 do 1/10 niższa. Wartość LC_{50} dla produktów na bazie *Bti* testowanych względem *T. ni*, *H. zea* i *H. virescens*

wynosiła odpowiednio 109,6; 19,3 i 27,6 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy odpowiednie wartości uzyskane dla produktów na bazie *Bt. kurstaki* wynosiły odpowiednio 15,9; 2,0 i 7,8 $\mu\text{g/ml}$. Negatywny *in vitro* wpływ *Bti* na wzrost populacji wolno żyjących nicieni *Turbatrix aceti* oraz osłabienie ich osłonek jajowych wykazali Wharton i Bone [40] oraz Meadows i wsp. [41], a badania Krieg'a i wsp. [42] z kolei – obojętne działanie *Bti* dla pszczoł.

Ryby i płazy

Nie odnotowano jak dotychczas wyraźnego negatywnego wpływu *Bti* na ryby, zarówno po aplikacji biocydu, a nawet w trakcie bezpośredniej ekspozycji bakteryjnych spor i kryształów. Potwierdzają to Lee i Scott [43], którzy badali *in vitro* ostrą toksyczność *Bti* względem przydenki żebrowatej, *Fundulus heteroclitus*. Okazało się, że preparat VectoBac (*Bti*) był najmniej toksycznym spośród testowanych insektycydów, wykazując wartość LC_{50} równą 980 mg/l po 96 godzinach. Dla porównania LC_{50} dla chemicznego Temephosu, najbardziej toksycznego wynosiła 0,04 mg/l, a niebezpieczną okazała się być mieszanina fenoxycarbu i VectoBac (*Bti*). Bezpieczne natomiast były ryby w jeziorze Michigan, gdyż biopreparaty *Bti*, testowane do zwalczania meszek nie wykazały negatywnego wpływu na bassę czerwonoookiego (*Ambloplites rupestris*), który badano ze szczególnym uwzględnieniem liczby i wagi osobników [37]. Podobnie Christensen [44–46] wykazali *in vitro* brak wpływu preparatów na bazie *Bti* (w dawce $1,3\text{--}1,7 \times 10^{10}$ cfu/g) względem okonia błękitnoskrzelego (*Lepomis macrochirus*), strzebli pstrej (*Cyprinodon variegatus*) i pstrąga potokowego (*Oncorhynchus mykiss*).

Przegląd badań laboratoryjnych i terenowych, zrealizowanych pod auspicjami WHO wykazał także brak negatywnego wpływu preparatów *Bti* względem żab, salamander, ropuch i traszek [47].

Ptaki

Wieloletnie badania przeprowadzone w stanie Minnesota (USA) na okoliczność zwalczania larw komarów za pomocą preparatów *Bti* wykazały brak negatywnego wpływu względem populacji epoletnika krasnoskrzydłego – *Agelaius phoeniceus* [48,49]. Także szczegółowe badania Hanowskiego i wsp. [50] wykazały, że aplikacja granulatu *Bti* (VectoBac G) nie miała negatywnego efektu na populację aż 19 gatunków ptaków.

Nieznaczone obniżenie liczebności i tylko wśród mniej niż 10% gatunków stwierdzono w populacjach ptaków występujących na ok. 2400 ha tere-

