



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos programos II kurso studentė

DOVILĖ LEONAVIČIŪTĖ

Magistro baigiamasis darbas

***Bacillus thuringiensis* porūšio *israelensis* bakterijų išlikimas po
biologinio preparato VectoBac 12AS panaudojimo**

Darbo vadovė: dr. Rasa Bernotienė

Vilnius
2020

***Bacillus thuringiensis* porūšio *israelensis* bakterijų išlikimas po
biologinio preparato VectoBac 12AS panaudojimo**

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biomokslų institute
ir Gamtos tyrimų centre

Darbą atliko: Dovilė Leonavičiūtė _____

Darbo vadovė: dr. Rasa Bernotienė _____

TURINYS

DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS	5
IVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> porūšiai	9
1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> toksinų klasifikacija.....	10
1.4. Trijų domenų Cry baltymai	11
1.5. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> porūšio bendroji charakteristika	14
1.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> naudojimas vabzdžių kontrolės programose	14
1.7. <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> preparato tiksliniai vabzdžiai	18
1.8. Vabzdžių kontrolės <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> bakterijomis poveikis aplinkai	19
1.9. <i>B. thuringiensis israelensis</i> išlikimas gamtoje.....	20
1.10. <i>Bt</i> porūšio <i>israelensis</i> toksinų veikimo principas ir vabzdžių atsparumas	22
1.10.1. <i>B. thuringiensis israelensis</i> veikimo principas.....	22
1.10.2. Vabzdžių atsparumas <i>B. thuringiensis israelensis</i>	23
1.11. <i>Bacillus thuringiensis</i> cry genų ekspresijos reguliacija	24
1.11.1. Transkripcijos reguliacija	25
1.11.2. Nuo sporuliacijos priklausomi cry genai	25
1.11.3. Nuo sporuliacijos nepriklausomi cry genai	26
1.12. Cry genų ekspresiją reguliuojantys kiti faktoriai	27
1.13. mRNR stabilumas.....	27
1.14. Cry baltymų produkcijos metabolinė reguliacija	28
1.15. Cry baltymų kristalizacija	30
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	32
2.1. Tiriamosios medžiagos rinkimas.....	32
2.2. Biologinio preparato efektyvumo ir <i>Bti</i> gyvybingumo jame tikrinimas po šaldymo.....	34

2.3. DNR išskyrimas	34
2.4. Polimerazės grandininė reakcija.....	36
2.5. Elektroforezė	36
2.6. <i>Bti</i> išlikimo uodų lervose laboratorinėmis sąlygomis tyrimas	36
2.7. <i>Bti</i> gyvybingumo lervose tikrinimas	37
3. REZULTATAI	39
3.1. PGR optimizavimas <i>Bti</i> aptikimui.....	39
3.2. VectoBac 12AS efektyvumo ir <i>Bti</i> gyvybingumo jame tikrinimas po šaldymo 40	
3.3. <i>Bti</i> aptikimas po biologinio preparato panaudojimo Nemune.....	40
3.4. <i>Bti</i> išlikimo uodų lervose laboratorinėmis sąlygomis tyrimas	43
3.5. <i>Bti</i> , išlikusių kraujasiurbuose uoduose, gyvybingumo tyrimas.....	44
4. REZULTATŲ APTARIMAS	46
IŠVADOS.....	49
SANTRAUKA	50
SUMMARY	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52
PRIEDAI	64
1 priedas	64
2 priedas	67
3 priedas	67

DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS

°C – laipsnių Celsijaus

Bp – bazių pora

Bt – *Bacillus thuringiensis*

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*

C-terminalinis – anglies terminalinis

GTC – Gamtos tyrimų centras Vilniuje

Kda – kilodaltonas

N-terminalinis – amino-terminalinis

PDH – piruvato dehidrogenazė

PGR – polimerazės grandininė reakcija

RAMSAR - Ramsaro konvencija yra tarptautinė sutartis, kuria įsipareigojama saugoti ir atsakingai naudoti pasaulio pelkes ir kitas šlapynes

Rpm – apsisukimai per minutę

SKA – sporos-kristalo asociacija

TBE – tris-borato-EDTA tirpalas

UV – ultravioletiniai spinduliai

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiolis

IVADAS

Ligas platinantys kraujasiurbiai vabzdžiai yra aptinkami ir daro įtaką žmonių poilsui ir sveikatai visame pasaulyje, pernešdami žmonių ir jų auginamų paukščių bei gyvulių ligų sukėlėjus ir tuo sukeldami ekonominių problemų tiek žemės ūkiui, tiek rekreacijai. Tokie kraujasiurbiai (Diptera: *Culicidae*) uodai kaip *Anopheles*, *Aedes* ir *Culex* yra maliarijos, dengės karštligės, geltonosios karštligės, limfinės filariozės, virusinio encefalito ir kitų ligų sukėlėjų vektoriai (Tabashnik et al. 1993; Luxananil et al. 2001). Kraujasiurbiai upiniai mašalai (Diptera: *Simuliidae*) gali pernešti žmonių ir galvijų onchocerkozes, paukščių leukocitozoonozes ar tripanosomozes (Valkiunas 2005). Šių vabzdžių gausumo kontrolė – vienas svarbiausių uždavinių siekiant suvaldyti vabzdžių platinamų ligų sukėlėjų plitimą (Becker 2003; Valkiunas 2005).

Vabzdžių gausumo kontrolei buvo plačiai naudoti cheminiai insekticidai (pvz., organiniai fosfatai, karbamatai, piretroidai (van den Berg et al. 2015)), tačiau dėl vis dažniau susidarančio vabzdžių atsparumo jiems (Luxananil et al. 2001) bei cheminių insekticidų žalos naudingiems gyvūnams ir aplinkai (Tabashnik et al. 1993) pradėta ieškoti naujų kenkėjų gausumo reguliavimo priemonių, kurios ne tik patikimai padėtų kontroliuoti vabzdžių skaičių, bet ir būtų saugūs aplinkai. Kaip tokia alternatyva buvo pasirinktos vabzdžiams patogeniškos bakterijos *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), kurios sintetina baltymus, turinčius specifinį toksišką aktyvumą kraujasiurbiams uodams ir upiniams mašalams (Gobatto et al. 2010). Žmogaus reikmėms pasitarnaujančių *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bakterijų porūšių yra ir daugiau, pvz., pasaulyje miškams ir žemės ūkiui kenkiančių drugių (Lepidoptera) vikšrų gausumo kontrolei taikomi *Bt* porūšio *kurstaki* (Van Cuyk et al. 2011), o lapgraužių vabalų (Coleoptera: *Chrysomelidae*) gausumui kontrolei – *Bt* porūšio *tenebrionis* pagrindu pagaminti biologiniai preparatai (Eski et al. 2017). Šiame darbe plačiau aptarsime *Bti* bakterijas, kurios naudojamos dvisparnių vabzdžių gausumo reguliavimui.

Bacillus thuringiensis porūšis *israelensis* priklauso *Bacillus* genčiai, kuriai būdingas sporų formavimas. *Bti* bakterijos pirmą kartą aprašytos 1976 metais (Gould 2006), o jų sugebėjimas formuoti endosporas yra galinga išgyvenimo nepalankiose aplinkos sąlygose strategija. Tam, kad sugrįžti į vegetatyvinę būseną, esant palankioms aplinkos sąlygoms, sporos naudojami ypatingais dygimo mechanizmais (Moir et al. 1994).

Bacillus thuringiensis israelensis bakterijų pagrindu buvo sukurta keletas biologinių preparatų, tokių kaip „Bactoculicid“, „Teknar“, „Bactimos“. Taip pat biologinis preparatas

VectoBac 12AS („Valent Bioscience Corporation“, JAV), kurį Europoje pradėjo naudoti Vokietija ir nuo 1981 iki 2016 metų panaudojo jau daugiau nei 5 000 tonų Aukštutinio Reino slėnyje (Becker et al. 2018) siekiant sumažinti kraujasiurbių uodų gausumą. VectoBac 12AS naudojamas ir Lietuvoje siekiant sumažinti kraujasiurbių upinių mašalų lervų gausumą Nemune nuo 1999 m. Šis preparatas taip pat naudojamas reguliuojant kraujasiurbių uodų gausumą stovinčiame vandenyje. Tačiau nėra vienareikšmiškai aišku, kiek laiko po biologinio preparato panaudojimo gamtoje jį sudarančios *Bti* bakterijos išlieka gyvybingos, gali veikti tikslinių vabzdžių lervas, todėl reikalingi papildomi tyrimai, kurie yra ypač svarbūs biologinio preparato panaudojimo optimizavimui.

Darbo tikslas

Ištirti bakterijų *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) išlikimą po biologinio preparato VectoBac 12AS panaudojimo.

Uždaviniai:

1. Literatūros šaltinių apie tyrimo objektą paieška ir analizė. *Bti* bakterijų aptikimo PGR metodu optimizavimas;
2. Biologinio preparato VectoBac 12AS veiksmingumo ir bakterijų gyvybingumo jame tyrimas po ilgalaikio šaldymo;
3. Biologinį preparatą sudarančių bakterijų *Bti* išlikimas Nemune po preparato VectoBac 12AS panaudojimo (upinių mašalų (*Simuliidae*) lervose ir lėliukėse bei uodų trūklių (*Chironomidae*) lervose);
4. Biologinį preparatą sudarančių bakterijų *Bti* išlikimas po preparato VectoBac 12AS panaudojimo laboratorijoje kraujasiurbių uodų (*Culex pipiens*) lervose.
5. *Bti*, išlikusių kraujasiurbiuose uoduose, gyvybingumo tyrimas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis – tai unikali bakterija, pasižyminti tuo, kad gamina chemines medžiagas, kurios komerciniais tikslais naudojamos kontroliuoti vabzdžių, keliančių grėsmę žemės ūkiui ar žmonių sveikatai, gausumą (Ibrahim et al. 2010; Jouzani et al. 2017).

Bacillus thuringiensis priklauso *Bacillaceae* šeimai. Šios bakterijos yra vabzdžių patogenas, kuris natūraliai pasaulyje aptinkamas dirvožemyje, bet taip pat *Bt* buvo izoliuotos ir iš įvairesnių aplinkų, tokių kaip vandens telkiniai, sandėliuotos grūdinės kultūros, negyvi vabzdžiai, pvz., uodai (Garcia-Robles et al. 2001; Rosas-Garcia 2009; Jouzani et al. 2017). *Bacillus thuringiensis* pirmą kartą moksliniuose straipsniuose paminėtos mokslininko Ishiwata dar 1901 metais kaip šilkverpių lervų liga ir iš pradžių *Bt* buvo pavadintos *B. sotto*. 1911 metais šios bakterijos gavo šiuo metu mums žinomą *B. thuringiensis* pavadinimą pagal Tiuringijos regioną esantį vidurio Vokietijoje, kai mokslininkas Berliner izoliavo jas iš patogenų užsikrėtusių *Anagasta kuehniella* maistinių kandžių lervų surinktų šiame regione (Whiteley 1986; Federici 2005).

Bacillus thuringiensis nesulaukė ypatingo dėmesio iki tada, kai mokslininkas Angus 1954 metais atrado jų kristalinius baltymus, kuriuos apibūdino kaip veiksnį, kuris ir nužudo vabzdžius. Šie baltymai yra sintetinami dideliais kiekiais, tačiau tik bakterijos sporuliacijos metu, tada šie baltymai gali sudaryti iki 25 % sporuliuojančios ląstelės masės (Agaisse and Lereclus 1995; Palma et al. 2014). Įvairių tyrimų metu buvo identifikuoti tūkstančiai naujų *Bt* kamienų. Šie kamieniai žudo įvairius vabzdžius ir net kitus organizmus, tokius kaip nematodai ir pirmuonys (de Maagd et al. 2003). Pavyzdžiui, *Bt kurstaki* veikia drugių (Lepidoptera) lervas, o *Bt israelensis* – uodus, upinius mašalus ir kai kuriuos kitus dvisparnius (Diptera) vabzdžius. *Bacillus thuringiensis* sintetina kelių tipų toksinus: α -egzotoksinus, β -egzotoksinus ir δ -endotoksinus (kristalinius baltymus Cry). α ir β -egzotoksinais yra nespecifiniai ir aktyviai veikia daugelį vabzdžių rūšių, o tuo tarpu δ -endotoksinais veikia specifiskai siaurą spektrą vabzdžių (Whiteley 1986). Pastarieji 1998 metais buvo apibūdinti kaip parasporaliniai įterptiniai *Bt* baltymai, kurių aktyvumas pasireiškia toksiškumu prieš taikinius-organizmus arba bet koki baltymą, kurio seka panaši į bet kurio žinomo Cry baltymo seką (Crickmore et al. 1998).

Parasporaliniai kristaliniai intarpai yra sintetinami kaip neaktyvūs protoksinais ląstelės viduje ir formuoja kristalą, kurio dydis siekia maždaug 1 μm (Grochulski et al. 1995; Rajamohan et al. 1995; Palma et al. 2014). Šie kristaliniai baltymai yra toksiški vabzdžių

lervoms ir yra vadinami δ -endotoksinais arba Cry baltymais, kurie ištirpsta šarminėje vabzdžių virškinamojo trakto aplinkoje, o neaktyvūs protoksinais yra suaktyvinami ten esančių proteinazių (Rajamohan et al. 1995; Otieno-Ayayo et al. 2008).

1.2. *Bacillus thuringiensis* porūšiai

1970-aisiais mokslininkas Dulmage atrado *Bt* porūšio *kurstaki* HD-1 kamieną, kuris pasirodė turintis didesnę toksinę aktyvumą prieš žemės ūkio kenkėjus nei bet koks kitas tuo metu žinomas *Bt* kamienas. Tačiau po kelerių metų buvo atrastas *Bt* porūšis *israelensis*, kuris efektyviai veikė dvisparnių vabzdžių lervas.

Po daugiau tyrimų buvo atrasta dar daugiau *Bt* porūšių, pavyzdžiui, *Bt* porūšis *morrisini* sintetinant toksinus, kurie veikia Coleoptera būrio kai kurių rūšių vabalų lervas (Federici 2005), *Bt* porūšis *tenebrionis* veikiantis lapgraužių vabalų (*Coleoptera: Chrysomelidae*) (Eski et al. 2017), *Bt morrisini* kamienas PG-14 veikiantis prieš nematodus atrastas dar vėlyvaisiais 1980-aisiais (Crickmore et al. 1998). Tolimesni tyrimai leido atrasti dar daugiau įvairesnių porūšių, pavyzdžiui, *Bt* porūšis *jegathesan*, sintetinantis septynis Cry ir Cyt baltymus (Delecluse et al. 2000) ir veikiantis uodų lervas. Tyrinėjant *Bt* bakterijas buvo pastebėtas ir kitos bakterijų rūšies – *Clostridium bifermentans* – toksiškas poveikis uodams (Delecluse et al. 2000).

Bacillus thuringiensis buvo grupuojamos pagal antigenų tipus. Serotipai skirstomi pagal jų gebėjimą jungtis su tam tikru šabloniniu antiserumu. Kamienai gali reaguoti su vienu ar keliais tokiais antiserumais, kurie apibūdina serovarus, tai, pavyzdžiui, serotipas 3a, 3b ir 3c parodo serovarą *kurstaki*, kurio serotipas 14 parodo *israelensis* kamieną (Lecadet et al. 1999). Mokslininkai De Barjac ir Frachon 1990 metais į šią klasifikaciją įtraukė 27 serovarus ir 34 serotipus, tačiau 1998 metais buvo atrasti dar 82 *Bt* serotipai ir 69 serovariai, todėl senoji klasifikacija nebebuvo tiksli. 1999 metais *Bt* kamienai buvo suklasifikuoti pagal H antigenų serotipus (Lecadet et al. 1999).

Skirtingi *B. thuringiensis* izoliatai parodo skirtingą vabzdžių-taikinių specifiškumą apibrėžtą jų gaminamų toksinų spektro. Pavyzdžiui, *Bt kurstaki* HD-1 izoliatas turi platų aktyvumo spektrą, kadangi sintetina keturis endotoksinų baltymus (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac ir Cry2Aa), o palyginimui galima paimti *Bt kurstaki* HD-73 izoliatą, kuris turi labai siaurą insekticidinio veikimo spektrą, kadangi sintetina tik vieną endotoksiną (Cry1Ac) (Federici 2005).

1.3. *Bacillus thuringiensis* toksinų klasifikacija

Pradžioje *Bt* toksinai buvo klasifikuojami mokslininkų Hofte ir Whiteley 1989 metais į dvi pagrindines grupes: Cry kristalinius ir Cyt citolitinius baltymus, atitinkamai juos koduojantys genai taip pat buvo priskirti dviem grupėms. Jų klasifikavimo sistema buvo panaudota organizuoti insekticidinių baltymų nomenklatūros pamatą, paremtą šių baltymų insekticidiniu aktyvumu ir išskirti keturis δ -endotoksinius, kuriuos pavadino naudodami romėniškus skaitmenis (CryI, CryII, CryIII ir CryIV), pagal jų toksiškumą tam tikroms vabzdžių grupėms (Crickmore et al. 1998). Kad ir kaip bebūtų, ši sistema tapo nenaudinga, kai atrandant naujus toksinus koduojančius genus jų nebuvo galima klasifikuoti pagal šią sistemą (pavyzdžiui, CryIIA baltymas buvo klasifikuojamas kaip toksiškas Lepidoptera ir Diptera, o CryIIB, kuris nėra toksiškas Diptera vabzdžiams, buvo priskirtas tai pačiai klasei) (Schnepf et al. 1998). Todėl nauja nomenklatūros sistema buvo vystoma remiantis aminorūgščių sekų identifikavimu, o ne toksiniu aktyvumu, taip pat romėniška numeracija buvo pakeista arabiškais skaitmenimis ir, pavyzdžiui, CryIAa tapo Cry1Aa (Crickmore et al. 1998).

Pagal šią klasifikavimo sistemą keturi rangai nurodomi pavadinant toksiną, taip išskirstant juos pagal aminorūgščių sekų panašumus. Sekos, kurių panašumas yra daugiau nei 45 % yra priskiriami pirmajam rangui (pvz., Cry1). Baltymai, kurie turi daugiau nei 78 % panašumą, įgauna tą patį antrąjį rangą (žymimą didžiąja raide) (pvz., Cry1A) ir baltymai, kurių panašumas siekia daugiau nei 95 % įgauna tą patį trečiąjį rangą (žymimą mažąja raide) (pvz., Cry1Aa). Paskutinis nomenklatūros ženklas rodo tiesiog įvedimo į sistemą numerį, nepriklausomai nuo sekų panašumo su kitomis įvestomis sekomis (pvz., Cry1Aa1), todėl dažniausiai šis ženklas nomenklatūroje išvis nenaudojamas. Panaši nomenklatūros sistema taikoma Cyt ir Vip toksinams.

Cry baltymų grupė susideda iš daugiau nei 800 endotoksinių, apimant ir holotipinius toksinus, kurie buvo atrasti ir identifikuoti naujų tyrimų metu (Bravo and Soberón 2008; Bravo et al. 2013; Adalat et al. 2017). *Bti* δ -endotoksinių nomenklatūros komitetas buvo įsteigtas 1993 metais tam, kad nuolat pildytų 1989 metais mokslininkų Hofte ir Whiteley pradėtą šių toksinų duomenų bazę. 2020 metų balandžio 12 dienos duomenimis yra išskirtos 78 Cry toksinų šeimos (nuo Cry1 iki Cry78). Prieš 10 metų (2010 metų liepos 26 dieną) ši sąrašą sudarė 67 šeimos (Cry1 – Cry67). Sąrašas yra nuolat atnaujinamas ir papildomas, jį galima sekti naudojantis internetine nuoroda (Adalat et al. 2017):

http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html

Dauguma Cry toksinų priklauso taip vadinamai trijų domenų baltymų grupei (de Maagd et al. 2003; Li et al. 2008), kuri yra toksiška daugeliui vabzdžių būrių (Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera ir Diptera) ir gali būti toksiški parazitiniams nematodams (Lord 2005; Adalat et al. 2017).

1.4. Trijų domenų Cry baltymai

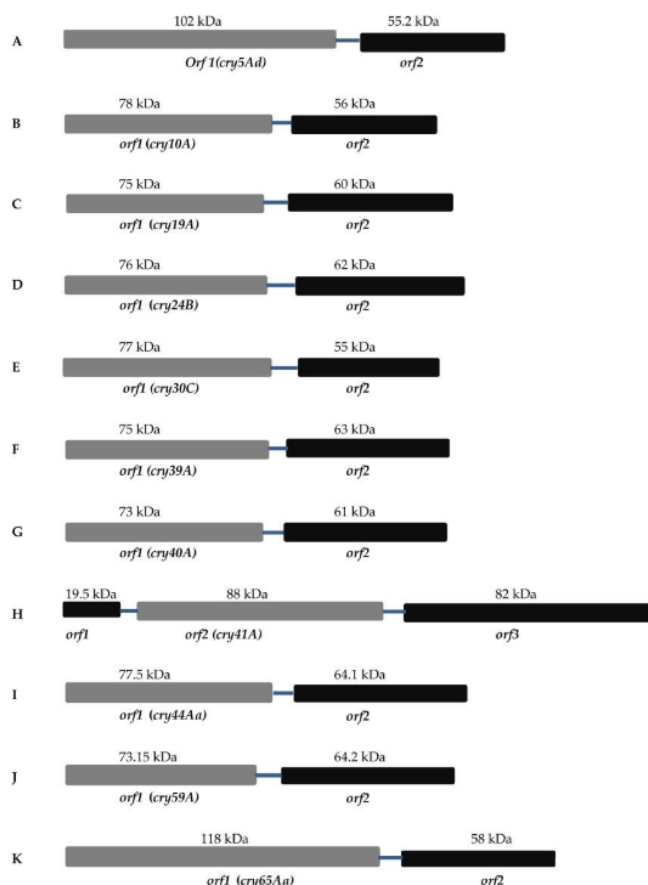
Didžiausia Cry baltymų šeima yra vadinama trijų domenų toksinų šeima, kuri reprezentuoja beveik 90 % Cry baltymų toksinų (Akiba et al. 2009).