nów chronionych wzdłuż Renu (okolice Hessen) i objętych programem biologicznego zwalczania komarów za pomocą preparatów *Bti* [51]. U większości gatunków zaobserwowano jednak zmiany w rozmieszczeniu, a także zmniejszenie liczby tych gatunków ptaków, których miejsca rozwojowe związane były z trzcinowiskami i innymi miejscami zlokalizowanymi wzdłuż brzegów Renu. W innych badaniach z tego samego regionu, przeprowadzonych przez Timmerman i Beckera [52], podjęto próby określenia w jakim stopniu ograniczenie liczebności komarów, za pomocą preparatów na bazie *Bti*, może wpływać na skład diety takich gatunków jak: jaskółka oknówka (*Delichon urbica*), trzcinniczek zwyczajny (*Acrocephalus scirpaceus*), muchołówka żałobna (*Ficedula hypoleuca*), sikora bogatka (*Parus major*), modraszka (*Parus caeruleus*), poszukujących pożywienia na otwartej przestrzeni oraz w okolicach swoich gniazd porośniętych gęstą roślinnością. W pierwszej kolejności wykazano rozbieżność w dobowej aktywności komarów, głównie *Aedes vexans* i jaskółek oknówek, poszukujących pożywienia na otwartej przestrzeni. Zwiększenie aktywności dobowej komarów, które w ciągu dnia szukają schronienia w gęstej roślinności, nastąpiło po zmierzchu, podczas gdy jaskółki kończyły polowanie i karmienie swojego potomstwa na około 60 min. przed zachodem słońca. Efektem tego był wykazany, niewielki udział komarów (0,09%) w składzie diety tego gatunku, natomiast dominujący mszyc (Aphidina) i Staphylinidae. W próbach pożywienia, zebranych wśród gatunków ptaków poszukujących pożywienia w okolicach swoich gniazd porośniętych gęstą roślinnością, komary stanowiły również niewielki (5,3%) udział w diecie. Wróble takie jak *Parus major* i *P. caeruleus* preferowały bardziej gąsienice, podczas gdy trzcinniczek zwyczajny i muchołówka żałobna chętniej polowały na pająki, gąsienice, mszyce, jak i również na komarnice i bzygowate, Syrphidae. W podsumowaniu powyższych badań autorzy podsumowują, że komary stanowią niewielki udział w diecie ptaków zamieszkujących środowiska zagrożone występowaniem zjawisk powodziowych, niezależnie od ich zagęszczenia w danym siedlisku. Mikrobiologiczne zwalczanie komarów nie ma zatem negatywnego wpływu na dietę ptaków współwystępujących z komarami. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że wykształcenie specyficznych preferencji pokarmowych ptaków może być związane z ich uniezależnieniem się od nieregularnie występujących zja-

wisk powodziowych skutkujących masowymi pojawami komarów na terenach nadrzecznych.

Jedynie utratę masy ciała ptaków wykazali Latini i wsp. [53,54] *in vitro* w trakcie bezpośredniej 5-dniowej intoksykacji *per os* wysoką dawką *Bti* ($3,4-6,2 \times 10^{11}$ /kg masy ciała) młodych osobników przepióra wirginijskiego (*Colinus virginianus*) i kaczki krzyżówki (*Anas platyrhynchos*).

Nietoperze

Nietoperze nie są narażone na bezpośrednie działanie mikrobiologicznych larwicydów *Bti*, ponieważ odżywiają się dorosłymi komarami [5]. Uważa się jednak, że zwalczanie stadiów larwalnych wpływa ograniczająco na wylęg form dorosłych. Większość europejskich gatunków nietoperzy jest wyłącznie owadożerna. Zmierzchowa i nocna aktywność nietoperzy, pokrywa się z aktywnością komarów. Przypadki jednak bezpośredniego polowania nietoperzy na roje komarów obserwowane były sporadycznie. Badania Arnolda i wsp. [55] nad preferencjami pokarmowymi *Myotis daubentonii* i *Pipisterellus nathusi*, przeprowadzone w południowo-zachodnich Niemczech wykazały, że komary nie są istotnym elementem diety tych gatunków i stanowią 3,61% w porównaniu z przedstawicielami chrząszczy Coleoptera (9,09%) czy wodzieni Chironomidae (43,67%). Większość europejskich badań dotyczących ustalenia składu diety nietoperzy (na podstawie analizy koproskopowej) wskazuje na to, że główną bazę pokarmową nietoperzy stanowią nocne owady takie jak ćmy (Lepidoptera), chrząszcze (Coleoptera), wodzienie (Chironomidae), jętki (Ephemeroptera), chruściki (Trichoptera). Istotne znaczenie mają też zróżnicowane strategie łowcze nietoperzy. Na przykład większe gatunki takie jak *Nyctalus noctula* i *N. leisleri* polują na otwartej przestrzeni i wysoko względem powierzchni gruntu. Mniejsze i wolniejsze gatunki jak *Myotis bechsteinii*, *M. nattereri* chwytają swoje ofiary z liści drzew i krzewów. Tylko *M. daubentonii* poluje latając blisko nad powierzchnią zbiorników wodnych [56].

Inne ssaki

Ze względu na bliskie genetyczne podobieństwo gatunkowe *Bt* do patogennych, ale niekryształotwórczych laseczek *B. cereus*, wzrosła obawa, że entomopatogenne szczepy mogą wywoływać także u ludzi choroby żołądkowo-jelitowe i inne problemy zdrowotne. Zarówno z powszechnych obserwacji nad stosowaniem biocydów *Bt* w rolnictwie i leśnictwie jak i z innych szczegółowych badań wyni-

ka brak danych świadczących o ich negatywnym wpływie na zdrowie ludzi [10,57]. Nie zaobserwowano chorobowych zmian u testowanych szczurów oraz ludzi-ochotników poddanych działaniu zawiesiny spor w zróżnicowanych dawkach, tj. odpowiednio 2×10^{12} spor/kg i 3×10^9 spor/dobę przez 5 dni [58]. Zdaniem autora ryzyko dla zdrowia publicznego z powodu *Bti* szacuje się jako bardzo niskie. Wyniki monitoringu w Nowej Zelandii w trakcie wieloletniej aplikacji metodą agrolotniczą mikrobiologicznych insektycydów do zwalczania szkodników znamionówki (Lymantriidae) nie wykazały zwiększania się problemów zdrowotnych u ludzi (w tym np. poronień, przedwczesnych porodów, alergii, choroby meningokokowej).

Laseczki *Bt* były natomiast izolowane ze sztuk bydła, padłych z powodu zapalenia gruczołu mlekowego [57]. Ci sami autorzy stwierdzili, że wewnątrztrzewnowa aplikacja była jedynym sposobem wywołującym śmiertelność u szczurów, ale jedynie przy wysokich dawkach (10^7 cfu/osobnika), a spożycie ponad 10^{12} bakterii/zwierzę nie miało żadnego wpływu na szczury i myszy. Nie stwierdzano także zjawiska szoku anafilaktycznego u świnek morskich [57] oraz innych stałocieplnych kręgowców [59,60]. Jedyny fakt toksycznego działania *in vitro Bti* na myszy laboratoryjne dotyczył bezpośredniego wstrzyknięcia białkowych delta-endotoksyn, które wcześniej zostały w warunkach laboratoryjnych celowo rozpuszczone i aktywowane [61]. Z kolei aplikacja delta-endotoksyn na drodze *per os* nie wywoływała toksycznego efektu, ponieważ w jelicie ssaków nie występuje alkaliczny odczyn, umożliwiający aktywację protoksyny *Bti*, tak jak ma to miejsce w jelitach owadów [57].

Udokumentowane niekorzystne skutki kliniczne dotyczą przypadku, gdy doszło do przekłucia skóry ręki igłą skażoną zawiesiną spor i krystalicznych białek delta-endotoksyny *Bti* oraz wegetatywnych komórek *Acinetobacter calcoaceticus anitratus*. Te ostatnie są sporadycznie odpowiedzialne za infekcje tkanek miękkich. Leczenie pacjenta i powrót do zdrowia zajęło pięć dni [62]. Z kolei Samples i Buettner [63] donosili o owrzodzeniach rogówki powiązanych z przypadkowym dostaniem się do oka w trakcie oprysku, komercyjnego preparatu *B. th. kurstaki* (Dipel). Leczenie gentamycyną usunęło owrzodzenie.

Jak wynika z badań Damgaard [64] wszystkie szczepy, w tym także *Bti* zawarte w komarobójczych produktach takich jak Bactimos, VectoBac,

są zdolne do wytwarzania enterotoksyn wywołujących biegunki. W praktyce jednak, stosowanie biobójczych szczepów *Bt* w warunkach terenowych nie spowodowało żadnego zagrożenia zdrowia. W celu zwiększenia bezpieczeństwa stosowania mikrobiologicznych larwicydów zaleca się jednak, aby wraz z organizacją rutynowych działań kontrolnych realizować specyficzny system identyfikacji [64] lub dokonywać radiacji komercyjnych preparatów za pomocą promieni gamma, które eliminują bakteryjne spory *Bt* bez naruszania białkowych struktur delta-endotoksyn decydujących o aktywności preparatów [65].