Trijų domenų Cry (3d-Cry) toksinai yra sferinės molekulės susidedančios iš trijų savitų skirtingų domenų. I-asis domenas yra alfa-spiralinis N terminalinis domenas. II-asis ir III-iasis domenai dažniausiai sudaro beta-klostes. Viena ypatinga 3d-Cry toksinų savybė yra ta, kad jie susideda iš protoksinų, kurie būna dviejų skirtingų ilgių – 65 kDa ir 135 kDa (Pardo-Lopez et al. 2013; Adalat et al. 2017). 135 kDa baltymai, tokie kaip Cry1A, yra protoksinai, kuriuose tikrasis toksinas yra N-terminaliniame gale. C-terminalinė pusė neturi toksinės dalies, tačiau užima didelę dalį 135 kDa toksino ir padeda Cry toksino kristalizacijos metu po jo pagaminimo (Evdokimov et al. 2014). Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad *Bt* kamienų 135 kDa toksinai be savo C-terminalinės dalies negali kristalizuotis, todėl šis domenas vadinamas kristalizacijos domenu (Hayakawa et al. 2010). Jį sudaro nuo 15 iki 19 cisteinų ir prisideda prie tarpmolekulinio disulfidinių ryšių susidarymo, o tai stabilizuoja patį kristalą (Pardo-Lopez et al. 2013).

3d-Cry 65 kDa baltymai neturi C-terminalinio domeno ir susideda vien tik iš toksinio domeno. Kad ir kaip bebūtų, dauguma tokių natūraliai trumpesnių toksinų vistiek lengvai kristalizuojasi. Daugumoje tokių atvejų žinoma, kad yra įtraukti kiti faktoriai, įskaitant cry genus, vadinamus kristalizacijos, arba baltymais „padėjėjais“.

Dauguma trijų domenų Cry toksinų turi tipiską 135 kDa toksino geną, kuris yra padalintas į du atskirtus atviro skaitymo rėmelius (ORF). ORF produktai panašūs į C-terminalinę ir N-terminalinę 135 kDa toksino dalis.

Įvairių *Bt* toksinų genų konfigūracijos, įskaitant cry10A (*Bti* toksinas), cry19A, cry24B, cry30C, cry39A, cry40A, cry44A, cry59A yra parodyti 1 paveiksle. Kiekvienu atveju, netiesioginis ORF koduoja toksiną, o netiesioginis yra kristalizacijos domenas. Mokslininkas Barboza-Corona ir kiti apibrėžė dviejų baltymų funkcijas, ekspresuodamas skirtingas Cry19A ORF2 ir Cry1C N-terminalinių ir C-terminalinių dalių kombinacijas *Bt* 4Q7 kamieno kristalizacijoje. Rezultatai patvirtino, kad Cry19A ORF2 dalyvavo sintezėje ir kristalizacijoje funkcionuodamas kaip C-terminalinis 135 kDa toksino domenas (Adalat et al. 2017).

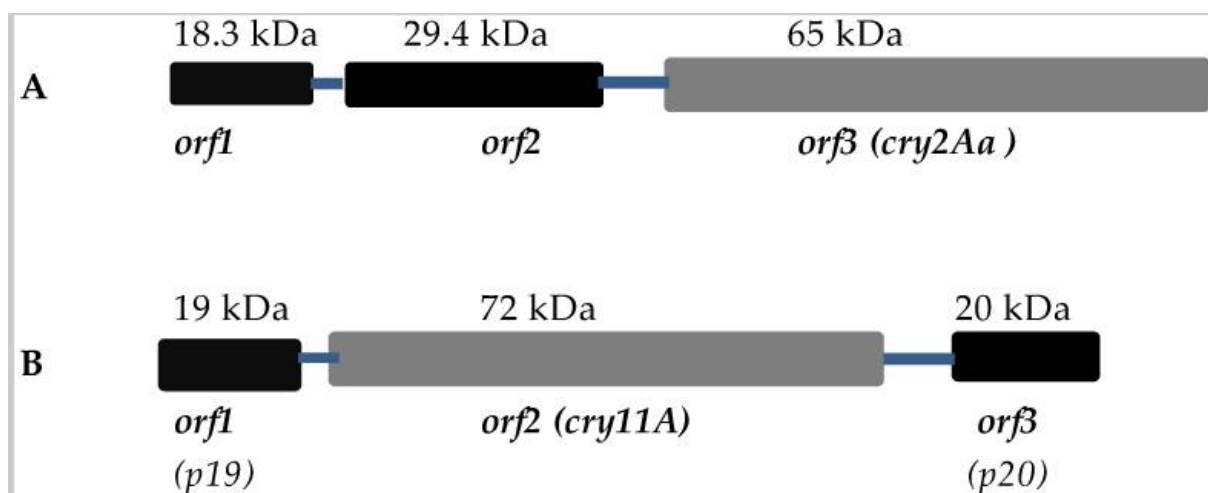


1 pav. Operonų, turinčių atskirtus C-terminalinio domeno atvirus skaitymo rėmelius, konfigūracijos: (A) *Bacillus thuringiensis* L366 kamieno cry5Ad; (B) *Bt israelensis* cry10A; (C) *Bt jegathesan* cry19A; (D) *Bt sotto* cry24B; (E) *Bt jegathesan* cry30C; (F) *Bt aizawai* cry39A; (G) *Bt aizawai* cry40A; (H) *Bt* A146 kamieno cry41A; (I) *Bt entomocidus* cry44A; (J) *Bt* kamieno Bm59-2 ccry59A; (K) *Bt* kamieno SBT-003 cry65Aa (Adalat et al. 2017).

Tarpgeninių regionų ilgis yra 48 bp, 145 bp ir 114 bp atitinkamai cry10A, cry19A ir cry30C genuose (Barboza-Corona et al. 2012). Nėra homologijos tarp šių regionų ar bet kokių žinomų transpozonų ar įterptinių sekų, kurios galėtų paaiškinti tokį genų atsiskyrimą. Manoma, kad cry19A yra mutacijų rezultatas, kurios susikaupė išlikusiuose atsiskyrimo regionuose tarp cry19A ir orf2 genų. Kad ir kaip bebūtų, faktoriai atsakingi už šį išsidėstymą nėra žinomi. Tai

galėjo išsivystyti dėl DNR fragmento įsiterpimo į geną, kuris anksčiau kodavo 135 kDa baltymą (Adalat et al. 2017).

Cry11Aa yra efektyviausias *Bti* kristalinis toksinas (Chilcott and Ellar 1988), kuris yra koduojamas geno, randamo trijų genų operone, apimančiame *cry11A*, *p19* ir *p20* genus (Dervyn et al. 1995) (2 pav.). Pirmasis *cry11Aab* operono ORF (*p19*) koduoja *p19* polipeptidą, o šį geną sudaro 11,7 % cisteino - taip pat kaip 135 kDa endotoksinų C-terminalinės dalis. Mokslininkai iškėlė hipotezę, kad tai gali dalyvauti kaip šaperoninis baltymas ir per baltymo-baltymo sąveiką suteikti ypatingą gardelės struktūrą, kuri įgalintų Cry11A susijungimą į vieną kompleksą su kitais *Bti* toksinais (Dervyn et al. 1995). Kad ir kaip bebūtų, *p19* panaikinimas neturėjo pastebimo efekto Cry11Aa sintezei. 19 kDa baltymo (*orf1*) vaidmuo išlieka neaiškus (Adalat et al. 2017).



2 pav. Schematiška Cry toksino operonų iliustracija, įtraukiant į ją ir potencialius šaperonų genus iš *Bt kurstaki* (A) ir *Bt israelensis* (B).

Cry11A operono genas *orf3* koduoja 20 kDa baltymą, kuris funkcionuoja kaip molekulinis šaperonas. Kai šis genas buvo pašalintas iš ekspresijos konstrukto, nebuvo sintetinami Cry11A kristalai. Genas *p20* buvo efektyvus stiprinant Cry11Aa sintezę, palengvindamas didesnių Cry11Aa kristalų formavimąsi *Bt* ir rekombinantinėse *Escherichia coli* (Federici et al. 2003). Kaip žinoma, *p20* stabilizuoja *Bt* Cry11A kristalą dalyvaudamas jo sintezėje, tačiau pats mechanizmas nėra žinomas. Šis baltymas gali būti įtrauktas į potransliacinius procesus (apsaugoti proteolizės metu susidarančius polipeptidus, prisijungdamas prie jų). *P20* padidina tokių toksinų kaip Cyt1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry3A ekspresijos lygį (Sazhenskiy et al. 2010; Diaz-Mendoza et al. 2012).

Mokslininkas Dervyn ir kiti iškėlė hipotezę, kad dauguma Cry toksinų genų konfigūracijų, kurios aptinkamos iki šių dienų, išsivystė iš bendro trijų genų operono (Dervyn et al. 1995). Kai kuriais atvejais, vienas arba abu netoksiniai genai buvo prarasti, taip atsiradavo monocistroninės organizacijos (Jouzani et al. 2017). Pavyzdžiui, cry10A atveju buvo prarastas orf2 genas, o cry2A ir cry11A visi trys genai išliko iki šiol (Adalat et al. 2017).

1.5. *Bacillus thuringiensis israelensis* porūšio bendroji charakteristika

Domenas:	<i>Bacteria</i>
Tipas:	<i>Firmicutes</i>
Klasė:	<i>Bacilli</i>
Eilė:	<i>Bacillales</i>
Šeima:	<i>Bacillaceae</i>
Gentis:	<i>Bacillus</i>
Rūšis:	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Porūšis:	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>

Bacillus thuringiensis israelensis pirmasis *Bt* porūšis identifikuotas kaip toksiškas dvisparnių vabzdžių lervoms. Tai gram-teigiamos sporas formuojančios bakterijos, kurios šiuo metu laikomos stipriausiu ir labiausiai draugišku aplinkai biologiniu komponentu integruotu į ligas pernešančių vektorių kontrolės programą. *Bti* formuoja kristalinius parasporalinius kūnelius susidedančius iš baltymų protoksinų (δ-endotoksinų Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba (Soberon et al. 2013)), ši savybė leidžia šias bakterijas panaudoti kaip biopesticidą prieš ligų sukėlėjus platinančių kenksmingų nariuotakojų lervas. *Bti* yra efektyvesnis siekiant sumažinti daugelio rūšių uodų ir mašalų lervų gausumą, lyginant jį su kitais iki šiol žinomais biologinei kontrolei skirtais preparatais. Atsparumas šioms bakterijoms nebuvo pastebėtas nepaisant to, kad *Bti* preparatai naudojami jau daugiau nei 35 metus (Luxananil et al. 2001). Tai siejama su skirtingais veikimo būdais ir sinergetiniu keturių pagrindinių toksinų poveikiu, apie tai bus aptariama vėlesniuose skyreliuose.

1.6. *Bacillus thuringiensis* naudojimas vabzdžių kontrolės programose

Vabzdžių gausumo kontrolė turi ilgą istoriją: 1910-aisiais buvo įrenginėjami rinkimo nameliai, vanduo pripildomas aliejais, išleidžiami stovinčio vandens telkiniai ir veisiamos lervomis mintančios žuvis. 1920-aisiais laukai purškiami „Paris Green“ vario ir arseno druskomis ir galiausiai pradedamas naudoti DDT (dichlordifeniltrichlorešanas) (Becker and Ludwig 1993; Darwin 2004). Europoje didesnio masto uodų kontrolės programos įvestos 1960-aisiais tam, kad pagerinti žmonių komforto lygį, gerinti turizmo galimybes, tai ypatingai aktualu

buvo Viduržemio jūros pakrantės regionams (Parrinello and Bécot 2019). Po to, kai DTT daugelyje šalių buvo uždraustas, jis buvo pakeistas kitomis cheminėmis medžiagomis, kol buvo ieškoma biodegraduojančių augalinės kilmės junginių (Sukumar et al. 1991). Kai kurie cheminiai insekticidai, tokie kaip organiniai fosfatai, karbamatai, piretroidai, yra vis dar panaudojami uodų kontrolei, tačiau, dėl poveikio žmonių sveikatai ir aplinkai bei įgyto uodų atsparumo jiems (van den Berg et al. 2015), buvo dedamos didelės pastangos ieškant alternatyvių ir kuo labiau aplinkai nekenksmingų vabzdžių gausumo kontrolės metodų.

Bacillus thuringiensis israelensis bakterijos netrukus buvo įtrauktos į uodų kontrolės programas visame pasaulyje ir yra naudojamos iki šių dienų Europoje, Kanadoje, JAV ir tropikų vietovėse pietryčių Azijoje, Afrikoje ir Pietų Amerikoje (Schäfer and Lundström 2014). Vokietija buvo viena pirmųjų *Bti* preparatų naudotojų ir nuo 1981 iki 2016 metų panaudojo daugiau nei 5 000 tonų maždaug 400 000 ha plote Aukštutinio Reino slėnyje (Becker et al. 2018).

Įvairūs vabzdžiai kenkėjai sukelia nemažai problemų pasaulio ekonomikai. Tarp įvairių ekonomikos sektorių pasaulyje agrokultūra užima ypač svarbią vietą, sukurdamą daug darbo vietų ir pajamų valstybei. Tačiau šis sektorius nuolat patiria nuostolius dėl įvairių ligų ir augalų kenkėjų, tarp jų Lepidoptera. Brazilijoje buvo paskaičiuota, kad dėl augalų kenkėjų poveikio produkcijos kiekis sumažėja maždaug 25 milijonais tonų (maisto produktų, pluošto ir biokuro) kiekvienais metais (Oliveira et al. 2014). Valstybės turtingos miškais taip pat kenčia nuo miškų kenkėjų, tokių kaip neporinis verpikas (*Lymantria dispar*) (Jactel et al. 2019).

Galimų panaudoti cheminių insekticidų spektrą susiaurina: įgimtas ar įgytas vabzdžių atsparumas, preparato įtaka gamtai bei kitiems organizmams ar naudingiems vabzdžiams, galimas oro, maisto ar vandens resursų užteršimas (Federici et al. 2003; Parker ir Feil 2005). Tai puikiai parodo būtinumą rasti ir išstbulinti naują vabzdžių kontrolės metodą, naudojant biologinius organizmus, tokius kaip *B. thuringiensis* (Federici et al. 2003; Palma et al. 2014). Insekticido gamybos metu turi būti ypatingai atsižvelgta į aukštą produkto kokybę ir jo efektyvumą tam, kad preparatą būtų lengva ir saugu naudoti, o jo veiksmingumas išliktų kiek galima ilgiau (Rosas-Garcia 2009).

Bacillus thuringiensis sintetina entomopatogeniškus baltymus, kurie yra toksiški specifiniams vabzdžiams, bet nėra kenksmingi kitiems organizmams (Siqueira et al. 2004), jie veikia specifiskai Lepidoptera, Coleoptera ir Diptera vabzdžių lervas (Schnepf et al. 1998; Aronson 2002), todėl *Bt* pastaruoju metu yra dažniausiai naudojamas biologinis kontrolės programų insekticidas siekiant paveikti grūdinių kultūrų kenkėjus (Lepidoptera, Coleoptera) ir

žmonių bei gyvūnų ligų sukėlėjų pernešėjus (Schnepf and Whiteley 1981). *Bt* preparatas pirmą kartą laukuose pradėtas naudoti maždaug 1930 metais pietryčių Europoje (Vengrijoje ir Jugoslavijoje) tam, kad sumažinti europinio grūdų vikšro *Ostrinia nubilalis* gausumą (Schnepf et al. 1998).

Įvertinus teigiamą *Bt* preparato poveikį ir jo poreikį ateityje, pradėta preparato „Sporeine“ gamyba 1938 metais Prancūzijoje, tačiau viskas sustojo dėl antrojo pasaulinio karo (Lord 2005). 1957 metais *Bt* preparatai tapo komerciškai prieinami, o pirmuoju produktu, pasiekusiu prekybos vietas, tapo „Valent BioSciences“ preparatas „Thuricide“ (sukurtas *Bt kurstaki* pagrindu), kuris naudojamas iki šių dienų (Schnepf et al. 1998; Lord 2005). Dauguma *Bt* kamienų, galinčių sintetinti entomopatogeniškus baltymus, naudojami kaip aplinkai draugiškas augalų kenkėjų bioinsekticidas jau daugiau nei 60 metų (Betz et al. 2000; Garcia-Robles et al. 2001; Hernández-Rodríguez et al. 2009).

Genai koduojantys Cry baltymus buvo klonuoti (Schnepf ir Whiteley 1981) ir pradėta jų ekspresija augaluose: pirma genetiškai modifikuoti tabako ir pomidorų augalai (Barton et al. 1987). Nuo tada pradėti auginti *cry* genais pakeisti ryžiai, kopūstai ir sojos (Schnepf et al. 1998). 1996 metais medvilnės, kukurūzų ir bulvių sėklos, iš kurių išsaugs genų inžinerijos metodais taip paveikti augalai, kad ekspresuotų Cry toksinus, tapo prieinami Jungtinių Valstijų augintojams (Schnepf et al. 1998). Transgeninių augalų naudojimas padeda sumažinti cheminių pesticidų naudojimą laukuose, o taip pat jų žalą žmogaus sveikatai, aplinkai ir naudingiems vabzdžiams (Betz et al. 2000). Tokiu būdu genetiškai pakeitus augalus gali būti žymiai padidintas tikslinių vabzdžių spektras, kadangi kai kurie vabzdžiai, tokie kaip šaknų kenkėjai, nėra pasiekiami naudojant purškiamus cheminius insekticidus (Schnepf et al. 1998).

Kontrolės programų metu *Bti* ir *B. sphaericus* naudojimas ir rezultatų analizavimas leido atrasti tinkamiausius kamienus (Federici et al. 2003). Pastaruoju metu praktikoje yra naudojami *Bacillus sphaericus* ir *Bti* bakterijų pagrindu pagaminti biopesticidai siekiant sumažinti *Culex*, *Aedes* ir *Anopheles* uodų gausumą (Luxananil et al. 2001; Broderick et al. 2006). *B. sphaericus* sintetina parasporalinius kristalinius baltymus, kitaip žinomus kaip binarius-dvilypius toksinus (Bin), kurie ypač toksiški *Culex* lervoms. Bin susideda iš dviejų baltymų, surišimo komponento BinB (51,4 kDa) ir toksino domeno BinA (41,9 kDa) (Federici et al. 2003), tačiau yra pastebėtas įgytas *Culex* uodų atsparumas šių bakterijų pagrindu pagamintiems preparatams (Wirth et al. 2000; Ibrahim et al. 2010).

Nepaisant to, kad kitos bakterijos, tokios kaip *B. popilliae* ir *B. sphaericus*, yra taip pat naudojamos kaip mikrobiniai insekticidai, tačiau jų insekticidinio aktyvumo spektras,

lyginant su *B. thuringiensis*, yra pakankamai siauras. *Bti* preparatai plačiai naudojami daugelyje pasaulio šalių būtent kraujasiurbių uodų ir mašalų kontrolei, kadangi vabzdžių atsparumo problema, su kuria buvo susiduriama naudojant cheminius kontrolės metodus ar *B. sphaericus*, vis dar neiškilo šio preparato atžvilgiu (Bravo and Soberón 2008; Jouzani et al. 2017).

Plačiausiai pasaulyje naudojami komerciniai *B. thuringiensis israelensis* preparatai uodų ir mašalų kontrolei yra VectoBac® ir Teknar® (Federici et al. 2003) (1 lentelė). *Bti* preparatai sėkmingai panaudoti Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) remiamoje programoje 1980–1990 metais vakarų Afrikoje prieš upinių mašalų *Simulium damnosum* lervas. Šie mašalai yra žmonių parazitinių nematodų *Onchocerca volvulus*, kurie sukelia onchocerkozę, kitaip vadinamą „upiniu aklumu“, vektoriai (Otieno-Ayayo et al. 2008; Raymond and Federici 2017).

PSO kontrolės programų metu *B. thuringiensis israelensis* produktai buvo naudojami rotuojant juos su cheminiais insekticidais (Federici 2005), nes didelio kiekio *Bti* produktų gamybos kaina nėra maža (Sene et al. 2009; Raymond and Federici 2017).

1 lentelė. Komerciškai parduodamų *B. thuringiensis* insekticidinių preparatų sąrašas (Rosas-Garcia 2009; Raymond and Federici 2017).

Preparato veiklioji dalis (pagrindas)	Preparato pavadinimas	Taikinys-organizmas	Gamintojas
<i>Bt</i> porūšis <i>israelensis</i>	VectoBac®	Uodų ir upinių mašalų lervos	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>israelensis</i>	Teknar®	Uodų ir upinių mašalų lervos	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>israelensis</i>	Gnatrol®DG	Žeminių (Sciaride) ir grybinių uodukų (Mycetophilidae) lervos	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>israelensis</i>	<i>Bt</i> -horus	Uodų lervos	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	CoStar®	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Deliver®	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Javelin®	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Lepinox®	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Condor®	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Jackpot®TP	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Turix WP/Agree WP	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Aquabac™	Uodų ir upinių mašalų lervos	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Dipel®	Lepidoptera	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	XenTari®	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Biobit®	Lepidoptera	Valent BioSciences Corporation

<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Gnatrol®	Grybinių uodukų (Mycetophilidae) lervos	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Foray®	Lepidoptera	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i>	Thuricide®	Lepidoptera	Certis; Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>kurstaki</i> EG7841 kamienas	Crymax WDG	Lepidoptera	Certis
<i>Bt</i> porūšis <i>aizawai</i>	Novodan®	Coleoptera	Valent BioSciences Corporation
<i>Bt</i> porūšis <i>aizawai</i>	Agree® WG	Lepidoptera	Certis

1.7. *Bacillus thuringiensis israelensis* preparato tiksliniai vabzdžiai

Bacillus thuringiensis israelensis preparatas veikia dvisparnių vabzdžių lervas, dažniausiai yra naudojamas siekiant sumažinti kraujasiurbių uodų, upinių mašalų gausumą, rečiau yra naudojamas sumažinti uodų trūklių (*Chironomidae*), grybinių žeminių uodukų (*Mycetophilidae* ir *Sciaridae*) ar kitų dvisparnių vabzdžių gausumo kontrolei.