Oporność owadów na *Bti*

Bardzo ważną zaletą stosowania mikrobiologicznych insektycydów *B. thuringiensis israelensis* (m.in. Culinex, VectoBac) jest brak zjawiska oporności wśród populacji występujących w środowisku naturalnym. Przyczyną może być wspomniana różnorodność białkowych toksyn *Bti* i ich synergistyczne działanie, a także szybka biodegradacja toksyn na skutek działania czynników środowiskowych [5]. Stanowi to niewątpliwą zaletę, zwłaszcza w sytuacjach, w których chemiczne insektycydy okazują się nieefektywne [15].

Badania laboratoryjne prowadzone przez Goldman i wsp. [66] wykazały jednakże dwukrotny wzrost oporności na białka *Bti* wśród larw tylko jednej z dwóch dziko żyjących populacji *Aedes aegypti* wykorzystanych do celów badawczych. Według autorów proces nabywania oporności przez owady na bioinsektycydy jest powodowany zmianami genetycznymi minimum dwóch loci chromosomu. Powstawanie oporności *in vitro* może być powodowane większymi dawkami, dużą częstotliwością podawania toksyn, a także obniżoną rozpuszczalnością kryształów, brakiem aktywacji lub zwiększoną proteolizą protoksyn, zwiększonym transportem jonów, oraz utratą miejsc wiązania dla delta-endotoksyn [67]. Zdarza się, że zakłócenie prawidłowego funkcjonowania receptorów jednego rodzaju może być zrekompensowane zwiększeniem receptorów dla innych toksyn. Możliwe jest również, że rozwój oporności na jedną toksynę powoduje pojawienie się oporności na inne toksyny należące do innych podklas. Badania genetyczne wykazały, że oporność w obrębie populacji, żyjącej w środowisku naturalnym, jest dziedziczona jako cecha autosomalna, recesywna i jest powodowana mutacją jednego genu. W przypadku populacji laboratoryjnych mamy

do czynienia ze zmianami wielu genów, w związku z czym oporność dziedziczona jest jako cecha częściowo dominująca lub częściowo recesywna lub addytywna.

Badania laboratoryjne wykazały, że zastosowanie tylko jednego białka *Bti* do zwalczania komarów prowadzi do wytworzenia oporności po kilku pokoleniach komarów [10,68]. Jednakże zastosowanie kombinacji dwóch lub trzech toksyn *Bti* utrudnia powstawanie oporności. Z kolei wykorzystanie czterech toksyn *Bti* spowodowało, że wywołanie zjawiska oporności wśród komarów było niezwykle trudne. Także w badaniach *in vitro* poprzez ciągłą ekspozycję na *Bti* nie wywołano oporności wśród wrażliwych gatunków muchówek [69,70], albo notowano jej powstanie na bardzo niskim poziomie [68]. Stała ekspozycja komarów *Ae. vexans* na delta-endotoksyny *Bti* w warunkach terenowych podczas 10. letnich, rutynowych aplikacji w Niemczech nie wykazała różnic w poziomie oporności zarówno wśród testowanej populacji jak i populacjach kontrolnych [10]. Podobne wyniki uzyskano u meszek [71].

Podsumowanie

Genetyczne podobieństwo kryształotwórczych owadobójczych lasetek *B. thuringiensis*, wykorzystywanych w produkcji także komarobójczych larwicydów (*B. th. israelensis*) do niekryształotwórczych wprawdzie, ale ludzkich patogenów *B. cereus*, było powodem szeregu testów. Wieloletnie i wielokierunkowe badania zarówno laboratoryjne jak i terenowe dotyczyły w pierwszej kolejności wpływu bakteryjnych spor i delta-endotoksyn, występujących w preparatach *Bti*, na współżyjące z larwami komarów wodne bezkręgowce, tj. skorupiaki i owady (w tym błonkówki, widelnice, chruszciki, pluskwiaki, jętki, ważki oraz wrotki), parzydełkowce, mięczaki, obleńce, pierścienice, płazińce oraz kręgowce (ryby, płazy, niektóre ptaki). Wykazały one jedynie niewielką patogenność biocydów względem organizmów niedocelowych. Testy bezpieczeństwa u ssaków potwierdziły również bardzo niskie ryzyko toksyczności nawet w bezpośredniej ekspozycji na delta-endotoksyny *Bti*.

Udokumentowany, stosunkowo wysoki stopień ekologicznego bezpieczeństwa biopreparatów, określa ich przydatność w akcjach zwalczania szkodliwych owadów, które może być przyjazne środowisku, bo nie wpływa ujemnie na różnorodność biologiczną. Ma to szczególne znaczenie na obszarach

cennych przyrodniczo i prawnie chronionych (parki narodowe, krajobrazowe, rezerваты, obszary chronionego krajobrazu, stanowiska dokumentacyjne, użytki ekologiczne, zespoły przyrodniczo-krajobrazowe, obszary Natura 2000). Zaleta selektywnej specyficzności mikrobiologicznych preparatów, krótkiej persystencji delta-endotoksyn w środowisku oraz brak zjawiska oporności znajduje potwierdzenie w wielu międzynarodowych programach kontroli szkodników i biologicznych przenosicieli patogenów, w tym pasożytów. Integrowane akcje zwalczania dotyczą zarówno tych „tylko uciążliwych komarów”, zwykle w strefie umiarkowanej oraz wektorowych gatunków na terenach endemicznych tak groźnych chorób transmisyjnych jak malaria, czy onchocerkozą, przenoszonych przez wiele gatunków komarów i meszek. Znaczna część jest już uodpornionych na powszechnie stosowane nie-selektywne chemiczne insektycydy, które działając kontaktowo (pozajelitowo) są bójcze także dla pożytecznych organizmów, nie będących przedmiotem zwalczania.

Literatura

- [1] Lonc E., Rydzanicz K., Jawień P. 2010. Ekologiczne aspekty biokontroli komarów z wykorzystaniem techniki GPS/GIS. *Wiadomości Parazytologiczne* 56: 297-303
- [2] Graczyk T.K., Tamang L., Doocy S. C. 2005. Parasitic zoonoses; public health and veterinary perspectives. *Wiadomości Parazytologiczne* 51: 3-8.
- [3] Rydzanicz K., Kiewra D., Lonc E. 2006. Zmiany zasięgu chorób transmitowanych przez komary pod wpływem globalnego ocieplenia klimatu. *Wiadomości Parazytologiczne* 52: 73-83.
- [4] Litvinovitch J., Ingendahl B., Klasen J., Becker N., Timmerman U. 2009. Abstracts of the International Symposium on The Asian Tiger mosquito „*Stegomyia albopicta* – monitoring and modeling of its distribution area in relation to its bionomy and climatic factors”. 13.11.2008, Speyer, Germany.
- [5] Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J., Kaiser A. 2003. Mosquitoes and their control. Kluwer Academic Publishers, New York, London.
- [6] Rydzanicz K., Lonc E., Becker N. 2009. Current procedures of integrated urban vector-mosquito control as an example in Cotonou (Benin, West Africa) and Wrocław area (Poland). *Wiadomości Parazytologiczne* 55: 335-340.
- [7] Mohsen Z.H., Ibrahim M.A.K., Al. Jadooa N.S. 1986. Isolation of spore forming *Bacilli* from mosquitoes in natural breeding habitats in Iraq. *Entomophaga* 31: 191-196.
- [8] Becker N., Xu B.Z. 1989. Microbial control of mo-