Kraujasiurbiai uodai ir upiniai mašalai daro įtaką žmonių populiacijos sveikatai ir gerbūviui dėl dviejų pagrindinių priežasčių: uodų pernešamų ligų ir nemalonių pojūčio, susijusių su jų įkandimais (Becker et al. 2010). Globaliu mastu, didžiausias susirūpinimas šiais vabzdžiais yra dėl jų pernešamų ligų sukėlėjų (maliarijos, dengės karštligės, vakarų Nilo viruso, geltonojo drugio, onchocerkozių ir kt.). Nors dažniausiai šios ligos paplitusios tropinėse ir subtropinėse vietovėse, tačiau keli invazinės uodų rūšies *Aedes albopictus* platinamos dengės karštligės ir Chikungunya karštligės autochtoninio perdavimo atvejai užfiksuoti Pietų Europoje. Vakarų Nilo karštinė yra paplitusi pietų Europoje, o dėl klimato pokyčių gali plisti į šiaurę (Succo et al. 2016; Calba et al. 2017). Didžiulio kiekio upinių mašalų sukandimai gali nužudyti karvę, Lietuvoje tokie atvejai užfiksuoti 1999 ir 2005 metais (Bartninkaitė et al. 2006). Kai kuriuose regionuose sezoniniai uodų ir kraujasiurbių upinių mašalų protrūkiai sukelia problemų rekreacinėse ir gyvenamosiose vietovėse (Zhao et al. 2016; Falkenhorst et al. 2018).

Uodai veisiasi įvairiuose stovinčio vandens telkiniuose ar talpose, tokiose kaip nenaudojamos padangos, skardinės ar netgi dėl pašalintos šakos medžio kamiene atsirandantys įdubimai (Vega-Rúa and Okech 2019). *Ae. vexans* ir *Ae. sticticus* labai gausiai gali veistis patvinsiu upių vandenyje (Schafer et al. 2008). Uodų gausumo kontrolės strategijos priklauso nuo tikslinių rūšių: potvynių vandenyje besiveisiantys uodai pareikalauja labai didelio kiekio biologinio preparato panaudojimo dideliame plote, o preparato paskleidimui kartais panaudojami sraigtasparniai. Tuo tarpu uodai besidauginantys stovinčio vandens telkiniuose ar

talpose gali būti veikiami lokaliai ir žymiai mažesniu preparato kiekiu (van den Berg et al. 2012).

Upiniai mašalai (Diptera: *Simuliidae*) vystosi tekančiame vandenyje. Suaugę šie vabzdžiai palieka vandenį ir sukelia nepatogumų žmonėms ir gyvūnams aplinkinėse teritorijose. Upinių mašalų gausumo kontrolę riboja ir, kai kuriais atvejais, apsunkina nemažai faktorių, tokių kaip pačių lervų skaičius, vystymosi stadija, tekančio vandens greitis, sesto tipai ir kiekiai, upės vagos charakteristika ir galimi lietūs (Gray and Fusco 2017).

1.8. Vabzdžių kontrolės *Bacillus thuringiensis israelensis* bakterijomis poveikis aplinkai

Didžiausias didelio masto vabzdžių kontrolės iššūkis yra nepadaryti žalos žmonių sveikatai bei aplinkai. *Bti* yra laikomas aplinkai nekenksmingu, efektyviu ir tiksliniam organizmams specifiniu biocidu (Laurence et al. 2011). Dauguma tirtų organizmų, išskyrus kraujasiurbius uodus (*Culicidae*), upinius mašalus (*Simuliidae*) ir uodus trūklius (*Chironomidae*), neparodė aukšto mirtingumo lygio, net panaudojus didžiules, praktikoje nenaudojamas, *Bti* koncentracijas. Tačiau *Bti* naudojimas nėra visiškai neginčijamas. Uodai yra svarbi biomasės dalis jų dauginimosi vietose ir yra kai kurių vandens ir sausumos organizmų maisto šaltinis (Becker et al. 2010). Taip pat, kai kurie suaugėliai uodai atlieka dažnai neminimą augalų apdulkinimo funkciją (Peach and Gries 2019; Lahondere et al. 2020).

Uodai trūkliai dažnai sudaro didžiausią dalį bestuburių biomasės stovinčio ir tekančio vandens ekosistemose (Allgeier et al. 2019) ir gerokai prisideda prie ten gyvenančių rūšių įvairovės (Theissinger et al. 2019). Juose esantis aukštas baltymų kiekis lemia, kad tai yra aukštos kokybės maisto šaltinis vandens (amfibijoms, žuvims, vabzdžiams) ir sausumos (paukščiams, šikšnosparniams, vorams, vabzdžiams) gyventojams (Poulin et al. 2010; Jakob and Poulin 2016). Suaugėliai uodai trūkliai formuoja didelius būrius ir gali dominuoti iki 90 % tarp kitų atsirandančių vabzdžių, taip sudarydami iki 100 g sausos biomasės per metus kvadratiniam metre. Taip pat jie parodo svarbų ryšį tarp vandens ir sausumos maisto tinklų (Hoekman et al. 2011). Neigiamas uodų ir uodų trūklių populiacijų gausumo mažinimo efektas labiau matomas aukštesniuose trofiniuose lygmenyse (Jakob and Poulin 2016).

Tuo metu, kai *Bti* naudojimas pasaulyje didėjo eksponentiškai, tyrimų padedančių įvertinti jo poveikį aplinkai skaičius išliko nedidelis. Jungtinėje Karalystėje, Švedijoje ir Prancūzijoje tyrimai, aiškinantys šią problemą, buvo pradėti vykdyti po to, kai įdiegus *Bti* kontrolės priemonę pasirodė kontrastingi pastebėjimai, priverčiantys naujai ištirti tikrąjį *Bti* poveikį aplinkai (Duchet et al. 2014). *Bti* sukeltas poveikis maisto tinklams yra ypač svarbus

tada, kai dauguma vietovių yra saugomos nacionaliniu (paukščių rezervatai, gamtos rezervatai, nacionaliniai parkai), Europos (fauna-flora-gyventojas tinklas) ar pasauliniu (RAMSAR) lygmeniu. Pavyzdžiui, Švedijoje maždaug 40 % uodų kontrolės veikiamų teritorijų priklauso „Natura 2000“ saugomoms teritorijoms, o Vokietijoje tokių teritorijų yra net maždaug 90 % (Lagadic et al. 2016).

Šiuo metu pasauliniu mastu tebevykstantis bioįvairovės praradimas yra viena labiausiai diskutuojamų aplinkos problemų, kuri daro įtaką ekosistemų procesams (Mace et al. 2012). Žmonių populiacijos didėjimas, kuris yra susijęs su gyvenamųjų buveinių naikinimu, teršalų patekimu į gamtą, invazinių rūšių transportavimu ir klimato kaita, suintensyvino rūšių praradimą ir paspartino šeštąjį masinį rūšių išnykimą (Ceballos et al. 2015). Daugiausia dėmesio būdavo skiriama stuburinių populiacijų mažėjimui (Ceballos et al. 2017), tačiau entomofauna yra taip pat stipriai paveikta ir tik neseniai buvo pradėti formuluoti būdai jos išsaugojimui (Ecology et al. 2020). Daugiau nei 70 % skraidančių vabzdžių biomasės sumažėjimas buvo pastebėtas per 27 metų laikotarpį Vokietijos gamtos rezervatuose ir poveikis aukštesniems trofiniams lygmenims, įskaitant paukščius, kurie vabzdžiais maitina savo jauniklius, vis labiau diskutuojamas (Hallmann et al. 2017).

Nuo 2012 insekticidiniai produktai, kurie nėra naudojami agrokultūros kontekste, yra kontroliuojami biocidų reglamento EU 528/2012, o anksčiau 98/8/EC direktyvos. Pasak reglamento, biocidinis produktas su aktyvia medžiaga, kuriame papildomai gali būti ir kitų cheminių komponentų, turi būti vertinamas pagal jo poveikį žmonėms, gyvūnams ir aplinkai.

1.9. *B. thuringiensis israelensis* išlikimas gamtoje

Bti išlikimas priklauso nuo insekticidinio aktyvumo, toksinų, sporų ir jų poveikio grimzdančiai biomasei, kur *Bti* kurį laiką gali kauptis.

Panaudojus *Bti* produktus vandenyje, jų insekticidinis aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo jų galimybės pasiekti uodų ir mašalų lervas. Biologiniai, techniniai ir aplinkos faktoriai gali stipriai nulemti *Bti* liekamąjį poveikį.

Biologiniai faktoriai apima visus su tiksliniais vabzdžiais susijusius parametrus, tokius kaip jų rūšis arba vystymosi stadija. Pavyzdžiui, tik vandens paviršiuje besimaitinančios *Anopheles* lervos yra mažiau paveikiamos *Bti* negu *Culex* ir *Aedes* lervos, kurios maitinasi visame vandens gylyje bei pačiame dugne, nes panaudotas *Bti* preparatas greitai nugrimsta į dugną (Dominic Amalraj et al. 2000). Dėl to išliekamasis insekticidinis *Bti* aktyvumas nėra toks svarbus faktorius kontroliuojant *Anopheles* genties kraujasiurbių uodų gausumą. Vėlesnės

stadijos lervos stipriai sumažina savo maitinimosi aktyvumą ir yra žymiai didesnės nei tik pasiekusios lervos stadiją (Walker 1995), todėl pasiekti tą patį toksinį efektą yra reikalingas atitinkamai didesnis *Bti* kiekis.

Techniniai faktoriai (skirtingos produkto formos) buvo pritaikyti prie skirtingų produkto panaudojimo vietovių ar skirtingų tikslinių organizmų (Vilarinhos and Monnerat 2004). Kad padidinti išliekamąjį aktyvumą, kai kurie produktai suformuoti taip, kad *Bti* kaip veiklioji medžiaga išsiskirtų per tam tikrą laiką (Becker 2003). Dėl preparato nusėdimo į dugną pastebėta, kad padidinus *Bti* dozę, preparato veikimo laikas nepailgėjo (Ritchie et al. 2010).

Galiausiai, daug aplinkos faktorių veikia *Bti* išlikimą. Vandens drumstumas ir/arba teršalai padidina toksino degradaciją ir/arba adsorbciją ant vandenyje esančių organinių dalelių, taip sumažinant vabzdžių pasiekiamumą (Tetreau et al. 2012c). Taip pat prisideda UV spinduliuotė, aukšta temperatūra ir mažas kiekis dengiančiosios augmenijos (Christiansen et al. 2004).

Bakterijų sporuliacijos metu *Bti* sintetina šešis kristalinius toksinus: keturis skirtingus Cry toksinus (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa ir Cry11Aa) ir du Cyt toksinus (Cyt1Aa ir Cyt2Ba) (Ben-Dov 2014). Yra duomenų, kad toksiški kristalai po panaudojimo gamtoje gali būti aptinkami nuo savaikių iki metų, priklausomai nuo aplinkos sąlygų (Boisvert et al. 2001). Kristalai, imobilizuoti nuosėdose ar dumbliuose gali išsaugoti iki 90 % savo insekticidinio aktyvumo iki 22 dienų po *Bti* panaudojimo (Boisvert et al. 2001). Kad ir kaip bebūtų, toksinai aplinkoje išlieka nevienodai: Cyt1Aa toksinai po kontakto su lapų liekanomis išliko aktyvūs tik 4-8 dienas, o tuo tarpu Cry4Aa ir Cry4Ba toksinai išlikdavo iki 6 savaikių (Tetreau et al. 2012a). Šie išlikimo skirtumai galėtų lemti padidėjusias vabzdžių populiacijas dėl jas pasiekiančio ne pilno reikalingo toksinų mišinio (Paris et al. 2011b), tačiau tikslių duomenų nėra.

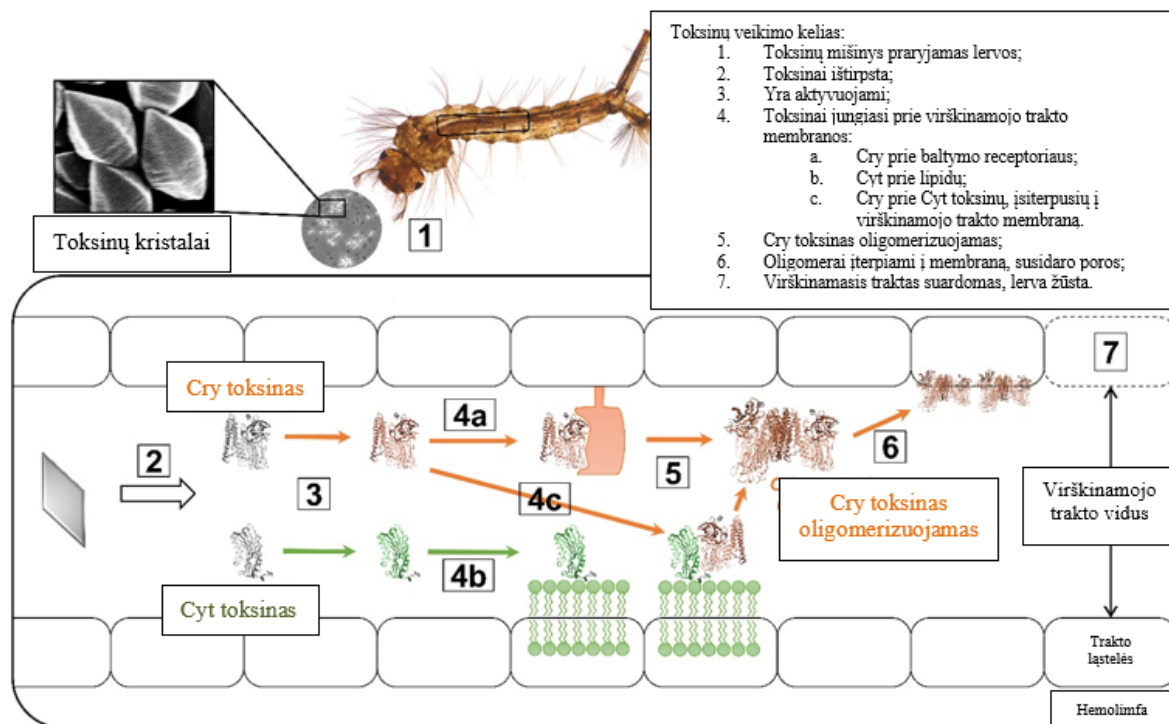
Sporos yra pakankamai atsparios ir gali būti aplinkoje aptinkamos kelis mėnesius po *Bti* preparato panaudojimo (De Respinis et al. 2006; Duchet et al. 2014), tačiau net ir naudojant preparatą nuolatos, nepastebimas žymus sporų išliekančių aplinkoje suminis didėjimas (Guidi et al. 2011). Kaip entomopatogenai *Bti* proliferuoja negyvuose vabzdžiuose (Duchet et al. 2014) ir kai kurie tyrimai parodė, sporos taip gali atsidurti kitose vietose, pavyzdžiui, užlietuose miškuose atsiradusiuose laikinuose vandens telkiniuose (Tilquin et al. 2008).

Prieš panaudojant preparatą *Bti* sterilizacija gamma-spinduliuote tam, kad panaikinti aktyvias sporas ir išvengti *de novo* sporuliacijos, panaudojus preparatą parodė 20-30 % sumažėjusį toksiškumą (Becker 2002).

1.10. *Bt* porūšio *israelensis* toksinų veikimo principas ir vabzdžių atsparumas

1.10.1. *B. thuringiensis israelensis* veikimo principas

Bti toksiškumas ir specifiskumas tikslinių vabzdžių lervoms yra susijęs su sudėtiniais Cry ir Cyt toksinais (3 pav.) (Vachon et al. 2012). Cry toksinų veikimo principas plačiai tiriamas jau kelis dešimtmečius. Lervai besimaitinant kristalai ištirpsta šarminėje vabzdžio žarnyno terpėje, taip išlaisvinami protoksinais, kurie suaktyvinami vabzdžio virškinamojo trakto proteazių (Rukmini et al. 2000). Cry toksinai tuomet prisikabina prie specifinių baltymų receptorių, esančių ant virškinamojo trakto ląstelių paviršiaus membranų, taip prasideda oligomerizacija ir ląstelių membranose suformuojamos poros, galiausiai lydimos virškinamojo trakto suardymo ir lervos žūties (3 pav.) (Vachon et al. 2012). Tuomet sporos pasiekia hemolimfą, kur jos pradeda atsigauti ir bakterija proliferuoja. Cyt toksinai taip pat reikalauja kristalo tirpimo ir protoksinių suaktyvinimo, tačiau jie tiesiogiai jungiasi prie ląstelių membranų lipidų ir taip vykdo savo citolitinį aktyvumą (3 pav.) (Butko et al. 1997). Kuomet tikslus Cyt1Aa toksiškumo mechanizmas buvo vis diskutuotinas (Soberon et al. 2013), nauji tyrimai parodė du galimus modelius, tai yra, poras formuojantis arba „ploviklio“ modelis, kur galimai susidaro dvi oligomerinės formos, perforuojančios virškinamojo trakto ląstelių membranas (Tetreau et al. 2020). Taip pat, Cyt toksinai atlieka ir membranos receptorių Cry toksinams vaidmenį, taip padidindami Cry toksiškumą (sinergetinis ryšys) (Soberon et al. 2013).



3 pav. Schematinis Cry (oranžinis) ir Cyt (žalias) *Bacillus thuringiensis* porūšio *israelensis* toksinų veikimo principas uodo lervos virškinamajame trakte (Vachon et al. 2012).

1.10.2. Vabzdžių atsparumas *B. thuringiensis israelensis*

Yra užfiksuota daug atsparumo atvejų prieš kai kuriuos *Bt* porūšius, tačiau atvejų, kai atsparumas atsiranda *Bt israelensis*, nėra (Tabashnik et al. 2009). Atsparumas sudėtiniais kitų *Bt* porūšių Cry toksinams taip pat buvo užfiksuotas ir laboratorijoje, ir preparato panaudojimo vietose (Janmaat and Myers 2003; Brevault et al. 2013). Tai sukėlė nerimą dėl atsiradusio potencialo vabzdžiams įgyti atsparumą ir prieš *Bti* toksinų mišinį. Atsparumo *Bti* tyrimai buvo atlikti laboratorijose su *Culex pipiens* (Saleh et al. 2003), *Cx. Quinquefasciatus* (Mittal et al. 2005) ir *Aedes aegypti* (Tetreau et al. 2012b). Po 30-ties vabzdžių kartų kontakto su *Bti* ir jų toksinų mišiniu laboratorijos sąlygomis buvo pastebėta, kad prireikė 3,5 karto didesnės *Bti* dozės, kad nužudyti atsparesnius vabzdžius taip pat efektyviai kaip prieš tai nepaveiktų kartų organizmus. Yra įmanoma pasiekti ypač didelį atsparumo lygį individualiems *Bti* Cry toksinams, kai tyrimas atliekamas su kiekvienu toksinu atskirai (Wirth et al. 2010, 2012; Stalinski et al. 2014). Gamtoje nepastebimas statistiškai patikimas atsparumas *Bti* toksinams yra dalinai susijęs su skirtingais Cry toksinų vabzdžių virškinamojo trakto receptoriais ir daugiausia siejamas su Cry ir Cyt toksinų sinergetiniu poveikiu (Soberon et al. 2013). Cyt toksino savybė atlikti receptoriaus funkciją Cry toksinams padeda išvengti tikslinių vabzdžių atsparumo (Pardo-Lopez et al. 2013).

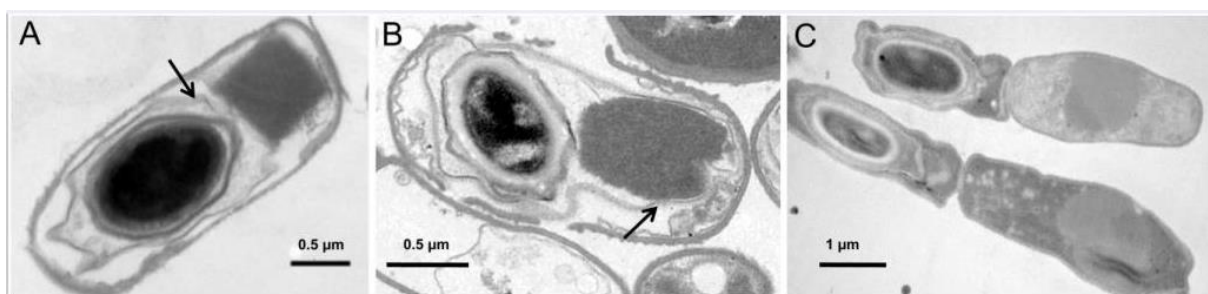
Yra šimtai tyrimų, daugumoje atliktų pačių vabzdžių kontrolės operatorių, kurių metu buvo tikrinamas atsparumas *Bti* preparatams jais paveiktose vietovėse kaip dalis šios kontrolės programos pagal Pasaulinės sveikatos organizacijos nurodymus. Jie visi parodė, kad nebuvo nustatyta statistiškai patikimo vabzdžių įgyto atsparumo *Bti*, išskyrus vieną atvejį, kur Kornelio universiteto (JAV) mokslininkai 2005 metais užfiksavo žymiai padidėjusią tiriamųjų *Cx. pipiens* uodų (surinktų Niujorko kanalizacijoje) populiacijos toleranciją *Bti* toksinams (Paul et al. 2005). Tačiau kitais tyrimais tokio atsparumo jau nebuvo pastebėta. Tokių programų metu atsparumas yra rutiniškai vertinamas pačių vabzdžių kontrolės operatorių, todėl iškyla dilema dėl šališkai vertinamų rezultatų ir šie tyrimai turėtų būti atlikti nepriklausomų tyrėjų bei informacija turėtų būti pateikiama viešai.

Atsparumo *Bti* nebuvimas paveiktų vietovių vabzdžių populiacijose, nepaisant intensyvaus preparato naudojimo paskutinius kelis dešimtmečius, gali būti paaiškinamas ir vabzdžių mutacijų dėl išlikimo kaina. Laboratorijoje *Bti* atsparių *Cx. pipiens* ir *Ae. aegypti* uodų lervos vystėsi ilgiau, patelės turėjo mažiau palikuonių, sumažėjo lėliukių išgyvenimo lygis, lyginant su nepakitusiomis kartomis. Nenaudojant preparato atsparumas išnykdavo jau po trijų *Cx. pipiens* ir šešių *Ae. aegypti* kartų (Saleh et al. 2003; Paris et al. 2011a).

Atsparumo išsivystymas gerokai sumažinantis vabzdžių kontrolės efektyvumą panaudojimo vietose mažai tikėtinas ir, jei iš išsivystytų, anksčiau minėtų vabzdžių atsparumo mutacijų sukeltos kitos problemos limituotų šio atsparumo plitimą kartomis. Ypač atsakingas vabzdžių atsparumo tikrinimas leistų nustatyti ankstyvą atsparumo atsiradimą, po kurio būtų galima petrauka nenaudojant *Bti* preparato ir/arba naudoti *Bti* preparatų formules kombinuotas su *Lysinibacillus sphaericus* (Caprio 1998).