- squitoes in West Germany and the Hubei Province of the People's Republic of China. *Israel Journal of Entomology* 23: 39-44.
- [9] Mulla S. 1991. Biological control of mosquitoes with entomopathogenic bacteria. *Chinese Journal of Entomology* 6: 93-104.
- [10] Becker N., Margalit J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and black flies. In *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and practice*. (Eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, S. Higgs). John Wiley & Sons, New York: 147-170.
- [11] Chilcott C.N., Wigley P.J. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 244-247.
- [12] Świącicka J., Hauschild T. 1996. Rodzaj *Bacillus* – występowanie i znaczenie w środowiskach naturalnych. *Postępy Mikrobiologii* 1: 27-43.
- [13] Lonc E., Andrzejczak S. 2005. Bioróżnorodność toksyn *Bacillus thuringiensis* i ich zastosowanie. *Postępy Mikrobiologii* 44: 253-263.
- [14] Kucińska J., Lonc E., Rydzanicz K. 2003. Nieprzyjazne pasożytom a przyjazne środowisku transgeniczne bioinsektycydy. *Wiadomości Parazytologiczne* 49: 11-20.
- [15] Yousten A.A., Federici B.A., Roberts D.W. 1992. Encyclopedia of microbiology. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- [16] Illing N., Errington J. 1991. Genetic regulation of morphogenesis in *Bacillus subtilis*: roles of σE σF in prespore engulfment. *Journal of Bacteriology* 173: 3159-3169.
- [17] Knowles B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal deltaendotoxins. *Advances in Insect Physiology* 24: 275-308.
- [18] Chilcott C.N., Knowles B.H., Ellar D.J., Drobniewski F.A. 1990. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. In: *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*. (Eds. H. de Barjac, D.J. Sutherland). Unwin Hyman Ltd, London: 45-65.
- [19] Misztal L.H., Musiał W.G., Augustyniak J. 1996. Owadobójcze toksyny *Bacillus thuringiensis* w ochronie roślin. *Postępy Mikrobiologii* 3: 275-293.
- [20] Su T., Mulla M.S. 1999. Microbial agents *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* suppress eutrophication, enhance water quality, and control mosquitoes in microcosms. *Environmental Entomology* 28: 761-767.
- [21] Glare T.R., O'Callaghan M. 1998. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Report for the New Zealand Ministry of Health, Wellington.
- [22] Chui V.W.D., Koo C.W., Lo W.M., Qiu X., Qiu X. J. 1993. Laboratory evaluation of Vectobac-12AS and teflubenzuron against *Culex* and *Aedes* mosquito larvae under different physical conditions. *Environment International* 19: 193-202.
- [23] Fillinger U., Knols B.G.J., Becker N. 2003. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against afrotropical Anophelines in Western Kenya. *Tropical Medicine and International Health* 8: 37-47.
- [24] Balaraman K., Balasubramanian M., Manonmani L. M. 1983. *Bacillus thuringiensis* H-14 (VCRC B-17) formulation as mosquito larvicide. *Indian Journal of Medical Research* 77: 33-37.
- [25] Colwell A.E. 1982. Biting midges (*Culicoides occidentalis*) at Borax Lake, California. Proceedings and papers of the 49. Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association, Inc., Redding, California: 53-55.
- [26] Walker E.D., McDonald E.M., Kobayashi J.F. 1985. Small-scale field evaluations of Teknar, Abate and Dursban as *Coquillettidia perturbans* larvicides. Proceedings New Jersey Mosquito Control Association, Inc., Atlantic City, New Jersey, 17-21 March 1985: 169-172.
- [27] Clarke G.R. 1994. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in mosquito control. Proceedings of the 1st Brisbane Symposium Biopesticides: opportunities for Australian Industry: 87-90.
- [28] Kondo S., Ohba M., Ishii T. 1995. Comparative susceptibility of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* with special reference to altered susceptibility due to food difference. *Journal of Applied Entomology* 119: 123-125.
- [29] Yiallourous M., Storch V., Becker N. 1999. Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 39-47.
- [30] Mulla M.S., Chaney J.D., Rodcharoen J. 1990. Control of nuisance aquatic midges (Diptera: Chironomidae) with the microbial larvicide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in a man-made lake in southern California. *Bulletin of the Society for Vector Ecology* 15: 176-184.
- [31] Miura T., Takahashi R.M., Mulligan F.S. 1980. Effects of the bacterial mosquito larvicide, *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on selected aquatic organisms. *Mosquito News* 40: 619-622.
- [32] Bernotiene R. 2001. The effect of application by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H 14) on blood-sucking black flies (Diptera, Simuliidae) in Lithuania. *Norwegian Journal of Entomology* 48: 155-120.
- [33] Ignjatovic-Cupina A., Petric D., Zgomba M., Marinovic D., Konjevic A., Fusco R., Kotter H. 2008. Aerial treatment of the Danube simuliid breeding sites in the region of Novi Sad (Vojvodina, Serbia). Abstracts of the 3rd International Simuliidae Symposium. Vilnius, Lithuania: 9.

- [34] Bernotiene R., Bartninkaite I., Višinskiene G. 2008. Diffusion of *Bacillus thuringiensis* bacteria and their effect on aquatic invertebrates in the Nemunas River after using VectoBac 12AS preparation. *Ekologija* 54: 93-97.
- [35] Gunasekaran K., Doss P.S.B., Vaidyanathan K. 2004. Laboratory and field evaluation of Teknar HP-D, a biolarvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*, against mosquito vectors. *Acta Tropica* 92: 109-118.
- [36] Rydzanicz K., Lonc E., Kiewra D., DeChant P., Krause S., Becker N. 2009. Evaluation of three microbial formulations against *Culex pipiens pipiens* larvae in irrigation fields in Wrocław, Poland. *Journal of the American Mosquito Control Association* 25: 140-148.
- [37] Merritt R.W., Walker E.D., Wilzbach M.A., Cummins K.W., Morgan W.T. 1989. A broad evaluation of *B. t. i.* for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and non-target effects on invertebrates and fish. *Journal of the American Mosquito Control Association* 5: 397-415.
- [38] Purcell B.H. 1981. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Aedes taeniorhynchus* and some non-target organisms in the salt marsh. *Mosquito News* 41: 476-484.
- [39] Ignoffo C.M., Couch T.L., Garcia C., Kroha M.J. 1981. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Heliothis virescens*. *Journal of Economic Entomology* 74: 218-222.
- [40] Wharton D.A., Bone L.W. 1989. *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin affects egg-shell ultrastructure of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 15: 155-158.
- [41] Meadows J., Gill S.S., Bone L.W. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. *Invertebrate Reproduction and Development* 17: 73-76.
- [42] Krieg A., Hassan S., Pinsdorf W. 1980. Comparison of the effect of the variety *israelensis* with other varieties of *Bacillus thuringiensis* on nontarget organisms of the order Hymenoptera: *Trichogramma cacaeciae* and *Apis mellifera*. *Anzeiger für Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 53: 81-83.
- [43] Lee B.M., Scott G.I. 1989. Acute toxicity of temephos, fenoxycarb, diflubenzuron, and methoprene and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43: 827-832.
- [44] Christensen K.P. 1990. VectoBac technical material (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*): Infectivity and pathogenicity to bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) during a 32-day static renewal test. Springborn Laboratories Inc. Wareham, Massachusetts. Report No. 90-2-3228 (unpublished).
- [45] Christensen K.P. 1990. VectoBac technical material (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*): Infectivity and pathogenicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a 32-day static renewal test. Springborn Laboratories Inc. Wareham, Report No. 90-2-3242 (unpublished).
- [46] Christensen K.P. 1990. VectoBac technical material (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*): Infectivity and pathogenicity to sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*) during a 30-day static renewal test. Springborn Laboratories Inc. Wareham, Massachusetts. Report No. 90-2-3288.
- [47] World Health Organisation (1992). Fourteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control, Safe Use of Pesticides, Technical Report Series No. 813, WHO, Geneva.
- [48] Hershey A.E., Lima A.R., Niemi G.J., Regal, R.R. 1998. Effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) and methoprene on nontarget macroinvertebrates in Minnesota wetlands. *Ecological Applications* 8: 41-60.
- [49] Niemi G.J., Hershey A.E., Shannon L., Hanowski J. M., Lima A., Axler R.P., Regal R.R. 1999. Ecological effects of mosquito control on zooplankton, insects and birds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 549-559.
- [50] Hanowski J.M., Niemi G.J., Lima A.R., Regal R.R. 1997. Response of breeding birds to mosquito control treatments of wetlands. *Wetlands* 17: 485-492.
- [51] Kreuziger J. 1998. Effects of large-scale restoration processes on the bird community of a river floodplain. *Vogelwelt* 119: 65-90.
- [52] Timmermann U., Becker N. 2003. Die Auswirkung der Stechmückenbekämpfung auf die Ernährung auenbewohnender Vogelarten. *Carolinea* 61: 145-165.
- [53] Lattin A., Grimes J., Hoxter K.A., Smith G.J. 1990. VectoBac technical material (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*): an avian oral toxicity and pathogenicity study in the mallard. Wildlife International Ltd. Easton, Maryland. Project No. 161-115 (unpublished Abbot document, available from: WHO, 1999, EMC 217).
- [54] Lattin A., Hoxter K.A., Smith G.J. 1990. VectoBac technical material (*Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*): an avian oral toxicity and pathogenicity study in the bobwhite. Wildlife International Ltd. Easton, Maryland. Project No. 161-114. (unpublished Abbot document, available from: WHO, 1999, EMC 217).
- [55] Arnold A., Braun M., Becker N., Storch V. 2000. Zur Nahrungsoekologie von Wasseund Rauhhaufledermaus in den norbadischen Rheinauen. *Carolinea* 58: 257-263.
- [56] Arnold A., Braun M., Becker N., Storch V. 1998. Betreig zur Ökologie der Wasserfledermaus (*Myotis daubentonii*) in Nordbaden. *Carolinea* 56: 103-110.