1.11. *Bacillus thuringiensis* cry genų ekspresijos reguliacija

Bacillus thuringiensis sporas formuojanti bakterija yra genetiškai labai artima *B. anthracis* (juodligės sukėlėjas) ir *B. cereus* (žmogaus patogenas, plisdamas maistu sukelias gastroenteritą). Vienas iš pagrindinių *Bt* skirtumų nuo prieš tai minėtų bakterijų yra *Bt* gebėjimas stacionarios augimo fazės metu sintetinti įterptinius kristalus (4 pav.) (Vilas-Boas et al. 2007), kurie gali sudaryti iki 25 % sausos *Bt* ląstelių masės, kas parodo, kad šioje fazėje bakterija susintetina didžiulį kiekį kristalinių baltymų (kiekviena ląstelė turi susintetinti nuo 10^6 iki 2×10^6 δ -endotoksinų molekulių, kad suformuoti kristalą) (Palma et al. 2014).



4 pav. Skirtingos *Bt* kristalų sintezės vietos: (A) HD73 kamienas su tipiniu parasporalinio kristalo fenotipu: kristalas yra sintetinamas šalia sporos, motininės ląstelės dalyje; (B) YBT-020 kamienas su sporos-kristalo ryšio fenotipu: kristalas yra sintetinamas tarp egzosporijaus ir sporos dangalo; (C) LM1212 kamienas su atskirtu kristalo sintezės ir sporos formavimo fenotipu: kristalai ir sporos yra sintetinamos skirtingose ląstelių subpopuliacijose.

(Egzosporijus žymimas rodyklėmis) (Vilas-Boas et al. 2007)

Bacillus thuringiensis Cry baltymų ekspresijos mechanizmas apima daug faktorių: transkripcijos reguliacija, cry genų kopijų skaičius, cry genų mRNR stabilumas ir Cry baltymų akumuliacija ir kristalizacija (Baum and Malvar 1995). Daug tyrimų buvo atlikta per pastaruosius 25 metus, kurie parodė, kad *Bt* cry geno ekspresijos reguliacija yra labiau kompleksiška nei įprastai buvo manyta: kai kurie nuo sporuliacijos priklausomi cry genai pereinamosios fazės metu yra kontroliuojami pereinamosios fazės sigma faktoriaus SigH; kai kurie ne-sigma faktoriai prisideda prie cry genų ekspresijos reguliacijos; metaboliniai keliai galimai veikia Cry baltymų sintezę. Unikalaus *Bt* kamieno LM1212 tyrinėjimas pakeitė

mokslininkų požiūrį į *Bt* cry genų transkripcijos reguliaciją ir ekspresijos kelius (Deng et al. 2014).

1.11.1. Transkripcijos reguliacija

Pirminė genų ekspresijos reguliacija yra transkripcijos lygmenyje. Cry genai buvo suklasifikuoti į du tipus pagal jų transkripcijos reguliacijos mechanizmus: nuo sporuliacijos priklausomi cry genai, kontroliuojami sporuliacijai specifinių sigma faktorių SigK ir/arba SigE; nuo sporuliacijos nepriklausomi cry genai kontroliuojami vegetatyvinio SigA faktoriaus (Torres-Quintero et al. 2018). Be sigma faktorių, taip pat cry genų ekspresijos transkripciją veikia ir papildomi faktoriai, kurie nurodyti 2 lentelėje.

2 lentelė. Transkripcijos faktoriai dalyvaujantys cry genų ekspresijoje ((+) teigiama reguliacija; (-) neigiama reguliacija).

Genas	Sigma faktorius	Kiti transkripcijos faktoriai
<i>cry1a</i>	SigE, SigK	Spo0A (+); PDH E2 (+)
<i>cry2A</i>	SigE	Nežinoma
<i>cry2B</i>	SigE	Nežinoma
<i>cry3A</i>	SigA	Nežinoma
<i>cry4A</i>	SigE, SigK, SigH	PPK (+); Hpr/CcpA (-)
<i>cry4B</i>	SigE, SigK	Nežinoma
<i>cry6Aa2</i>	Nežinoma	ORF2 (-)
<i>cry8Ea1</i>	SigE, Sig, SigH	Nežinoma
<i>cry11A</i>	SigE, Sig, SigH	Spo0A (-)
<i>cry15A</i>	SigE	Nežinoma
<i>cry18A</i>	SigE, SigK	Nežinoma

1.11.2. Nuo sporuliacijos priklausomi cry genai

Bacillus rūšių sporuliacija prasideda nuo asimetriško ląstelės pasidalijimo į dvi dalis: motininę ląstelę ir į sporos pirmtaką. Modeliniame *B. subtilis* (*Bs*) organizme šis procesas yra laikinas ir erdviškai reguliuojamas RNR polimerazės sigma faktorių rinkinio: pagrindinis vegetatyvinis sigma faktoriai SigA ir SigH prieš asimetriškai ląstelei pasidalijant; SigE ir SigK motininėje ląstelėje; SigF ir SigG sporos pirmtake (Piggot and Hilbert 2004). Homologiški sigma faktoriai (SigA, SigH, SigE, SigK, SigF ir SigG) buvo aptikti ir *Bt*, kur atlieka panašų vaidmenį kaip ir *Bs* bakterijose (Wang et al. 2013). Taigi, yra bendrai spėjama, kad *Bt* sporuliacijos procesas yra apytikriai toks pat kaip *Bs*. Daugelis cry genų buvo apibūdinti kaip nuo sporuliacijos priklausomi, kadangi jų transkripcija yra dažniausiai reguliuojama motininei ląstelei specifinių sigma faktorių SigE ir SigK.

Daugelio cry genų transkripcija, įskaitant *cry1* (Yang et al. 2012), *cry4* (Federici et al. 2003), *cry8* (Du et al. 2012), *cry11*, *cry18* (Ibrahim et al. 2010), yra kontroliuojama ir SigE, ir SigK. Transkripcija yra inicijuojama SigE faktoriaus ankstyvojoje sporuliacijos stadijoje ir

toliau, vėlesnėse sporuliacijos stadijose, tęsiama SigK faktoriaus (Deng et al. 2014). Sėkminga šių dviejų motininei ląstelei specifinių sigma faktorių aktyvacija užtikrina nepertraukiamą ir stiprią cry genų transkripciją motininėje ląstelėje. Tai leidžia didžiulio kiekio Cry baltymų sintezę visos sporuliacijos metu. Mažumos nuo sporuliacijos priklausomų cry genų, tokių kaip cry15A ir cry2, transkripcija yra kontroliuojama tik vieno faktoriaus – SigE. Šie genai yra ekspresuojami palyginti trumpesnį laiko periodą negu cry genai priklausomi nuo abiejų SigE ir SigK faktorių (Aronson 2002).

Kai kurie nuo sporuliacijos priklausomi cry genai, pavyzdžiui, cry1 (Perez-Garcia et al. 2010), cry4, cry8 (Deng et al. 2014), cry11 (Gobatto et al. 2010), yra silpnai ekspresuojami vegetatyvinės augimo fazės pabaigoje. Ši ekspresija inicijuojama vegetatyvinio sigma faktoriaus SigH. Tačiau nėra vieno bendro modelio, kuris parodytų visų cry genų transkripcijos reguliaciją, nes tai priklauso nuo promotorių kombinacijos, įgalinančios įvairius ekspresijos kelius sporuliacijos metu.

1.11.3. Nuo sporuliacijos nepriklausomi cry genai

Geno cry3 transkripcija, inicijuojama vegetatyvinio augimo fazės metu, yra aktyvuojama pabaigoje eksponentinės fazės ir tęsiasi kelias valandas stacionarios fazės metu (Du et al. 2012). Kitaip nei nuo sporuliacijos priklausomi cry genai, kurie yra kontroliuojami sporuliacijai specifinių sigma faktorių, cry3 genų transkripcija yra vadovaujama vegetatyvinio SigA promotoriaus ir šių genų ekspresija yra stipresnė sporuliacijos defektą turinčiuose spo0A ir spo0F mutantuose negu laukiniame tipe (Deng et al. 2014). Genas cry3 buvo vienintelis nuo sporuliacijos nepriklausomų genų pavyzdys iki kol nebuvo atrastas neįprastas *Bt* kamienas LM1212.

LM1212 kamienas parodo unikalų fenotipą: populiacijoje matoma kristalų sintetinančių ląstelių ir sporas formuojančių ląstelių diferenciacija. Tokiu būdu kristalai yra sintetinami ląstelių subpopuliacijoje, kuri nesporuliuoja, o ne sporuliuojančių ląstelių motininės ląstelės dalyse (4 pav.) (Deng et al. 2014). LM1212 cry genų transkripcijos analizė atskleidė, kad šių genų promotoriai yra aktyvuojami pabaigoje eksponentinio augimo ir yra toliau ekspresuojami dar keletą valandų. Palyginimui, LM1212 cry genų promotorių aktyvumas yra labai žemas laukinio tipo *Bt kurstaki* HD73 kamiene augimo metu (Palma et al. 2014). Cry genai yra specifiskai transkribuoti į *Bacillus* rūšių nesporuliuojančių ląstelių subpopuliacijas, kur jos yra žymiai mažesnės nei LM1212 kamiene (5 pav.). Analizė taip pat parodė, kad LM1212 cry genai nėra kontroliuojami sporuliacijai specifinių sigma faktorių SigE ar SigK

(Deng et al. 2014). Taigi LM1212 cry genai yra nuo sporuliacijos nepriklausomi ir yra kontroliuojami neįprastų transkripcijos reguliacijos mechanizmų.

1.12. Cry genų ekspresiją reguliuojantys kiti faktoriai

DNR rišantis baltymas Spo0A yra pagrindinis perėjimo į sporuliaciją etapo reguliatorius *B. subtilis* bakterijose (Molle et al. 2003). Fosforilinta Spo0A (Spo0A-P) jungiasi prie DNR sekos, žinomos kaip „0A-box“, ir atlieka savo funkcijas kaip tam tikrų vegetatyviai ekspresuojamų genų represorius ir sporuliacijai specifinių genų aktyvatorius (Deng et al. 2014). Laikina ir erdvinė *B. thuringiensis* sporuliacijos proceso genų reguliacija yra labai panaši į vykstančią *B. subtilis*, Spo0A baltymai *Bt* ir *Bs* yra homologiniai. *In silico* analizės metu į priešingą pusę nuo cry genų (cry4A, cry4B, cry11A) *Bt israelensis* porūšyje nustatytos DNR sekos panašios į „0A-box“. Cry11A promotoriaus transkripcijos lygis yra aukštesnis spo0A mutantuose negu sigE mutantuose (Torres-Quintero et al. 2018). Tačiau „0A-box“ panaikinimas padidina cry11A operono ekspresiją, ko pasekoje jo aktyvumas būna žymiai aukštesnis sigE mutantuose negu spo0A mutantuose. Šie rezultatai iškėlė hipotezę, kad cry11A ekspresija yra slopinama Spo0A dėl jo jungimosi prie „0A-box“. Palyginimui, cry1Ac promotorius turi aukštesnį sigE mutantuose negu spo0A mutantuose, dėl ko spėjama, kad šis cry genas yra teigiamai reguliuojamas Spo0A baltymo eksponentinės ir pereinamosios fazės metu (Yang et al. 2012).

Piruvato dehidrogenazės (PDH) E2 subvieneto kompleksas bakterijoje yra plačiai paskirstytas ir katalizuoja piruvato oksidacinį dekarboksilinimą iki acetil-kofermento A, susiejant glikolizės kelius su trikarboksilinės rūgšties (TKR) ciklu. *Bt* bakterijose PDH E2 specifiskai jungiasi prie 200-300 bp sekų į priešingą pusę nuo cry1A geno promotoriaus. Šių sekų mutacijos sumažina ir E2 subvieneto jungimąsi ir cry1A promotoriaus transkripciją. Tokiu būdu PDH E2 gali teigiamai reguliuoti cry1A transkripciją specifiskai jungdamasis prie cry1A geno 5' nekoduojančio regiono (Deng et al. 2014). Šie tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad PDH E2 gali funkcionuoti kaip transkripcijos faktorius, nepriklausomai nuo savo fermentinio aktyvumo, bei matomas ryšys tarp katabolizmo ir Cry baltymų sintezės.

1.13. mRNR stabilumas

Genų ekspresijos pagrindinis lemiantis veiksnys yra mRNR stabilumas. *B. thuringiensis* cry genų mRNR gyvavimo laikas yra maždaug 20 min (Deng et al. 2014), o tai yra gerokai ilgiau nei *E. Coli* bakterijų mRNR (4-6 minutės) (Sazhenskiy et al. 2010). Aptarsime šį stabilumą suteikiančius mechanizmus.

Kartotinės atvirkščios sekos yra plačiai paplitusios ir aptinkamos daugumos cry genų (pvz., cry1A) 3' netransliuotame regione. Jos prisideda prie mRNR stabilizavimo ir gali suformuoti stabilią kilpinio kamieno struktūrą, kuri galimai apsaugo cry genų mRNR nuo egzoribonukleotinės degradacijos sukeltos 3'-5' egzoribonukleazijų, kurios yra neatsparios prieš RNR antrinę struktūrą (Wirth et al. 2000; Mathy et al. 2007).

Iš cry3A geno yra sugeneruojami du transkriptai: mažasis ir didysis transkriptai. Shine-Dalgarno (SD) seka esanti arti 5' -129 pozicijos yra atsakinga už cry3A mRNR stabilizavimą: ši seka (žymima kaip STAB-SD) neveikia tiesiogiai translacijos iniciacijos, tačiau gali sąveikauti su 16S rRNR 3' galu (Juarez-Hernandez et al. 2015). Dėl to buvo pasiūlyta idėja, kad 30S ribosominio subvieneto jungimasis prie STAB-SD sekos stabilizuoja mRNR veikdamas prevenciškai prieš 5'-3' egzoribonukleazijų sukeltą degradaciją (Juarez-Hernandez et al. 2015). Nepaisant to, neseniai buvo manoma, kad bakterijoje galėjo vykti mRNR degradacijos veikla tik 3'-5' kryptimi. Rnazės J1 5'-3' egzoribonukleazijų aktyvumo atradimas patvirtino originalią hipotezę: Rnazė J1 degraduoja cry3A mRNR -558 bp transkriptą 5'-3' kryptimi; ribosominis 30S subvienetas jungiasi prie cry3A mRNR STAB-SD sekos ir blokuoja 5'-3' egzoribonukleitinę Rnazės J1 progresą (9 pav.) (Mathy et al. 2007).

1.14. Cry baltymų produkcijos metabolinė reguliacija

Metaboliniai keliai, kurie aprūpina anglies komponentais, aminorūgštimis ir energija sporuliacijos ir didelių kiekių Cry baltymų sintezės procesus *Bt* bakterijose, yra tikimasi, kad gali būti esminis veiksnys reguliacijoje. Išties pastarieji tyrimai parodė, kad metabolinės reguliacijos mechanizmai yra įtraukti ir į transkripcijos, ir į translacijos lygmenis (Wang et al. 2013): tai apima proteazių ir aminorūgščių metabolizmo kontrolę, tiekimą iš anglies ir energijos šaltinių, metabolinių kelių reguliaciją ir modifikaciją, oksidacinio fosforilinimo ir energijos generavimo reguliaciją. Cry baltymų ekspresijos reguliacija per su metabolizmu susijusį sigma 54 faktorių ir, atitinkamai, polifosfatų metabolizmą bei gliukozės katabolinę represiją aprašyta toliau.

Sigma faktorius sigma 54 (taip pat vadinamas SigL) bakterijoje reguliuoja įvairius azoto ir anglies šaltinius bei energijos metabolizmo kelius. Mokslininko Deng tyrimų metu buvo nustatyta, kad sigma 54 mutacijos HD73 kamiene sumažino Cry1Ac baltymo sintezę LB terpėje (Deng et al. 2014). Teigiama sigma 54 įtaka kristalų gamybai yra transkripcijos lygmenyje ir galimai yra netiesioginė, kalbant apie nuo sigma 54 priklausomus metabolinius kelius. Pavydžiui, γ -amino sviesto rūgštis (GABA), kuri yra kontroliuojama sigma 54 faktoriaus ir reguliuojama GabR (Zhu et al. 2011), yra papildomas komponentas Krebso cikle

ir yra žinoma, kad jis koreliuoja su sporų ir parasporalinių kristalų formavimusi *B. thuringiensis*. Atitinkamai, GABA metabolizmas tampa žymiai aktyvesnis sporuliacijos metu (Wang et al. 2013). Kitas pavyzdys yra *acoABCL* operonas koduojantis acetoino dehidrogenazės kompleksą (Ali et al. 2001; Akiba et al. 2009): *acoABCL* yra žymiai sustiprinamas ir transkripcijos, ir transliacijos lygmenyje sporuliacijos metu (Wang et al. 2013). Mokslininko Deng tyrimų metu buvo patvirtinta, kad šis operonas yra kontroliuojamas sigma 54 faktoriaus ir yra suaktyvinamas AcoR (Deng et al. 2014). Kad ir kaip bebūtų, sigma 54 faktorius nedaro įtakos Cry1Ac transkripcijai ir produkcijai sporuliacijos terpėje, kas parodo, kad efektas metaboliniams Cry baltymų produkcijos keliams priklauso nuo augimo sąlygų.

Kai kurios mineralinės maisto medžiagos, ypač neorganinis fosfatas, yra svarbus Cry baltymų gamybai *Bt* (Kurt et al. 2005). Polifosfatai yra sintetinami polifosfatų kinazės iš terminalinio ATP fosfato ir gali būti endopolifosfatazių ir egzopolifosfatazių degraduoti iki neorganinio fosfato (Doruk et al. 2013). Mokslininkas Doruk su kolegomis nustatė, kad perteklinė polifosfato kinazės ekspresija *Bt israelensis* porūšyje padidino tarpląstelinę polifosfatų koncentraciją ir Cry baltymų gamybą. Taip pat buvo nustatyta, kad *sigE* transkripcija buvo stimuliuojama kamienuose, kurie pertekliška ekspresavo polifosfato kinazę (Doruk et al. 2013). Tokiu būdu, per *SigE*, polifosfatinio metabolizmo pasikeitimai galimai veikia Cry baltymų gamybą *Bt*.

Gramteigiamose bakterijose daugelio katabolinių operonų katabolinis slopinimas apima fosfo-nešiklį baltymą HPr, katabolinės kontrolės baltymą CcpA ir *cis* katabolinius atsako elementus (Kant et al. 2009). Fosforilintas HPr jungiasi prie CcpA tam, kad suformuoti kompleksą su aukštu DNR rišančiu afiniškumu. Fosforilintas HPr-CcpA kompleksas moduliuoja genų-taikinių transkripciją jungdamasis prie *cis* katabolinių atsako elementų (Khan and Banerjee-Bhatnagar 2002). Gliukozė slopina *Bti cry4A* geno ekspresiją mRNR lygmenyje ir fosforilintas HPr-CcpA *Bti* kompleksas slopina *cry4A* transkripciją specifiskai jungdamasis prie 15 bp *cis* katabolinio atsako sekos, taip persidengiant su *cry4A* promotoriaus elementu (Kant et al. 2009). Gliukozės katalitinis *cry4A* slopinimas yra panaikinimas *cis* katabolinio atsako elementų sekų specifinėmis mutacijomis ir HPr-S45A mutantuose, kurie produkuoja nefosforilintą HPr (Khan and Banerjee-Bhatnagar 2002): abu šie veiksniai padidina *cry4A* promotoriaus aktyvumą. Taigi, Cry baltymų sintezė *Bt israelensis* porūšyje yra kontroliuojama gliukozės katabolinio slopinimo tarpininkaujant HPr-CcpA .

1.15. Cry baltymų kristalizacija

Didelio kiekio baltymų sukaupimas reikalauja stabilių baltymų gamybos arba bent jau mechanizmo, kuris padėtų išvengti pagamintų baltymų degradacijos. *Bt* daugiausiai Cry baltymų produkuoja stacionarios fazės metu, kai yra susintetinami dideli kiekiai įvairių proteolitinių fermentų (Akiba et al. 2009). Tai reiškia, kad *Bt* privalo turėti mechanizmus, padedančius išvengti susintetintų Cry baltymų proteolizės. Viena iš strategijų yra formuoti kristalus atsparius proteolitiniams fermentams (Deng et al. 2014).

Daugumos Cry baltymų (pvz., Cry1) masė yra tarp 130 ir 140 kDa. Dauguma šių didelių Cry baltymų gali spontaniškai formuoti kristalus nepriklausomai nuo šeimininko-bakterijos. Cry baltymų C-terminaliniai galai yra vadinami kristalizacijos domenais, kadangi nenulemia toksiškumo, tačiau yra būtini kristalo formavimuisi. Kiti mažesnės masės Cry baltymai (pvz., Cry11) neturi C-terminalinio kristalizacijos domeno kitaip nei anksčiau minėti baltymai. Didelio kiekio šių Cry baltymų kaupimas arba kristaliacija įprastai reikalauja papildomų baltymų, kurie koduojami genų esančių tame pačiame operone (Agaisse and Lereclus 1995; Barboza-Corona et al. 2012). Šie papildomi baltymai dažniausiai yra nedideli, neturi toksiškumo ir nėra pagrindiniai kristalo komponentai. To pasekoje, jie yra vadinami antriniais baltymais ar baltymais padėjėjais, kurie apima P19 ir P20 baltymus, koduojamus p19 ir p20 genų cry11A operone (Torres-Quintero et al. 2018), Orf1 ir Orf2 baltymus, koduojamus orf1 ir orf2 genų cry2A operone (Staples et al. 2001) ir ORF2 (60 k) baltymą koduojamą orf2 geno cry19A operone (Barboza-Corona et al. 2012).

P19 ir Orf1 funkcija Cry baltymų sintezėje ir kristalizacijoje nėra aiški. Orf2 yra reikalingas Cry2A kristalizacijai (Staples et al. 2001). Orf2 ir Cry2A išgryninami kartu, o tai parodo esamą ryšį tarp šių baltymų (Barboza-Corona et al. 2012). Išties Orf2 tarnauja kaip kristalizacijos faktorius sąveikaudamas su Cry2A baltymu, galimai veikdamas kaip pamatai (Staples et al. 2001). ORF2 (60 k) yra labai panašus į 130 kDa Cry baltymo C-terminalinį domeną ir yra svarbus Cry19A kristalizacijai, kuris pats yra panašus į didžiulio Cry baltymo N-terminalinį domeną (Gobatto et al. 2010; Barboza-Corona et al. 2012). Yra įvairių įrodymų, kad ORF2 (60 k) funkcionuoja pirmiausia kaip Cry baltymų C-terminalinis kristalizacijos domenas (Barboza-Corona et al. 2012). Panašios genų organizacijos yra taip pat aptinkamos kituose cry operonuose, tokiuose kaip cry10Aa, cry39Aa ir cry40Aa (de Maagd et al. 2003; Barboza-Corona et al. 2012).