- [57] Siegel J.P., Shaddock J.A. 1990. Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*. (Eds. H. de Barjac., D.J. Sutherland) Unwin Hyman Ltd, London: 202-220.
- [58] Drobniowski F.A. 1994. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *Journal of Applied Bacteriology* 7: 101-109.
- [59] Halkova Z., Zaykov C., Antov G., Mihaylova A., Mircheva V., Dinoeva S., Chipilska L. 1993. Experimental study of subacute oral, dermal and inhalation toxicity of Bulmoscide preparation. *Polish Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 6: 19-25.
- [60] Tsai S., Liao J., Wang S., Tsai S.F., Liao J.W., Wang S.C. 1996. Safety evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Japanese quail by oral administration. *Journal of the Chinese Society of Veterinary Science* 22: 340-347.
- [61] Rani S.S., Balaraman K., Rani S.S. 1996. Effect of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* on human erythrocytes in vitro. *Indian Journal of Experimental Biology* 34: 1241-1244.
- [62] Warren R.E., Rubenstein D., Ellar D.J., Kramer J.M., Gilbert R.J. 1984. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* protoxin activation and safety. *Lancet* 8378: 678-679.
- [63] Samples J.R., Buettner H. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *American Journal of Ophthalmology* 95: 258-260.
- [64] Damgaard P.H. 1996. Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 12: 245-250.
- [65] Becker N. 2002. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *Journal of the American Mosquito Control Association* 18: 57-62.
- [66] Goldman I.F., Arnold J., Carlton B.C. 1986. Selection of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the laboratory and field populations of *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 317-324.
- [67] Bravo A., Jansens S., Peferoen M. 1992. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 237-246.
- [68] Georghiou G.P., Wirth M.C. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1095-1101.
- [69] Lee H.L., Cheong W.H. 1985. Laboratory evaluation of the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* for the control of mosquitoes in Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2: 133-137.
- [70] Gharib A.H., Szalay-Marzso L. 1986. Selection of resistance to *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 in a laboratory strain of *Aedes aegypti* L. In: *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. (Eds. R.A. Samson, J.M. Vlak, D. Peters). Wageningen, Netherlands: 37.
- [71] Kurtak D., Back C., Chalifour A., Doannio J., Dossou Yovo J., Duval J., Guillet P., Meyer R., Ocran M., Wahle B., Yovo J.D. 1989. Impact of *B. t. i.* on black fly control in the *Onchocerciasis* Control Programme in West Africa. *Israel Journal of Entomology* 23: 21-38.

Wpłynęło 21 lipca 2010

Zaakceptowano 10 listopada 2010