P20 baltymas gali padidinti įvairių insekticidinių kristalinių baltymų, tokių kaip Cyt1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry4Aa, Cry11Aa ir sutrumpinto Cry1C, išeigą ir/arba kristalizaciją

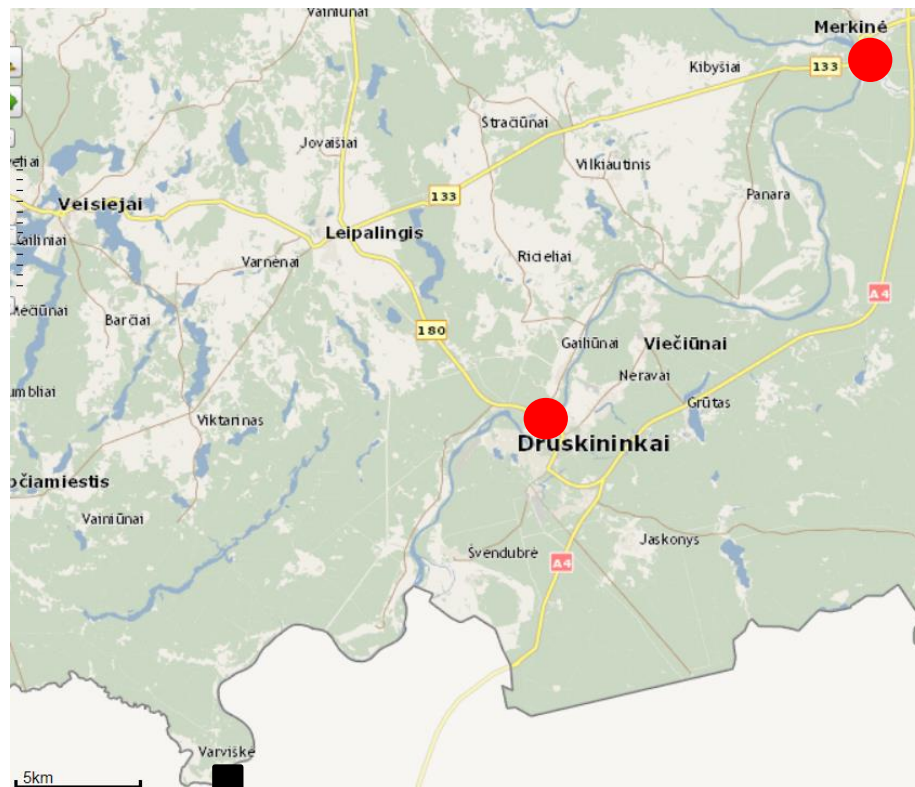
(Shao et al. 2001; Park et al. 2007). Tai taip pat gali padidinti *Bt* insekticidinio baltymo Vip3A ir *B. sphaericus* dvigubo BinA-BinB toksino ekspresiją (Park et al. 2007). P20 efektas Cyt1A ekspresijai buvo suprastas po eilės mokslininko Whiteley ir jo grupės tyrimų su *E. coli* jau prieš kelis dešimtmečius: P20 baltymas nedaro įtakos transkripcijai ar mRNR stabilumui, nereguliuoja cyt1A transliacijos iniciacijos (Adams et al. 1989; Visick and Whiteley 1991); tarp P20 ir Cyt1A yra baltymas-baltymas ryšys ir tai nutinka tik su susidarančiu Cyt1A peptidu; P20 nėra reikalingas *E. coli* kamienų, defektuotų proteolitiname aktyvume, Cyt1A didelių kiekių gamybai (Visick and Whiteley 1991; Park et al. 2007). Šie tyrimai parodė, kad P20 galimai veikia kaip molekulinis šaperonas, kuris padeda Cyt1A suformuoti proteazėms atsparius kristalus. Kiti tyrimai šią hipotezę palaiko ir pateikia daugiau detalių: *Bt* bakterijose Cry1Ac baltymas yra iš esmės produkcijos metu degradavęs, ypač baltymų sintezės metu prieš kristalizaciją. P20 įvedimas gerokai padidina Cry1Ac produkciją ir tai buvo pasekmė atsiradusios susidarančių peptidų apsaugos (Shao et al. 2001).

Unikalaus kamieno LM1212 atradimas ir charakterizacija išplėtė parasporalinių kristalų fenotipo *Bt* supratimą. Šiame kamiene kristalai nėra produkuojami sporuliuojančių ląstelių motininėje ląstelėje, tačiau tik nesporuliuojančių ląstelių subpopuliacijoje (Deng et al. 2015). Kristalo ir sporos atskyrimas į skirtingas LM1212 ląstelių populiacijas yra ląstelių diferenciacijos pasekmė, susijusi su anksčiau neapibūdintu cry geno transkripcijos modeliu. Iš tiesų, LM1212 cry genai yra transkribuojami tik nesporuliuojančių ląstelių subpopuliacijoje, vadinamose kristalus produkuojančiose ląstelėse (Deng et al. 2014).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tiriamosios medžiagos rinkimas

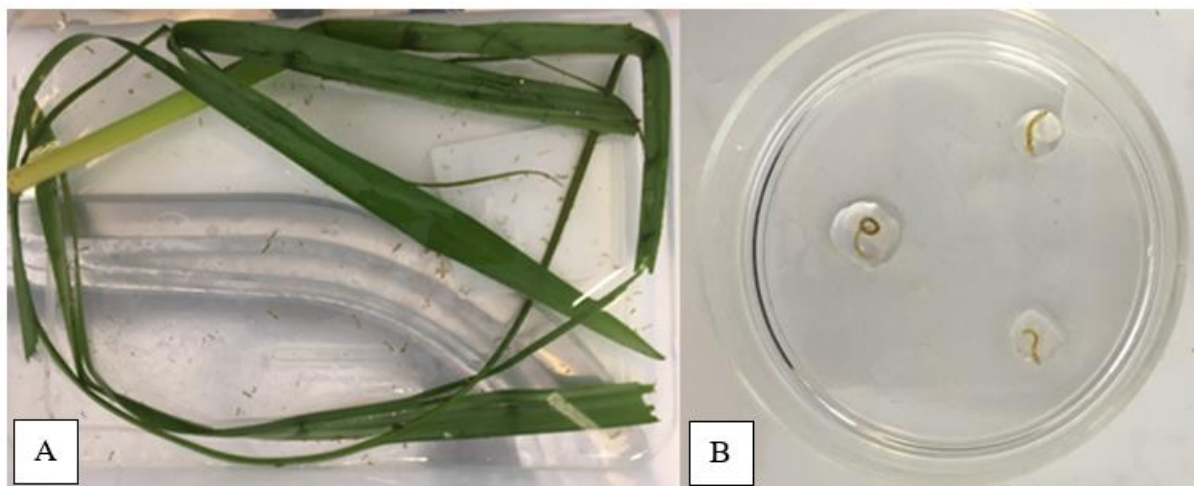
Preparatas VectoBac 12AS Lietuvos teritorijoje į Nemuno upę pilamas prie Lietuvos sienos su Baltarusija – Varviškėse ($53^{\circ}54'29''$ š. pl. $23^{\circ}47'38''$ r. ilg.) (7 pav.). Preparatas naudojamas siekiant sumažinti upinių mašalų lervų gausumą, o šios gyvena ant vandens augalų, todėl pastarieji su ant jų esančiais tiriamaisiais organizmais renkami dviejose vietose – Nemune ties Druskininkais ($54^{\circ}1'10''$ š. pl. $23^{\circ}58'20''$ r. ilg.) ir ties Merkinė ($54^{\circ}09'50''$ š. pl. $24^{\circ}11'10''$ r. ilg.) (7 pav.). Šios vietovės yra atitinkamai 21 km ir 56 km nutolusios (skaičiuojant upės vaga) pasroviui nuo biologinio preparato panaudojimo vietos.



7 pav. Medžiagos rinkimo vietos Juodas kvadratas – VectoBac 12AS preparato pylimo į Nemuną vietą (Varviškė); raudoni taškai – mėginių ėmimo vietos (Druskininkai ir Merkinė) ([http\\www.maps.lt](http://www.maps.lt))

Vandens augalai (*Glyceria maxima*), išrauti upės srovėje 0,5–1 m gylyje su ant jų esančiais organizmais imami į sterilų maišelį. Mėginiai pervežami į laboratoriją, kur inde skalaujami vandeniu, taip lervos atsikabina nuo augalo, o lėliukės nurenkamos pincetu (8 pav.). Tada pincetu jos surenkamos į atitinkamai pažymėtus mėgintuvėlius su 96 % etanolio.

Upinių mašalų (Diptera: *Simuliidae*) (9 pav.), uodų trūklių (Diptera: *Chironomidae*) ir apsiuvų lervos (*Trichoptera*) ir lėliukės dažniausiai atpažįstamos ir atrenkamos pagal plika akimi matomus morfologinius požymius ar judėjimo vandenyje ypatumus, esant mažesnėms lervoms ir lėliukėms – naudojamas šviesinis mikroskopas „MOTIC“.



8 pav. Surinkti vandens augalai skalaujami vandeniu ir pincetu atrenkamos upinių mašalų, apsiuvų ir uodų trūklių lervos bei upinių mašalų lėliukės: A – augalo lapai ir nuskalauti hidrobiontai; B – atrinktos uodų trūklių lervos (asmeninio archyvo nuotrauka)



9 pav. Upinių mašalų lervos ir lėliukės ant monažolės *Glyceria maxima* lapo (dr. R. Bernotienės nuotrauka)

Nuo 2019.05.06 iki 2019.07.13 iš Nemuno tyrimams paimti 109 mėginiai, kiekviename iš jų buvo tiriama po 2 upinių mašalų lervas, 2 lėliukes, 2 uodų trūklių lervas. Apsiuvų lervos buvo aptiktos ne visuose mėginiuose, nes apsiuvų lervos Nemune aptinkamos periodiškai tik tam tikrais laikotarpiais, tad jos buvo tirtos tik 2019.05.06 dienos mėginyje. Praėjus 8 dienoms po preparato panaudojimo upinių mašalų (*Simuliidae*) lervų ir lėliukių nebuvo aptikta, nes jos neišgyveno po VectoBac 12AS biologinio preparato panaudojimo (3 lentelė), todėl nepavyko jų ištirti. Kai kuriomis birželio mėnesio dienomis (3 lentelė) Nemune nebuvo aptikta upinių mašalų lėliukių, tai susiję su natūraliais šių vabzdžių vystymosi ciklais, tad buvo tirtos tik upinių mašalų lervos.

3 lentelė. Surinktų Nemune ir ištirtų vabzdžių lervų ir lėliukių skaičius.

Data	Dienos po preparato panaudojimo	Tirta <i>Simuliidae</i> lervų	Tirta <i>Simuliidae</i> lėliukių	Tirta <i>Chironomidae</i> lervų	Tirta <i>Trichoptera</i> lervų
2019.05.06	*Prieš	8	6	-	6
2019.05.09	panaudojimą	12	12	12	-
2019.05.16	3 dienos	6	12	12	-
2019.05.21	8 dienos	-	-	12	-
2019.05.27	14 dienų	12	12	10	-
2019.06.04	21 diena	2	-	6	-
2019.06.14	1 mėnesis	12	-	12	-
2019.06.30	1,5 mėnesio	8	2	10	-
2019.07.13	2 mėnesiai	12	12	12	-

2.2. Biologinio preparato efektyvumo ir *Bti* gyvybingumo jame tikrinimas po šaldymo

Šaldyto VectoBac 12AS preparato veiksmingumas buvo tikrinamas po 1 mėnesio preparato laikymo -20°C atšildžius preparatą ir panaudojus jį prieš Gamtos tyrimų centre (GTC) auginamas *Culex pipiens* uodų lervas. Įvairių ūgių GTC auginamos *C. pipiens* uodų lervos (po 20 vnt.) buvo perkeltos į du vienodus plastikinius indus su vandeniu, atšildytas biologinis preparatas buvo supiltas į vieną iš indų su uodų lervomis. Kitas indas su uodų lervomis buvo naudojamas kaip kontrolinis. Preparato kiekis buvo apskaičiuotas taip, kaip nurodyta priede Nr.3. pagal vandens paviršiaus plotą tiriamame inde. Praėjus 24 val. po preparato panaudojimo buvo stebima uodų lervų būklė (gyvas ar negyvas) abiejuose induose.

Bti gyvybingumas biologiniame preparate po šaldymo buvo tikrinimas taip kaip aprašoma poskyryje 2.7., tik vietoje lervų pirmajame punkte naudojamas 1 mln. kartų su distiliuotu vandeniu atskiestas po 1 mėnesio šaldymo atšildytas preparatas.

2.3. DNR išskyrimas

Bacillus thuringiensis israelensis DNR išskyrimui buvo naudojami du būdai. Pirmajam naudojamas „Zymo Research“ „Quick-DNA™ Microprep Kit“ rinkinys (katalogo numeriai D3020 ir D3021). Gryninimo eiga:

1. 1,5 ml talpos mėgintuvėlyje sumaišoma 50 μl biologinio preparato su 200 μl lizavimo tirpalu. Maišoma 4-6 sekundes purtant staline purtykle. Mišinys inkubuojamas 5-10 minučių kambario temperatūroje;

2. Mišinys perkeliamas į „Zymo-Spin™ IC“ kolonėlę, įdėtą į surinkimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama 1 minutę 10000xg greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas iš surinkimo mėgintuvėlio;
3. „Zymo-Spin™ IC“ kolonėlė perkeliama į naują švarų surinkimo mėgintuvėlį. Į kolonėlę įpilama 200 µl DNR plovimo tirpalo. Centrifuguojama 1 minutę 10000xg greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas iš surinkimo mėgintuvėlio;
4. Į kolonėlę įpilama 500 µl genominės DNR plovimo tirpalo. Centrifuguojama 1 minutę 10 000 xg greičiu. Pratekėjęs tirpalas pašalinamas iš surinkimo mėgintuvėlio;
5. Kolonėlė perkeliama į naują švarų 1,5 ml talpos mėgintuvėlį. Į kolonėlę įpilama 10 µl eliacijos tirpalo. Inkubuojama kambario temperatūroje 2-5 minutes. Centrifuguojama didžiausiu greičiu 30 sekundžių;
6. Išgryninta DNR tolimesniems tyrimams saugoma –20 °C temperatūroje.

Antruoju metodu DNR išskyrimui pasirinktas metodas naudojant 4M amonio acetatą (pH 7,5) ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) (Sambrook and Russell 2001):

1. Į sunumeruotus mėgintuvėlius įdedama tiriamoji medžiaga (lerva, lėliukė ar bakterijų kolonijos tepinėlis);
2. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po:
 - a. 250 µl SET tirpalo;
 - b. 7 µl SDS (konc. 20 %);
 - c. 5 µl proteinazės K (konc. 20 mg/ml);
3. Mėgintuvėliai gerai supurtomi ir trumpai nusukami staline centrifuga, kad neliktų tirpalo lašelių ar mėginio dalelių ant dangtelio ar mėgintuvėlio sienelių;
4. Laikoma 56 °C vandens vonelėje apie 24 valandas;
5. Vėliau kiekvienas mėginys užpilamas 250 µl 4 M amonio acetato;
6. Gerai sumaišoma staline purtykle ir laikoma 60 minučių kambario temperatūroje nuolatos purtant;
7. Mėginiai sukami 13 000 rpm greičiu centrifugoje 10 minučių;
8. Supernatantas perpilamas į švarius 1,5 ml talpos pažymėtus mėgintuvėlius (nenaudoti automatinės pipetės);
9. Kiekvienas supernatantas užpilamas 1 ml 100 % etanolio. Labai gerai išmaišoma purtant staline purtykle;
10. Mėgintuvėliai centrifuguojami 13 000 rpm greičiu 15 minučių;
11. Supernatantas pašalinamas atsargiai nupilant, kad neprarasti nusėdusios DNR;

12. Į mėgintuvėlį plovimui užpilama 1 ml 70 % etanolio ir iškart nusiurbama (atsargiai, neįsiurbiant nusėdusios DNR);
13. Mėginiai paliekami džiūti kambario temperatūroje per naktį;
14. Užpilama po 50 µl ddH₂O ir sumaišoma staline purtykle.

DNR išskyrimui iš biologinio preparato VectoBac 12AS naudojamas pirmasis metodas, o DNR išskyrimui iš tiriamųjų lervų ir lėliukių mėginių naudojamas antrasis.

DNR koncentracija mėginiuose matuojama „NanoDrop™ 2000/2000c“ spektrofotometru (Thermo Scientific™).

2.4. Polimerazės grandininė reakcija

Bacillus thuringiensis israelensis bakterijų aptikimui tiriamuosiuose mėginiuose buvo atrinktos trys poros pradmenų, kuriems buvo optimizuotos vienodos PGR sąlygos ir reakcijos mišinio reagentai bei jų kiekiai (žr. rezultatų skyriuje 4 ir 5 lenteles):

1. 1492r (5' TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') ir 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') (Tenssay et al. 2011);
2. CRY4F (5' GTT TTC AAG ACC TAA TAA TAT AAT ACC 3') ir CRY4R (5' CGG CTT GAT CTA TGT CAT AAT CTG T 3') (Guidi et al. 2013);
3. CRY11F (5' TTA GAA GAT ACG CCA GAT CAA GC 3') ir CRY11R (5' CAT TTG TAC TTG AAG TTG TAA TCC C 3') (Elleuch et al. 2015).

Teigiamai kontrolei naudojama *Bacillus thuringiensis israelensis* DNR išskirta iš biologinio preparato VectoBac 12AS, neigiamai kontrolei naudojamas vanduo be nukleazų (Thermo Scientific™).

2.5. Elektroforezė

Elektroforetiniam rezultatų vertinimui naudojamas 1xTBE tirpalas ir 1,5 % agarozės gelis su etidžio bromidu. Po 5 µl kiekvieno mėginio PGR produkto maišoma su 1 µl dažo („DNA Gel Loading Dye (6X)“ (Thermo Scientific™)). Susidariusio PGR produkto dydžio vertinimui gelyje naudojamas 100-1000 bp ilgio standartas („FastRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use“ (Thermo Scientific™)).

2.6. *Bti* išlikimo uodų lervose laboratorinėmis sąlygomis tyrimas

Bti išlikimo uodų lervose *Culex pipiens* laboratorinėmis sąlygomis tyrimas:

1. Sterilus plastikinis indas pripildomas vandeniu;

2. Į vandenį įdedama 12 vnt. III ūgio *C. pipiens* uodų lervų indas su uodų lervomis laikomas 20-22 °C temperatūroje, esant 14 val./10 val. šviesos/tamsos režimui,;
3. Po paros lervos išimamos ir fiksuojamos 96 % etanolyje. Šios lervos naudojamos kaip neigiama kontrolė;
4. Parengiamas indas su vandeniu ir naujomis III ūgio *C. pipiens* lervomis, kaip aprašyta 1 ir 2 punktuose;
5. Pagal vandens paviršiaus plotą (tyrimo metu paruošta 0,06 m²) apskaičiuotas naudojamo VectoBac 12AS (130 µl/m², žiūrėti priedą nr.3) kiekis (pagal mūsų tyrimo metu naudotą indą 7,8 µl) supilamas į tą patį indą su vandeniu ir uodų lervomis;
6. Po vienos paros lervos surenkamos, 3 lervos fiksuojamos 96 % etanolyje, 3 lervos atskirai šaldomos –20 °C temperatūroje trijuose steriliuose 1,5 talpos mėgintuvėliuose. Išrenkamos visos negyvos lervos. Po dviejų dienų į vandenį dedama 12 vnt. naujų III ūgio *C. pipiens* uodų lervų;
7. Mėginiai tokiu pačiu būdu renkami praėjus 4, 8, 11, 14, 17, 21 ir 27 parų po pirmojo biologinio preparato panaudojimo, kiekvieną kartą (išskyrus po 27 parų) iš vandens išrenkamos visos prieš tai įleistos uodų lervos. Į vandenį vėl įleidžiama 12 vnt. naujų III ūgio *C. pipiens* uodų lervų;
8. Lervų, fiksuotų etanolyje, DNR išskiriama naudojant 4M amonio acetatą (žr. 2.3. poskyrį), *Bti* aptikimui naudojama PGR;
9. *Bti* gyvybingumas tikrinimas pagal 2.7. poskyrio eigą. Šis tyrimas atliktas Gamtos tyrimų centre.

2.7. *Bti* gyvybingumo lervose tikrinimas

Bti bakterijų gyvybingumas surinktose uodų lervose tikrinamas tokia eiga:

1. Po dvi uodų lervas, kurios buvo užšaldytos –20 °C, surinktas iš eksperimentų, kurie PGR tyrime buvo nustatyti kaip teigiami, užpylus 100 µl vandens be nukleazių (Thermo Scientific™) ir homogenizavome steriliu plastikiniu trintuvu;
2. Mėginiai uždarytuose mėgintuvėliuose pakaitinami 50 °C temperatūroje 45 minutes nuolat purtant, taip žūsta sporų neformuojančios bakterijos;
3. 55 mm skersmens Petri lėkštelės su mėsos-peptono agaru atidengus 10 min laikomos po UV lempa laminarinėje traukos spintoje;
4. Po kaitinimo imama po 50 µl paruošto mėginio ir steriliu plastikiniu špateliu tolygiai išsklaidoma Petri lėkštelėje;

5. Paruoštos Petri lėkštelės 7 dienas inkubuojamos 28 °C temperatūroje;
6. Po 7 dienų steriliomis kilpelėmis surenkami kolonijų tepinėliai. Šis tyrimas atliktas Gyvybės mokslų centre;
7. Iš susidariusių kolonijų surinktos medžiagos DNR išskirta taikant metodą su 4M amonio acetatu (žr. 2.3. poskyrį), *Bti* patvirtinimui buvo naudojama PGR.

3. REZULTATAI

3.1. PGR optimizavimas *Bti* aptikimui

Eksperimentų metu buvo išbandyti pradmenys ir optimizuotos naudojamiems pradmenims (1492r, 27f, CRY4F, CRY4R, CRY11F, CRY11R) tinkamos PGR sąlygos (4 lentelė) ir reakcijos mišinys (5 lentelė):

4 lentelė. *Bti* bakterijų aptikimui naudotų pradmenų (1492r, 27f, CRY4F, CRY4R, CRY11F, CRY11R) optimizuotos PGR reakcijos sąlygos:

TEMPERATŪRA	TRUKMĖ	CIKLŲ SKAIČIUS (KARTAIS)
94 °C	3 min	1
94 °C	1 min	25
50 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	1

5 lentelė. *Bti* bakterijų aptikimui naudojamas PGR mišinys:

REAGENTAI	KIEKIS (μl) VIENAM MĖGINIUI
DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™)	12,5
Vanduo be nukleazų (Thermo Scientific™)	8,5
Pradmuo (atvirkštinis) (10 pmol)	1
Pradmuo (tiesioginis) (10 pmol)	1
Išskirta DNR	2

Pradžioje naudojome tris pradmenų poras: 1492r ir 27f, CRY4F ir CRY4R, CRY11F ir CRY11R. Gautus PGR produktus sekvenavome ir gautas sekas palyginome su „GenBank“ duomenų bazėje esančiomis sekomis: 1492r ir 27f produktas atitiko *Bacillus cinereus* 16S rRNA geno fragmentą (98.6 - 99.1 % panašumas), todėl šios pradmenų poros tolimesnėje tyrimo eigoje nebenaudojome, nes siekėme aptikti tik *Bti* bakterijas. PGR produktas gautas naudojant pradmenis CRY11F ir CRY11R 100 % atitiko *Bti* insekticidinio kristalinio baltymo Cry11Aa (cry11Aa), o CRY4F ir CRY4R 100 % atitiko *Bti* insekticidinio kristalinio baltymo Cry4Ba geno seką.

Pagal gautus rezultatus tolimesniems tyrimams galėjome naudoti vieną iš pastarųjų dviejų pradmenų. Tyrimams pasirinkta CRY4F ir CRY4R pradmenų pora, ją naudojant padauginamas apie 300 bp ilgio *Bti* insekticidinio kristalinio baltymo geno fragmentas.

3.2. VectoBac 12AS efektyvumo ir *Bti* gyvybingumo jame tikrinimas po šaldymo

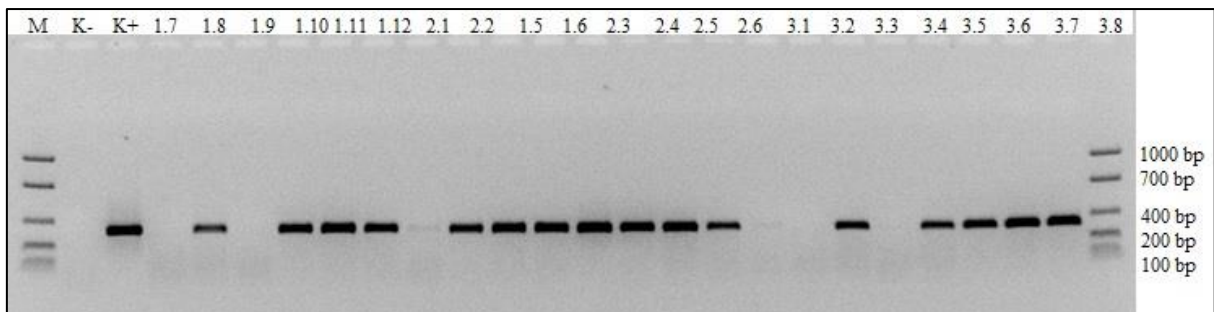
Šaldyto VectoBac 12AS preparato veiksmingumas po 1 mėnesio biologinio preparato laikymo -20°C atšildžius preparatą ir panaudojant jį prieš Gamtos tyrimų centre auginamas *Culex pipiens* uodų lervas nepakito – praėjus 24 valandoms po biologinio preparato panaudojimo žuvo visos preparatu paveiktos uodų lervos. Kontrolinėje grupėje visos 20 uodų lervų išliko gyvos.

Atskiedus šaldytą preparatą 1 mln. kartų ir atlikus sėjimą Petri lėkštelėje, nustatyta, kad *Bti* gyvybingumas išliko – bakterijos formavo kolonijas. Remdamiesi šiais duomenimis surinktą medžiagą (uodų lervas) galėjome fiksuoti šaldant -20°C temperatūroje tolimesniems *Bti* gyvybingumo tyrimams ir visus sėjimus atlikti vienu kartu.

3.3. *Bti* aptikimas po biologinio preparato panaudojimo Nemune

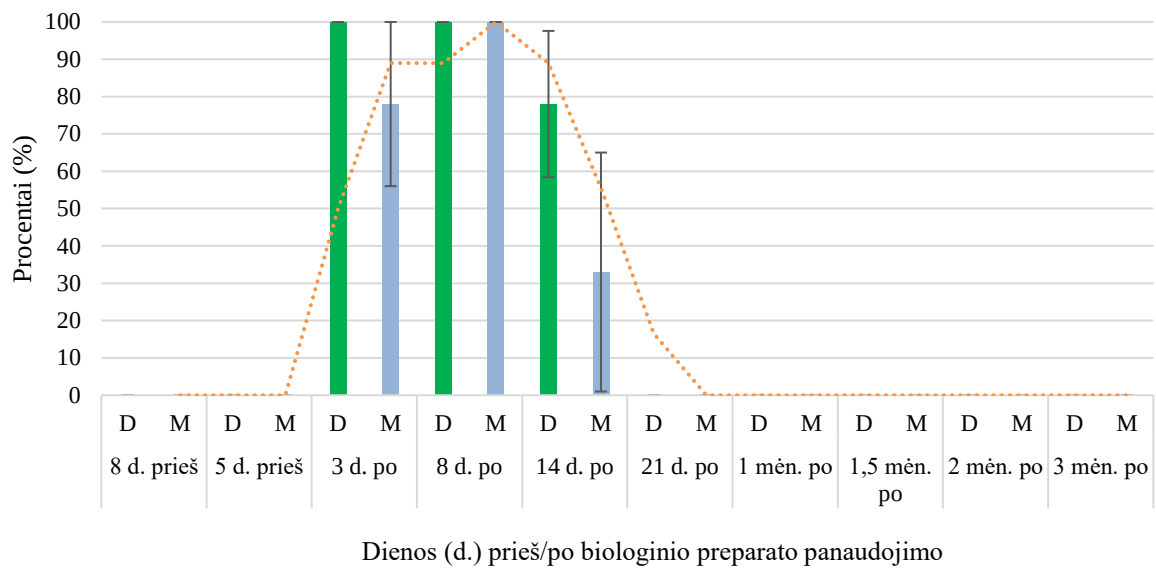
Nuo 2019.05.06 iki 2019.07.13 iš Nemuno tyrimams paimtuose 109 mėginiuose išskirtos DNR koncentracija buvo nuo 12,7 iki 806,7 ng/ μl (žr. 1 priedą).

Visų mėginių DNR buvo amplifikuota PGR metu su CRY4F ir CRY4R pradmenų pora ir reakcijos produktai įvertinti elektroforetiškai agarozės gelyje (10 pav.).



10 pav. Mėginių iš Nemuno DNR PGR mėginių elektroforetinis įvertinimo agarozės gelyje pavyzdys („K-“ – neigiama, „K+“ teigiama kontrolė, „M“ – ilgio standartas, mėginių numeriai kaip nurodyta priede Nr.1) (asmeninio archyvo nuotrauka)

Patikrinus 109 mėginius, gauti rezultatai parodė, kad mėginiuose surinktuose prieš biologinio preparato panaudojimą (Nemune ties Druskininkais, Merkinė ir Alytumi) *Bti* neaptikta nei vienoje tirtų hidrobiontų grupėje. *Bti* buvo aptinkama mėginiuose (ties Druskininkais ir Merkinė) pradedant 3 diena po biologinio preparato panaudojimo. *Bti* aptikta ne ilgiau nei 21 diena po preparato panaudojimo (11 pav.). Visuose mėginiuose, surinktuose praėjus daugiau kaip 21 dienai po biologinio preparato panaudojimo, *Bti* nebuvo aptikta, todėl toliau jie darbe nebus analizuojami.

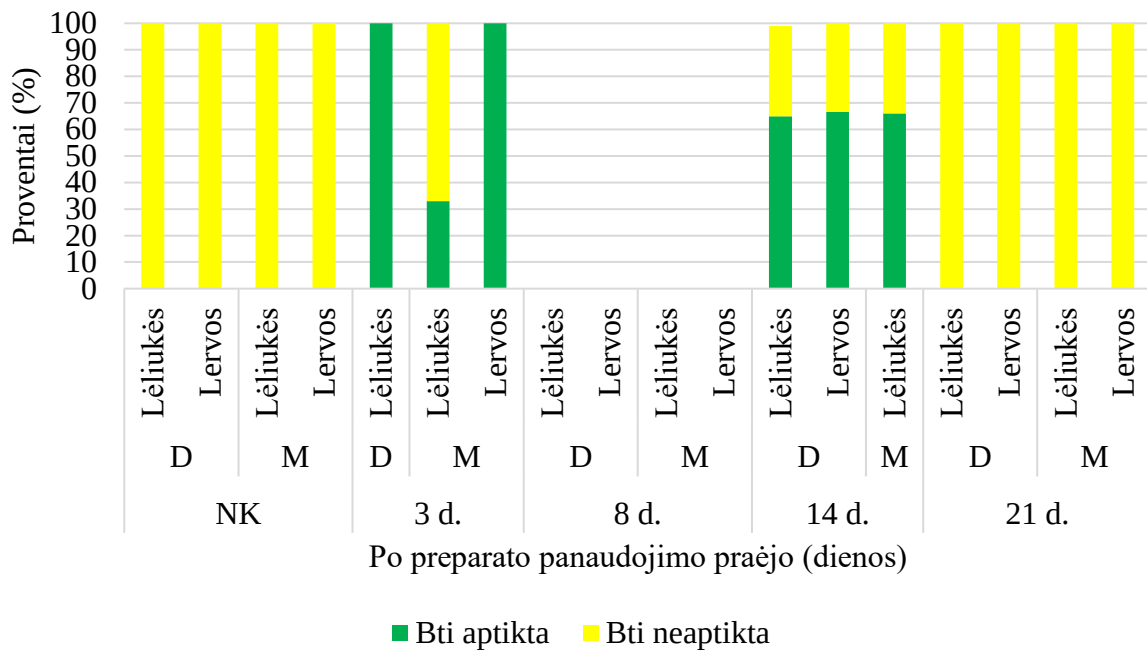


11 pav. *Bacillus thuringiensis israelensis* aptikimas visuose mėginiuose iš Nemuno, surinktuose ties Druskininkais (D) ir Merkinė (M) prieš/po VectoBac 12AS panaudojimo.

Kalbant apie šios kontrolės programos tikslinius vabzdžius upinius mašalus, 12 paveiksle matome, kad *Bti* jų lervose ir lėliukėse aptinkamos praėjus 3 ir 14 dienų po VectoBac 12AS panaudojimo. Mėginių, praėjus 8 dienoms po preparato panaudojimo, tyrimams nebuvo surinkta, nes upinių mašalų lervų ir lėliukių tuo metu nebuvo aptikta ant surinktų vandens augalų.

Praėjus 3 dienoms po biologinio preparato panaudojimo Nemune ties Druskininkais nebuvo aptikta upinių mašalų lervų (jos visos buvo žuvusios). Ne visose upinių mašalų lėliukėse surinktose Nemune ties Merkinė buvo aptinkama *Bti* bakterijų (12 pav.). Biologinį preparatą nuo jo panaudojimo vietos neša vandens srovė, kurios greitis Nemune yra apie 3–4 km/val., tai reiškia, kad preparatas Druskininkus pasiekia per 5–7 val., o Merkinę per 14–19 valandų. Preparatas veikia tik aktyviai besimaitinančias upinių mašalų lervas, tačiau neveikia lėliukių, nes jos nesimaitina. Taigi praėjus 3 dienoms po preparato panaudojimo Nemune ties Druskininkais neaptinkama gyvų lervų, tačiau randama upinių mašalų lėliukių, tačiau jų organizmuose aptinkama *Bti* (12 pav.). Nemune ties Merkinė rastose upinių mašalų lervose aptinkama *Bti*, tačiau kai kuriose lėliukėse *Bti* nebuvo aptikta. Tai galėtų būti siejama su faktu, kad lėliukės susiformavo dar prieš biologiniam preparatui pasiekiant Merkinę arba su faktu, kad pastarąsias lervas tuo metu pasiekusio preparato koncentracija dar nebuvo pakankama.

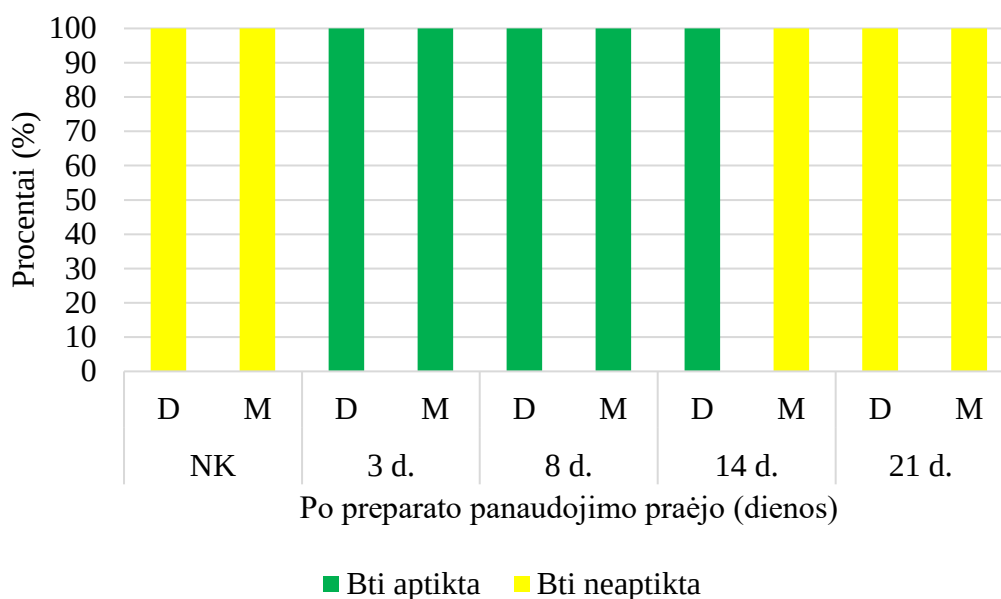
Mėginiuose imtuose praėjus 14 dienų po preparato panaudojimo, randama gyvų upinių mašalų lervų (ties Druskininkais) ir lėliukių (abiejose tyrimų vietose), kurių organizmuose aptinkama *Bti* (12 pav.).



12 pav. *Bacillus thuringiensis israelensis* aptikimas upinių mašalų lėliukėse ir lervose Nemune ties Druskininkais (D) ir Merkinė (M) praėjus 3, 8, 14 ir 21 dienai po VectoBac 12AS panaudojimo, NK – neigiama kontrolė, paimta prieš preparato panaudojimą.

Lietuvoje VectoBac 12AS naudojamas upinių mašalų gausumo kontrolei Nemune, o uodai trūkiai nėra tikslinė vabzdžių grupė, nes uodų trūklių suaugėliai nėra kraujasiurbiai, o lervos yra žuvų maistas. Remiantis literatūros duomenimis (Lagadic et al. 2016) uodų trūklių gausumo kontrolei būtų reikalinga didesnė preparato koncentracija (Becker 2003). Šie vabzdžiai Nemune yra gausi, visur aptinkama vabzdžių grupė savo biologija artima upiniams mašalams (vystosi ant vandens augalų panašiai kaip upinių mašalų lervos), jų gausumo biologinio preparato naudojimas Nemune neveikia (Bernotienė et al. 2008), todėl uodų trūklių lervų tyrimas leidžia stebėti tikslesnę *Bti* išlikimą mėginiuose po preparato panaudojimo. *Bti* endotoksinams nužudžius upinių mašalų lervas (praėjus 8 dienoms po VectoBac 12AS panaudojimo) jų upėje nebuvo aptinkama tačiau iš uodų trūklių lervų, paimtų tomis pačiomis dienomis, tyrimo buvo žinoma, kad *Bti* vis dar cirkuliuoja vandenyje ir upinių mašalų lervų neaptikimas yra to išdava. 13 paveiksle matome, kad praėjus 3 ir 8 dienoms po preparato panaudojimo *Bti* aptinkama visuose tirtuose (100 %) uodų trūklių lervų mėginiuose, tiek Nemune ties Druskininkais, tiek ties Merkinė. Praėjus 14 dienų po biologinio preparato panaudojimo mėginiuose ties Druskininkais (artimesniame taške nuo preparato panaudojimo vietos) *Bti* vis dar aptinkama visuose tirtuose (100 %) uodų trūklių lervų mėginiuose, tačiau tuo pat metu mėginiuose iš Merkinės (56 km žemiau nuo biologinio preparato panaudojimo vietos) pastarųjų bakterijų nebeaptinkama (0 %) (13 pav.). Visa tai parodo, kad Nemune ties

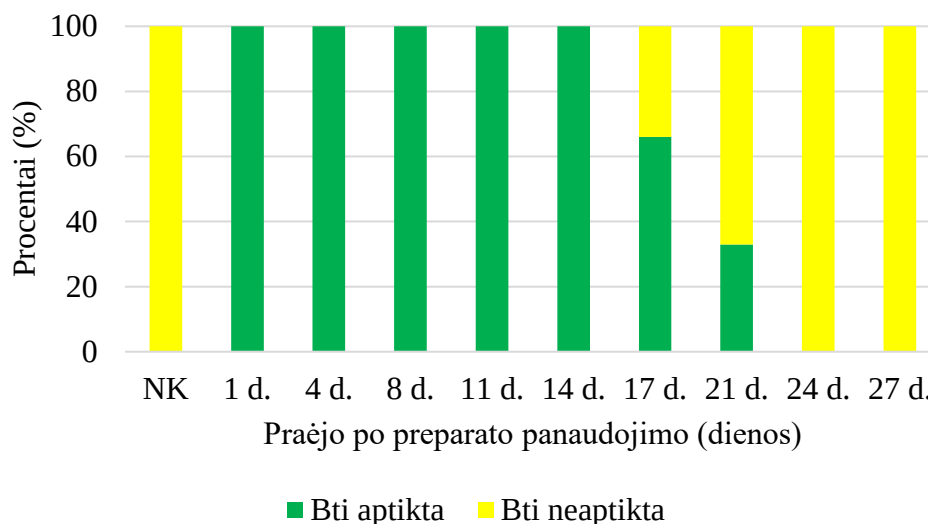
Druskininkais *Bti* cirkuliuoja vandenyje daugiau nei 14 dienų, tačiau mažiau nei 21 diena, po biologinio preparato panaudojimo, o Merkinėje trumpiau nei 14, tačiau ilgiau nei 8 dienas.



130 pav. *Bacillus thuringiensis israelensis* aptikimas uodų trūklių lervų mėginiuose iš Nemuno surinktuose ties Druskininkais (D), Merkinė (M) praėjus 3, 8, 14 ir 21 dienai po VectoBac 12AS panaudojimo, NK – neigiama kontrolė, paimta prieš preparato panaudojimą.

3.4. *Bti* išlikimo uodų lervose laboratorinėmis sąlygomis tyrimas

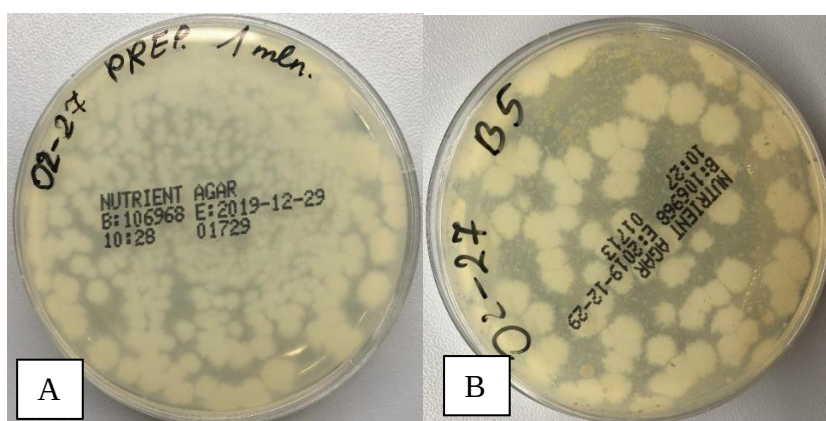
Atlikus *Bti* išlikimo uodų *C. pipiens* lervose laboratorijos sąlygomis tyrimą, gauti rezultatai parodė, kad *Bti* uodų lervose išlieka iki 21–24 dienų po VectoBac 12AS preparato panaudojimo. Gauti PGR rezultatai parodė, kad iki 17 dienos visi tirti uodai buvo *Bti* teigiami, o vėliau teigiamų mėginių pradeda mažėti (14 pav.) (žiūrėti priedą nr.2). Praėjus 24 dienoms po preparato panaudojimo *Bti* nebuvo aptikta nei vienoje tirtoje uodo lervoje.



14 pav. *Bacillus thuringiensis israelensis* išlikimas *Culex pipiens* uodų lervų organizmuose po VectoBac 12AS biologinio preparato panaudojimo laboratorijos sąlygomis (NK – neigiama kontrolė, paimta prieš preparato panaudojimą)

3.5. *Bti*, išlikusių kraujasiurbiuose uoduose, gyvybingumo tyrimas

Uodų tyrimo metu buvo tikrinamas *C. pipiens* lervose aptiktų *Bti* bakterijų gyvybingumas išsėjant paruoštus lervų mėginius. Uodų lervos, surinktos praėjus 4, 8, 11 ir 14 dienų po preparato panaudojimo buvo užšaldytos, o pasibaigus eksperimentui atšildytos ir sutrintos po vieną, o jų turinys pasėtas kaip nurodyta 2.7. poskyryje. Kaip teigiama kontrolė buvo naudojama 1 mln. kartų atskiestas biologinis preparatas VectoBac 12AS, o kaip neigiama kontrolė – sterilus vanduo. Praėjus 7 paroms po sėjimo, visuose tirtuose mėginiuose, išskyrus neigiamą kontrolę, susidarė bakterijų kolonijos (15 pav.).



15 pav. *Bti*, išlikusių kraujasiurbių uodų lervose, gyvybingumo tyrimas. A – teigiama kontrolė sėjant VectoBac 12AS preparatą skiestą 1 mln kartų; B – sutrintos uodo lervos turinio sėjimas praėjus 14 dienų po VectoBac 12AS panaudojimo. Naudojant PGR pradmenis CRY4F ir CRY4R patvirtinta, kad tai *Bacillus thuringiensis israelensis* (asmeninio archyvo nuotraukos)

Susidariusių kolonijų masė buvo surinkta sterilia kilpele į sterilų mėgintuvėlį, iš jos išskirta DNR ir atliktas PGR naudojant pradmenis CRY4F ir CRY4R. Rezultatai patvirtino, kad bakterijų kolonijas sudarė *Bti* bakterijos.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Per paskutinius du dešimtmečius, buvo atlikta nemažai tyrimų įvairių *Bti* biologinių preparatų panaudojimo vietose tiriant *Bti* bakterijų išlikimą, aktyvumo praradimą ir t.t. (Paris et al. 2011b) Pagal daugelio preparatų naudojimo nurodymus, preparato pakuotė gali būti saugoma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o surinkti mėginiai, turintys *Bti*, gali būti saugomi tolimesniems tyrimams šaldant juos $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tačiau yra būtina žinoti, kiek laiko *Bti* preparato mėginiai gali būti laikomi tokioje temperatūroje, kol tai nelemia pačių bakterijų gyvybingumo ar aktyvumo, ar tai tinka būtent preparatui VectoBac 12AS.

Boisvert ir Boisvert (2010) duomenimis, šaldant $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje vieną mėnesį VectoBac 1200L, kurio pagrindą sudaro *Bti* AM65-52 kamieno bakterijos, jokio statistiškai patikimo skirtumo tarp šaldyto ir šviežio preparato aktyvumo nebuvo pastebėta (Boisvert and Boisvert 2010). Palyginimui, po biologinio preparato Teknar HP-D, kurio pagrindas yra *Bti* SA3A kamieno bakterijos, šaldymo tokioje pačioje temperatūroje - preparato aktyvumas sumažėjo pusiau jau po pirmos savaitės, lyginant su šviežiu preparatu, ir išliko toks pat šaldant dar tris mėnesius (Boisvert and Boisvert 2010). Tris mėnesius šaldyti abu biologiniai preparatai parodė vienodą išlikusį aktyvumą (Boisvert and Boisvert 2001). Mūsų tyrimo metu tirtu VectoBac 12AS biologinio preparato pagrindą sudaro *Bti* AM65-52 kamieno bakterijos, kaip ir VectoBac 1200L. Tirtu preparato veiksmingumas bei bakterijų gyvybingumas jame po 1 mėnesio preparato laikymo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ atšildžius preparatą ir panaudojant jį prieš Gamtos tyrimų centre (Vilnius) auginamas *Culex pipiens* uodų lervas nepakito – praėjus 24 valandoms po biologinio preparato panaudojimo žuvo visos naudotos uodų lervos. Tai leido lengviau optimizuoti didelio kiekio surenkamų mėginių paruošimą.

Dažniausiai *Bti* bakterijos nebūna aptinkamos vietovėse, kuriose biologinis vabzdžių kontrolės preparatas su šiomis bakterijomis nebuvo panaudotas (Tilquin et al. 2008). Kitais atvejais *Bti* bakterijos nedideliais kiekiais gali būti izoliuojamos iš dirvožemio, gali būti aptinkamos ir vabzdžiuose, kuriuose proliferauja, saugomuose grūduose ar ant augalų antžeminių dalių (Tilquin et al. 2008). Kai kurie autoriai neigia bet kokią *Bti* akumuliacijos tokiu preparatu paveiktose vietovėse galimybę, net jei tokia vabzdžių kontrolės programa toje pačioje vietoje būtų naudojama ne vienerius metus, o ypač ten, kur gausu organinių medžiagų (De Respinis et al. 2006). Kitų tyrimų duomenimis, jei *Bti* ir išlikdavo dirvožemyje, jų sporos būdavo palaipsniui inaktyvuojamos (Hajaij et al. 2005). Mūsų tyrimo metu tirtuose mėginiuose, kurie buvo paimti prieš VectoBac 12AS biologinio preparato panaudojimą Nemune, *Bti*

bakterijų nebuvo aptikta nei vienos tirtos vabzdžių grupės lervose ir lėliukėse, nors tokia vabzdžių kontrolės programa šiuo biologiniu preparatu Nemune Lietuvoje naudojama ne vienerius metus.

Vienu didžiausių minusų naudojant *Bti* pagrindo biologinius preparatus yra jų greita inaktyvacija gamtoje. Tokio tipo tyrimų rezultatai ribojami ir nulemiami daugelio faktorių, pvz., UV (Tilquin et al. 2008). Veikimas gali būti prailginamas net iki mėnesio parenkant tinkamesnius kitokio paruošimo tipo *Bti* preparatus ar optimizavus jų panaudojimo būdą. *Bti*, patekusios į gamtą su biologinio preparato suspensija, dažniausiai nesuaktyvėja ir nesidaugina, todėl po tokio preparato panaudojimo vandenyje aptinkamos tik iki 22 dienų, kol suyra (Tetreau et al. 2012a). Mūsų tyrimas parodė, kad uodų trūklių ir upinių mašalų organizmuose *Bti* aptinkama iki 21 dienos po VectoBac 12AS biologinio preparato panaudojimo Nemune. Lietuvoje 2006 metais atliktų tyrimų duomenimis taikant tik sėjimo metodą ir mikroskopiją po VectoBac 12AS biologinio preparato panaudojimo Nemune *Bti* upiniuose mašaluose buvo aptinkama iki 22 dienų po biologinio preparato panaudojimo (Bernotienė et al. 2008), tačiau šio tyrimo rezultatai nevienareikšmiai, nes tyrimo metu biologinis preparatas buvo naudojamas du kartus, o 22 dienos po preparato panaudojimo sutapo su 3 dienomis po antrojo preparato panaudojimo. Mūsų tyrimo metu taikėme PGR metodą ir gavome panašius rezultatus – *Bti* vabzdžių lervose skirtingose Nemuno atkarpose aptinkamos iki 14-21 dienos po preparato panaudojimo. *Bti* išlikimas laboratorinėmis sąlygomis buvo tikrinimas preparatu veikiant *Culex pipiens* uodų lervas vandens inde. Tyrimo metu, priešingai nei gamtoje, *Bti* nebuvo veikiamos gamtinių veiksnių, pvz., UV, todėl *Bti* uodų lervų organizmuose buvo aptinkamas iki 24 dienų po biologinio preparato panaudojimo. Kai kurių mokslininkų duomenimis, lervų populiacijos stovinčio vandens telkiniuose gamtoje, paveiktuose *Bti* biologiniais preparatais, sugrįžta į pradinį dydį jau po 5-7 dienų (Guidi et al. 2011).

Bacillus thuringiensis israelensis dažniausiai naudojamas biologiniuose preparatuose, kurie pilami tiesiai į vandenį. Greitas preparato nusėdimas į dugną stipriai limituoja preparato efektyvumą ypač didelės vandens tėkmės vietose. *Bti* sedimentaciją padidina adsorbicija ant tam tikrų medžiagų esančių vandenyje. Buvo nustatyta, kad *Bti* gali išlikti iki 5 mėnesių nuosėdose, kai vanduo yra šaltas, tai yra stipriai nulemiama medžiagų, prie kurių bakterijos adsorbavosi. Pagal mokslininką Shililu (2003) sporos gali išlikti tokiose nuosėdose iki 22 dienų (Shililu et al. 2003).

Mokslininkai nustatė, kad uodų *Ae. aegypti* LiTOX kamieno uodai įgijo statistiškai reikšmingą atsparumą *Bti* Cry ir Cyt toksinams, kai buvo panaudota *Bti* biologinio preparato naudojimo vietose surinkta kritusių lapų biomasa. Tai, kad *Bti* poveikiui buvo įgytas

atsparumas, parodo, jog minėtoje biomasėje išlieka ir Cyt, ir Cry toksinai, tačiau skirtingais kiekiais, kurie skiriasi dėl nevienodo toksinų degradavimo gamtoje greičio. Taip uodai gali sąveikauti su atskirais toksinais, taip įgaudami atsparumą kiekvienam iš jų atskirai (Paris et al. 2011b), tačiau nebūti jų paveikiami, nes toksinai lervas paveikia tik sinergetiškai sąveikaudami. Naudojant *Bti* biologinius preparatus tinkamai, toks atsparumas neįgyjamas, nes lervas vienu metu paveikia visų *Bti* toksinų mišinys ir jos žūsta dėl sinergetinio toksinų poveikio. Dėl to, kad *Bti* insekticidai yra lengvai biodegrazuojantys, jų veikimo laikas nėra ilgas, tačiau dėl šios priežasties *Bti* laikomas saugiu aplinkai ir gali būti plačiai naudojamas pasaulyje.

IŠVADOS

1. *Bti* aptikimui tiriamuose mėginiuose tinkami CRY11F ir CRY11R, CRY4F ir CRY4R pradmenys, juos naudojant amplifikuotas PGR produktas 100 % atitiko *Bti* insekticidinio kristalinio baltymo Cry11Aa (cry11Aa), insekticidinio kristalinio baltymo Cry4Ba geno fragmento seką;
2. Preparato VectoBac 12AS veiksmingumas po 1 mėnesio preparato šaldymo –20 °C nepakito: atšildžius preparatą ir panaudojant jį prieš *Culex pipiens* uodų lervas, žuvo visos eksperimente naudotos uodų lervos. *Bti* išliko gyvybingos, bakterijos formavo kolonijas. PGR metodu patikrinti kolonijų mėginiai patvirtino, kad suformuotos kolonijos buvo *Bti*;
3. Biologinį preparatą sudarančios *Bti* bakterijos po preparato VectoBac 12AS panaudojimo Nemune upinių mašalų (*Simuliidae*) ir uodų trūklių (*Chironomidae*) lervose ir lėliukėse buvo aptiktos praėjus 3-14 dienų po preparato panaudojimo;
4. Biologinį preparatą sudarančios *Bti* bakterijos po preparato VectoBac 12AS panaudojimo laboratorijoje kraujasiurbių uodų (*Culex pipiens*) lervose buvo aptiktos praėjus 3-21 dienai po biologinio preparato panaudojimo;
5. *Bti*, išlikusių kraujasiurbiuose uoduose po VectoBac 12AS panaudojimo laboratorijoje, gyvybingumas išlieka praėjus 3-21 dienai po biologinio preparato panaudojimo.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Dovilė Leonavičiūtė
Magistro baigiamasis darbas

***Bacillus thuringiensis* porūšio *israelensis* bakterijų išlikimas po biologinio
preparato VectoBac 12AS panaudojimo**
SANTRAUKA

Bacillus thuringiensis porūšio *israelensis* yra bakterijos, kurių formuojami endotoksinai specifiskai veikia tam tikrų grupių dvisparnių (Diptera) vabzdžių lervas. Šių bakterijų pagrindu sukurtas biologinis vabzdžių gausumo kontrolės preparatas VectoBac 12AS naudojamas visame pasaulyje, taip pat Lietuvoje. Šio darbo tikslas buvo ištirti bakterijų *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) išlikimą po preparato VectoBac 12AS panaudojimo.

Bakterijų aptikimui buvo optimizuotos PGR sąlygos atrinktiems CRY11F ir CRY11R, CRY4F ir CRY4R pradmenims, padauginantiems *Bti* insekticidinio kristalinio baltymo Cry11Aa (*cry11Aa*) ir insekticidinio kristalinio baltymo Cry4Ba genų fragmentų sekas. VectoBac 12AS veiksmingumas po 1 mėnesio preparato šaldymo –20 °C, atšildžius jį ir panaudojus prieš auginamas *Culex pipiens* uodų lervas nepakito: praėjus 24 valandoms po preparato panaudojimo žuvo visos naudotos uodų lervos. *Bti* išliko gyvybingos, formavo kolonijas. PGR metodu patikrinti kolonijų mėginiai patvirtino, kad kolonijas sudarė *Bti*. Biologinį preparatą sudarančios *Bti* bakterijos po VectoBac 12AS panaudojimo Nemune upinių mašalų lervose ir lėliukėse (*Simuliidae*) ir uodų trūklių (*Chironomidae*) lervose buvo aptiktos praėjus 3-14 dienų po preparato panaudojimo Nemuno atkarpoje 21 km žemiau panaudojimo vietos ir praėjus 3-8 dienoms po preparato panaudojimo upės atkarpoje 56 km žemiau VectoBac 12AS panaudojimo vietos. Po šio preparato panaudojimo laboratorijoje *Bti* kraujasiurbių uodų (*Culex pipiens*) lervose buvo aptiktos praėjus 3-21 dienai po VectoBac 12AS panaudojimo. *Bti*, išlikusių kraujasiurbiuose uoduose po preparato panaudojimo laboratorijoje, gyvybingumas išlieka, jos formuoja *Bti* kolonijas. Šio tyrimo rezultatai naudingi VectoBac 12AS biologinio preparato efektyviam panaudojimui siekiant sumažinti kraujasiurbių vabzdžių gausumą.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Dovilė Leonavičiūtė

Master thesis

**Persistence of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* after application
of biological preparation VectoBac 12AS**

SUMMARY

Bacillus thuringiensis subspecies *israelensis* (*Bti*) is a group of bacteria which produces endotoxins that specifically effect particular groups of Diptera insects larvae. The biological preparation VectoBac 12AS is based on *Bti* and it is used globally, including Lithuania. Objective of our thesis is to investigate the persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* after application of biological preparation VectoBac 12AS.

Bacillus thuringiensis israelensis detection included optimization of PCR conditions for chosen CRY11F and CRY11R, CRY4F and CRY4R primers, that amplifies insecticidal crystal protein Cry11Aa and insecticidal crystal protein Cry4Ba genes fragments sequences. VectoBac 12AS preparation efficiency, after 1 month of freezing in –20 °C, after unfreezing and using against *Culex pipiens* mosquito larvae has not changed: after 24 hours after application of preparation all used larvae were dead. *Bti* persisted active and were able to form colonies. Samples of these colonies were investigated using PCR and it confirmed that there were colonies of *Bti*. *Bti* bacteria after application of VectoBac 12AS in Nemunas river can be detected in blackfly larvae and pupae (*Simuliidae*) and in chironomid (*Chironomidae*) larvae 3-14 days in the 21 km and 3-8 days in the 56 km of Nemunas river below VectoBac 12AS application location. After VectoBac 12A application in laboratory *Bti* persist in bloodsucking mosquitoes *Culex pipiens* larvae 3-21 days. *Bti* bacteria, that persisted in bloodsucking mosquitoes after application of preparation in laboratory, were viable and were able to form colonies. The results of this research are useful for effective application of biological preparation VectoBac 12AS in order to decrease abundance of bloodsucking insects.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adalat R, Saleem F, Crickmore N, Naz S, Shakoori AR. In vivo crystallization of three-domain cry toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(3):1–13.
- Adams LF, Visick JE, Whiteley HR. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1989 Jan;171(1):521–30.
- Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J Bacteriol*. 1995;177(21):6027–32.
- Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, et al. Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *J Mol Biol*. 2009 Feb 1;386:121–33.
- Ali NO, Bignon J, Rapoport G, Debarbouille M. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 2001 Apr;183(8):2497–504.
- Allgeier S, Kastel A, Bruhl CA. Adverse effects of mosquito control using *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: Reduced chironomid abundances in mesocosm, semi-field and field studies. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019 Mar;169:786–96.
- Aronson A. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(3):417–25.
- Barboza-Corona JE, Park H-W, Bideshi DK, Federici BA. The 60-kilodalton protein encoded by orf2 in the cry19A operon of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* functions like a C-terminal crystallization domain. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Mar;78(6):2005–12.
- Bartninkaitė I, Bernotienė R, Pakalniškis S, Žygutienė M. Control of bloodsucking black fly (*Simuliidae*) populations in Lithuania. *Ekologija*. 2006;4(4):70–5.
- Barton KA, Whiteley HR, Yang N-S. *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum* Provides Resistance to Lepidopteran Insects. *Plant Physiol*. 1987;85(4):1103–9.
- Baum JA, Malvar T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1995 Oct;18(1):1–12.
- Becker N. Sterilization of *Bacillus thuringiensis israelensis* products by gamma radiation. *J Am Mosq Control Assoc*. 2002 Mar;18(1):57–62.
- Becker N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae--a new application technique. *J Am Mosq Control Assoc*. 2003 Mar;19(1):63–6.

- Becker N, Ludwig M. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J Am Mosq Control Assoc*. 1993 Jun;9(2):221–4.
- Becker N, Ludwig M, Su T. Lack of Resistance in *Aedes vexans* Field Populations After 36 Years of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Applications in the Upper Rhine Valley, Germany. *J Am Mosq Control Assoc*. 2018 Jun;34(2):154–7.
- Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, et al. Mosquitoes and their control: Second edition. *Mosquitoes Their Control Second Ed*. 2010;1–577.
- Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins (Basel)*. 2014 Mar;6(4):1222–43.
- van den Berg H, Velayudhan R, Ebol A, Catbagan BHGJ, Turingan R, Tusó M, et al. Operational efficiency and sustainability of vector control of malaria and dengue: descriptive case studies from the Philippines. *Malar J*. 2012 Aug;11:269.
- van den Berg H, Yadav RS, Zaim M. Setting international standards for the management of public health pesticides. *PLoS Med*. 2015 May;12(5):e1001824.
- Bernotienė R, Bartninkaitė I, Višinskienė G. Diffusion of *Bacillus thuringiensis* bacteria and their effect on aquatic invertebrates in the Nemunas River after using VectoBac 12AS preparation. *Bacillus Thuringiensis bakterijų sklaidimas ir poveikis vandens bestuburiams Nemune po preparato VectoBac 12AS*. *Ekologija*. 2008;54(2):93–7.
- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;32(2):156–73.
- Boisvert M, Boisvert J. Storage stability of two liquid formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and effect of freezing over time. *Biocontrol Sci Technol*. 2001;11(4):475–82.
- Boisvert M, Boisvert J. Biocontrol Science and Technology Persistence of Toxic Activity and Recycling of *Bacillus thuringiensis* var . *israelensis* in Cold Water : Field Experiments Using Diffusion Chambers in a Pond. 2010;(October 2014):37–41.
- Boisvert M, Boisvert J, Aubin A. Factors Affecting Residual Dosages of Two Formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Tested in the Same Stream During a 3-Year Experiment. *Biocontrol Sci Technol* [Internet]. 2001 Dec 1;11(6):727–44. Available from: <https://doi.org/10.1080/09583150120093095>
- Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb Biotechnol*. 2013;6(1):17–26.

- Bravo A, Soberón M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? Trends Biotechnol. 2008;26(10):573–9.
- Brevault T, Heuberger S, Zhang M, Ellers-Kirk C, Ni X, Masson L, et al. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr;110(15):5806–11.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(41):15196–9.
- Butko P, Huang F, Pusztai-Carey M, Surewicz WK. Interaction of the delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. Biochemistry. 1997 Oct;36(42):12862–8.
- Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. Euro Surveill [Internet]. 2017 Sep;22(39):17–647. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29019313>
- Caprio MA. Evaluating Resistance Management Strategies for Multiple Toxins in the Presence of External Refuges. J Econ Entomol. 1998;91(5):1021–31.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, Palmer TM. Accelerated Modern Human-Induced Species Losses : Entering the Sixth Mass Accelerated modern human – induced species losses : Entering the sixth mass extinction. 2015;(June):1–6.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. 2017;(July).
- Chilcott CN, Ellar DJ. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro. J Gen Microbiol. 1988 Sep;134(9):2551–8.
- Christiansen JA, McAbee RD, Stanich MA, DeChant P, Boronda D, Cornel AJ. Influence of temperature and concentration of VectoBac on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey County, California. J Am Mosq Control Assoc. 2004 Jun;20(2):165–70.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(3):807–13.
- Van Cuyk S, Deshpande A, Hollander A, Duval N, Ticknor L, Layshock J, et al. Persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in Urban Environments following Spraying. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2011/09/16. 2011 Nov;77(22):7954–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21926205>

- Darwin SH. Lessons of History? Anti-Malaria Strategies of the International Health Board and the Rockefeller Foundation from the 1920s Era of DDT. *Public Health Rep.* 2004;119(1):206–15.
- Delecluse A, Jmlrez-perez V, Berry C. Vector-active toxins : structure and diversity. 2000;101–2.
- Deng C, Peng Q, Song F, Lereclus D. Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2014 Jul 23;6(7):2194–209. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25055802>
- Deng C, Slamti L, Raymond B, Liu G, Lemy C, Gominet M, et al. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *ISME J.* 2015 Feb;9(2):286–96.
- Dervyn E, Poncet S, Klier A, Rapoport G. Transcriptional regulation of the cryIVD gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *J Bacteriol.* 1995 May;177(9):2283–91.
- Diaz-Mendoza M, Bideshi DK, Ortego F, Farinos GP, Federici BA. The 20-kDa chaperone-like protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. israelensis enhances yield, crystal size and solubility of Cry3A. *Lett Appl Microbiol.* 2012 Feb;54(2):88–95.
- Dominic Amalraj D, Sahu SS, Jambulingam P, Boopathi Doss PS, Kalyanasundaram M, Das PK. Efficacy of aqueous suspension and granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac) against mosquito vectors. *Acta Trop.* 2000 Mar;75(2):243–6.
- Doruk T, Avican U, Camci IY, Gedik ST. Overexpression of polyphosphate kinase gene (ppk) increases bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Res.* 2013 May;168(4):199–203.
- Du L, Qiu L, Peng Q, Lereclus D, Zhang J, Song F, et al. Identification of the promoter in the intergenic region between orf1 and cry8Ea1 controlled by sigma H factor. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012/04/13. 2012 Jun;78(12):4164–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22504821>
- Duchet C, Tetreau G, Marie A, Rey D, Besnard G, Perrin Y, et al. Persistence and recycling of bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis spores in contrasting environments: evidence from field monitoring and laboratory experiments. *Microb Ecol.* 2014 Apr;67(3):576–86.
- Ecology N, Harvey JA, Heinen R, Armbrecht I, Basset Y. International scientists formulate a roadmap for insect conservation and recovery. 2020;(January).
- Elleuch J, Zribi Zghal R, Lacoix MN, Chandre F, Tounsi S, Jaoua S. Evidence of two mechanisms involved in *Bacillus thuringiensis* israelensis decreased toxicity against mosquito larvae: Genome dynamic and toxins stability. *Microbiol Res* [Internet]. 2015;176:48–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501315000671>
- Eski A, Demir İ, Sezen K, Demirbağ Z. A new biopesticide from a local *Bacillus thuringiensis* var.

- tenebrionis (Xd3) against alder leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017;33(5):95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2263-0>
- Evdokimov AG, Moshiri F, Sturman EJ, Rydel TJ, Zheng M, Seale JW, et al. Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Sci.* 2014 Nov;23(11):1491–7.
- Falkenhorst G, Enkelmann J, Frank C, Stark K. Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten Reiseassoziierte Krankheiten 2017. 2018;(44):467–75.
- Federici BA. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol.* 2005;89(1):30–8.
- Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ. Recombinant bacteria for mosquito control. *J Exp Biol.* 2003;206(21):3877–85.
- Garcia-Robles I, Sánchez J, Gruppe A, Martínez-Ramírez AC, Rausell C, Real MD, et al. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(9):849–56.
- Gobatto V, Giani S, Camassola M, Dillon A, Specht A, Barros N. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian J Biol.* 2010;70(4):1039–46.
- Gould GW. History of science - Spores: Lewis B Perry Memorial Lecture 2005. *J Appl Microbiol.* 2006;101(3):507–13.
- Gray EW, Fusco R. Chapter 25 - Microbial Control of Black Flies (Diptera: Simuliidae) With *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In: Lacey LABT-MC of I and MP, editor. Academic Press; 2017. p. 367–77. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128035276000251>
- Grochulski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz JL, Brousseau R, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *J Mol Biol.* 1995;254(3):447–64.
- Guidi V, Lehner A, Lüthy P, Tonolla M. Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Spores in Urban Catch Basins after Simultaneous Application against Mosquito Larvae. *PLoS One.* 2013;8(2):2–9.
- Guidi V, Patocchi N, Lüthy P, Tonolla M. Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Soil of a Swiss Wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011/04/15. 2011 Jun;77(11):3663–8. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21498758>

- Hajaij M, Carron A, Deleuze J, Gaven B, Setier-Rio ML, Vigo G, et al. Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern France. *Microb Ecol.* 2005;50(4):475–87.
- Hallmann CA, Sorg M, Jongejans E, Siepel H, Hofland N, Schwan H, et al. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185809.
- Hayakawa T, Sato S, Iwamoto S, Sudo S, Sakamoto Y, Yamashita T, et al. Novel strategy for protein production using a peptide tag derived from *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa. *FEBS J.* 2010 Jul;277(13):2883–91.
- Hernández-Rodríguez CS, Boets A, Van Rie J, Ferré J. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *J Appl Microbiol.* 2009;107(1):219–25.
- Hoekman D, Dreyer J, Analysis S, Jackson RD, Townsend PA. Lake to land subsidies : Experimental addition of aquatic insects increases Lake to land subsidies : Experimental addition of aquatic insects increases terrestrial arthropod densities. 2011;(November).
- Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs.* 2010;1(1):31–50.
- Jactel H, Koricheva J, Castagneyrol B. Responses of forest insect pests to climate change: not so simple. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2019;35:103–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214574519300227>
- Jakob C, Poulin B. Indirect effects of mosquito control using *Bti* on dragonflies and damselflies (Odonata) in the Camargue. *Insect Conserv Divers.* 2016 Feb 1;9:n/a-n/a.
- Janmaat AF, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings Biol Sci* [Internet]. 2003 Nov 7;270(1530):2263–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14613613>
- Jouzani GS, Valijanlian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(7):2691–711.
- Juarez-Hernandez EO, Casados-Vazquez LE, del Rincon-Castro MC, Salcedo-Hernandez R, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis producing endochitinase ChiA74Deltasp inclusions and its improved activity against *Aedes aegypti*. *J Appl Microbiol.* 2015 Dec;119(6):1692–9.
- Kant S, Kapoor R, Banerjee N. Identification of a catabolite-responsive element necessary for regulation of the cry4A gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *J Bacteriol.* 2009 Jul;191(14):4687–

- Khan SR, Banerjee-Bhatnagar N. Loss of catabolite repression function of HPr, the phosphocarrier protein of the bacterial phosphotransferase system, affects expression of the cry4A toxin gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol.* 2002 Oct;184(19):5410–7.
- Kurt A, Ozkan M, Ozcengiz G. Inorganic phosphate has a crucial effect on Cry3Aa delta-endotoxin production. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(4):303–8.
- Lagadic L, Schafer RB, Roucaute M, Szocs E, Chouin S, de Maupeou J, et al. No association between the use of *Bti* for mosquito control and the dynamics of non-target aquatic invertebrates in French coastal and continental wetlands. *Sci Total Environ.* 2016 May;553:486–94.
- Lahondere C, Vinauger C, Okubo RP, Wolff GH, Chan JK, Akbari OS, et al. The olfactory basis of orchid pollination by mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jan;117(1):708–16.
- Laurence D, Christophe L, Roger F. Using the Bio-Insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis*. 2011;(January).
- Lecadet MM, Frachon E, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol.* 1999;86(4):660–72.
- Li XQ, Tan A, Voegtline M, Bekele S, Chen CS, Aroian R V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. *Biol Control.* 2008;47(1):97–102.
- Lord JC. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *J Invertebr Pathol.* 2005;89(1):19–29.
- Luxananil P, Atomi H, Panyim S, Imanaka T. Isolation of bacterial strains colonizable in mosquito larval guts as novel host cells for mosquito control. *J Biosci Bioeng.* 2001;92(4):342–5.
- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annu Rev Genet.* 2003;37(1):409–33.
- Mace GM, Norris K, Fitter AH. Biodiversity and ecosystem services: a multilayered relationship. *Trends Ecol Evol.* 2012 Jan;27(1):19–26.
- Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, Condon C. 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell.* 2007 May;129(4):681–92.
- Mittal P, Adak T, Subbarao S. Laboratory selection to investigate the development of resistance to

- Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Natl Acad Sci Lett. 2005 Jan 1;28:281–3.
- Moir A, Kemp EH, Robinson C, Corfe BM. The genetic analysis of bacterial spore germination. J Appl Bacteriol. 1994;76(Keynan 1978):9S-16S.
- Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Liu JS, et al. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2003 Dec;50(5):1683–701.
- Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. Crop Prot [Internet]. 2014;56:50–4. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121941300269X>
- Otieno-Ayayo ZN, Zaritsky A, Wirth MC, Manasherob R, Khasdan V, Cahan R, et al. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. Environ Microbiol. 2008;10(9):2191–9.
- Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. Toxins (Basel). 2014;6(12):3296–325.
- Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev. 2013 Jan;37(1):3–22.
- Paris M, David J-P, Despres L. Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. Ecotoxicology. 2011a Aug;20(6):1184–94.
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. Pest Manag Sci. 2011b Jan;67(1):122–8.
- Park H-W, Bideshi DK, Federici BA. The 20-kDa protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* enhances *Bacillus sphaericus* 2362 bin toxin synthesis. Curr Microbiol. 2007 Aug;55(2):119–24.
- Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: From structure to function. Prog Biophys Mol Biol. 2005;88(1):91–142.
- Parrinello G, Bécot R. Regional Planning and the Environmental Impact of Coastal Tourism: The Mission Racine for the Redevelopment of Languedoc-Roussillon's Littoral. Humanities. 2019;8(1):13.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. J Am Mosq Control Assoc. 2005 Sep;21(3):305–9.

- Peach DAH, Gries G. Nectar thieves or invited pollinators ? A case study of tansy flowers and common house mosquitoes Nectar thieves or invited pollinators ? A case study of tansy flowers and common house mosquitoes. *Arthropod Plant Interact.* 2019;10(6):497–506.
- Perez-Garcia G, Basurto-Rios R, Ibarra JE. Potential effect of a putative sigma(H)-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.* 2010 Jun;104(2):140–6.
- Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2004 Dec;7(6):579–86.
- Poulin B, Lefebvre G, Paz L. Red flag for green spray: Adverse trophic effects of *Bti* on breeding birds. *J Appl Ecol.* 2010 Aug 1;47:884–9.
- Rajamohan F, Alcantara E, Lee MK, Xue Jun Chen, Curtiss A, Dean DH. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1995;177(9):2276–82.
- Raymond B, Federici BA. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017;93(7):1–8.
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, Luthy P, Peduzzi R, Tonolla M. Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Lett Appl Microbiol.* 2006 Nov;43(5):495–501.
- Ritchie SA, Rapley LP, Benjamin S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 Jun;82(6):1053–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519600>
- Rosas-Garcia N. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3(1):28–36.
- Rukmini V, Reddy CY, Venkateswerlu G. *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie.* 2000 Feb;82(2):109–16.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Appl Entomol.* 2003;127(1):29–32.
- Sambrook JF, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*. Vol. 1, Cold Springs Harbour Press. 2001.
- Sazhenskiy V, Zaritsky A, Itsko M. Expression in *Escherichia coli* of the native cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2010 May;76(10):3409–11.

- Schäfer M, Lundström J. Efficiency of *Bti*-based floodwater mosquito control in Sweden – four examples. 2014.
- Schafer ML, Lundstrom JO, Petersson E. Comparison of mosquito (Diptera: Culicidae) populations by wetland type and year in the lower river Dalälven region, Central Sweden. *J Vector Ecol.* 2008 Jun;33(1):150–7.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):775–806.
- Schnepf HE, Whiteley HR. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(5):2893–7.
- Sene L, Arruda PV, Oliveira SMM, Felipe MDGA. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for xylitol production. *N Biotechnol.* 2009;25(September):S226–7.
- Shao Z, Liu Z, Yu Z. Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Dec;67(12):5362–9.
- Shililu J, Tewolde G, Brantly E, Githure J, Mbogo C, Beier J, et al. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus* and temephos for managing *Anopheles* larvae in Eritrea. *J Am Mosq Control Assoc.* 2003 Oct 1;19:251–8.
- Siqueira HAA, Moellenbeck D, Spencer T, Siegfried BD. Cross-Resistance of Cry1Ab-Selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins. *J Econ Entomol.* 2004;97(3):1049–57.
- Soberon M, Lopez-Diaz JA, Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides.* 2013 Mar;41:87–93.
- Stalinski R, Tetreau G, Gaude T, Despres L. Pre-selecting resistance against individual *Bti* Cry toxins facilitates the development of resistance to the *Bti* toxins cocktail. *J Invertebr Pathol.* 2014 Jun;119:50–3.
- Staples N, Ellar D, Crickmore N. Cellular localization and characterization of the *Bacillus thuringiensis* Orf2 crystallization factor. *Curr Microbiol.* 2001 Jun;42(6):388–92.
- Succo T, Leparç-Goffart I, Ferre J-B, Roiz D, Broche B, Maquart M, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2016 May;21(21).
- Sukumar K, Perich MJ, Boobar LR. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991 Jun;7(2):210–37.

- Tabashnik BE, Finson N, Chilcutt CF, Cushing NL, Johnson MW. Increasing Efficiency of Bioassays: Evaluating Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol*. 1993;86(3):635–44.
- Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carriere Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol*. 2009 Dec;102(6):2011–25.
- Tenssay Z, Ashenafi M, Eiler A, Bertilsson S. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* from soils in contrasting agroecological zones of Ethiopia. *SINET Ethiop J Sci*. 2011 Aug 18;32.
- Tetreau G, Alessi M, Veyrenc S, Perigon S, David J-P, Reynaud S, et al. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Appl Environ Microbiol*. 2012a Dec;78(23):8362–7.
- Tetreau G, Banneville A-S, Andreeva EA, Brewster AS, Hunter MS, Sierra RG, et al. Serial femtosecond crystallography on in vivo-grown crystals drives elucidation of mosquitocidal Cyt1Aa bioactivation cascade. *Nat Commun*. 2020 Mar;11(1):1153.
- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones CM, Stalinski R, Riaz MA, Paris M, et al. Larval midgut modifications associated with *Bti* resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics*. 2012b Jun;13:248.
- Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David J-P, Reynaud S, et al. Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Appl Environ Microbiol*. 2012c Aug;78(15):5189–95.
- Theissinger K, Allgeier S, Beermann AJ. Mosquito control actions affect chironomid diversity in temporary wetlands of the Upper Rhine Valley. 2019;(August).
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, Geremia RA, et al. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. *PLoS One*. 2008;3(10):e3432.
- Torres-Quintero MC, Gómez I, Pacheco S, Sánchez J, Flores H, Osuna J, et al. Engineering *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin specificity from dipteran to lepidopteran toxicity. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz J-L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J Invertebr Pathol*. 2012 Sep;111(1):1–12.
- Valkiunas G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporina. 2005.
- Vega-Rúa A, Okech B. The Spread of Mosquito-Borne Diseases: A Major and Global Public Health Problem. In 2019. p. 1–27.

- Vilarinhos PTR, Monnerat R. Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc*. 2004 Sep;20(3):311–4.
- Vilas-Boas GT, Peruca APS, Arantes OMN. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol*. 2007 Jun;53(6):673–87.
- Visick JE, Whiteley HR. Effect of a 20-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1991 Mar;173(5):1748–56.
- Walker ED. EFFECT OF LOW TEMPERATURE ON FEEDING RATE OF AEDES STIMUL / IN , S LARVAE AND EFFICACY OF BACILLUS THURINGIENSIS. 1995;(1):0–3.
- Wang J, Mei H, Qian H, Tang Q, Liu X, Yu Z, et al. Expression profile and regulation of spore and parasporal crystal formation-associated genes in *Bacillus thuringiensis*. *J Proteome Res*. 2013 Dec;12(12):5487–501.
- Whiteley H. The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation in *Bacillus Thuringiensis*. *Annu Rev Microbiol*. 1986;40(1):549–76.
- Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Restores Toxicity of *Bacillus sphaericus* Against Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) . *J Med Entomol*. 2000;37(3):401–7.
- Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Inheritance patterns, dominance, stability, and allelism of insecticide resistance and cross-resistance in two colonies of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Med Entomol*. 2010 Sep;47(5):814–22.
- Wirth MC, Walton WE, Federici BA. Inheritance, stability, and dominance of cry resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) selected with the three cry toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Med Entomol*. 2012 Jul;49(4):886–94.
- Yang H, Wang P, Peng Q, Rong R, Liu C, Lereclus D, et al. Weak transcription of the cry1Ac gene in nonsporulating *Bacillus thuringiensis* cells. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012/07/06. 2012 Sep;78(18):6466–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22773626>
- Zhao X, Smith DL, Tatem AJ. Exploring the spatiotemporal drivers of malaria elimination in Europe. *Malar J*. 2016;15(1).
- Zhu Y, Ji F, Shang H, Zhu Q, Wang P, Xu C, et al. Gene clusters located on two large plasmids determine spore crystal association (SCA) in *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* strain YBT-020. *PLoS One*. 2011;6(11):e27164.

PRIEDAI

1 priedas

NR.	MĖGINIŲ PAĖMIMO DATA	PO PREPARATO PANAUDOJIMO PRAĖJĘ	RINKIMO VIETA		VYSTYMOSI STADIJA	GRYNINIMAS SU AMONIO ACETATU (IMANT PO 2 VNT. PUPAE/LARVAE). MĖGINIO NR.	KONCENTRACIJA (ng/μl)	260/280	Bti APTIKTA (Bti) AR NEAPTIKTA(-)				
0.	2019.05.06	*Prieš panaudojimą	Druskininkai	Upiniai mašalai	Pupae	0.19	150,5	2,1	-				
						0.20	212,2	2,2	-				
						0.21	110,2	2,2	-				
				Apsiuvos	Larvae	0.22	100,3	2,4	-				
						0.23	140,4	2,3	-				
						0.24	185,6	2,5	-				
							0.25	145,8	2,2	-			
							Merkinė	Upiniai mašalai	Larvae	0.13	42	2,6	-
										0.14	330	2,1	-
			0.15	508	2,1	-							
			2019.05.09	*Prieš panaudojimą	Merkinė	Upiniai mašalai	Pupae	0.4	371,7	2,2	-		
								0.5	321,8	2,2	-		
								0.6	39,6	2,7	-		
	Uodai trūkiai	Larvae				0.1	282,8	2,3	-				
						0.2	170,2	2,5	-				
						0.3	200,8	2,3	-				
	Alytus	Upiniai mašalai			Pupae	0.10	655,9	2,2	-				
						0.11	421,8	2,2	-				
						0.12	344,5	2,2	-				
		Uodai trūkiai			Larvae	0.16	713,7	2,2	-				
						0.17	452,3	2,1	-				
						0.18	550	2,1	-				
	1.	2019.05.16	3 dienos	Druskininkai	Upiniai mašalai	Pupae	0.9	211,3	2,3	-			
							1.1	268,7	2,2	Bti			
							1.2	154,3	2,3	Bti			
Uodai trūkiai					Larvae	1.3	251,4	2,2	Bti				
						1.4	69,6	2,4	Bti				
						1.5	50,6	2,5	Bti				
Merkinė				Upiniai mašalai	Pupae	1.6	82,7	2,4	Bti				
						1.7	179,8	2,2	-				
						1.8	164,9	2,3	Bti				
								1.9	241,4	2,2	-		
								1.13	159,5	2,2	Bti		
								1.14	123,5	2,3	Bti		
				1.15	151	2,2	Bti						

				Uodai trūkiai	Larvae	1.10	66	2,4	<i>Bti</i>
						1.11	69,5	2,4	<i>Bti</i>
						1.12	75,3	2,4	<i>Bti</i>
2.	2019.05.21	8 dienos	Druskininkai	Uodai trūkiai	Larvae	2.1	85,1	2,4	<i>Bti</i>
						2.2	82,8	2,4	<i>Bti</i>
						2.3	57,7	2,5	<i>Bti</i>
			Merkinė	Uodai trūkiai	Larvae	2.4	112,8	2,3	<i>Bti</i>
						2.5	133,6	2,3	<i>Bti</i>
						2.6	114	2,3	<i>Bti</i>
3.	2019.05.27	14 dienų	Druskininkai	Upiniai mašalai	Pupae	3.1	98,6	2,4	<i>Bti</i>
						3.2	130,1	2,3	-
						3.3	214,2	2,2	<i>Bti</i>
				Uodai trūkiai	Larvae	3.4	233,4	2,2	-
						3.5	200,4	2,2	<i>Bti</i>
						3.6	80,7	2,4	<i>Bti</i>
			Merkinė	Upiniai mašalai	Pupae	3.7	87,8	2,3	<i>Bti</i>
						3.8	80,9	2,3	<i>Bti</i>
						3.9	123	2,3	<i>Bti</i>
				Uodai trūkiai	Larvae	3.10	239,9	2,2	<i>Bti</i>
						3.11	183,8	2,2	<i>Bti</i>
						3.12	165,1	2,3	-
						3.13	100,3	2,2	-
						3.14	150,3	2,4	-
4.	2019.06.04	21 diena	Druskininkai	Uodai trūkiai	Larvae	4.1	162,3	2,5	-
						4.2	152,8	2,6	-
						4.3	170,5	2,2	-
			Merkinė	Upiniai mašalai	Larvae	4.4	142,3	2,2	-
						4.5	142,3	2,2	-
5.	2019.06.14	1 mėnesis	Druskininkai	Upiniai mašalai	Larvae	5.1	25,2	3,7	-
						5.2	27,9	3,1	-
						5.3	41,3	2,9	-
				Uodai trūkiai	Larvae	5.4	12,7	7,1	-
						5.5	13,4	5,9	-
						5.6	40,9	2,8	-
			Merkinė	Upiniai mašalai	Larvae	5.7	107,7	2,4	-
						5.8	143,9	2,3	-
						5.9	181,9	2,3	-
				Uodai trūkiai	Larvae	5.10	140,7	2,3	-
						5.11	133,8	2,3	-
						5.12	67,3	2,5	-

6.	2019.06.30	1,5 mėnesio	Druskininkai	Upiniai mašalai	Pupae	6.7	105,5	2,2	-
						6.8	90,1	2,2	-
						6.9	88,3	2,2	-
					Larvae	6.10	58	2,2	-
						6.11	139	2,5	-
						6.12	130,5	2,4	-
			Merkinė	Uodai trūkiai	Larvae	6.13	125,2	2,2	-
						6.14	85,6	2,3	-
						6.15	110,3	2,3	-
				Upiniai mašalai	Pupae	6.1	150,5	2,2	-
						6.2	142,5	2,2	-
						6.3	151,4	2,2	-
7.	2019.07.13	2 mėnesiai	Druskininkai	Upiniai mašalai	Larvae	6.6	152,5	2,2	-
						6.4	32,1	2,8	-
						6.5	45,1	2,4	-
				Uodai trūkiai	Larvae	7.1	338,6	2,2	-
						7.2	328,8	2,2	-
						7.3	266	2,2	-
			Merkinė	Upiniai mašalai	Larvae	7.4	234,7	2,3	-
						7.5	375,6	2,3	-
						7.6	410,4	2,3	-
				Uodai trūkiai	Larvae	7.7	108,3	2,2	-
						7.8	67,5	2,4	-
						7.9	72,6	2,3	-
			Merkinė	Upiniai mašalai	Pupae	7.10	344,6	2,2	-
						7.11	334,7	2	-
						7.12	806,7	2,2	-
				Uodai trūkiai	Larvae	7.13	454,9	2,1	-
						7.14	634,9	2,2	-
						7.15	521,1	2,2	-
			Merkinė	Uodai trūkiai	Larvae	7.16	85,3	2,3	-
						7.17	63,4	2,5	-
						7.18	110	2,3	-

2 priedas

Mėnesis	Diena	Ekspimento laikas nuo pradžios (dienomis)	Mėginio nr.	<i>Bti</i> aptūta (<i>Bti</i>) ar neaptūta (Nėra)	Mėginio nr.	<i>Bti</i> aptūta (<i>Bti</i>) ar neaptūta (Nėra)	Mėginio nr.	<i>Bti</i> aptūta (<i>Bti</i>) ar neaptūta (Nėra)
Sausis	27	0	1K	-	2K	-	3K	-
	28	1	1.1	<i>Bti</i>	1.2	<i>Bti</i>	1.3	<i>Bti</i>
	31	4	2.1	<i>Bti</i>	2.2	<i>Bti</i>	2.3	<i>Bti</i>
	4	8	3.1	<i>Bti</i>	3.2	<i>Bti</i>	3.3	<i>Bti</i>
	7	11	4.1	<i>Bti</i>	4.2	<i>Bti</i>	4.3	<i>Bti</i>
Vasaris	10	14	5.1	<i>Bti</i>	5.2	<i>Bti</i>	5.3	<i>Bti</i>
	13	17	6.1	<i>Bti</i>	6.2	-	6.3	<i>Bti</i>
	17	21	7.1	<i>Bti</i>	7.2	-	7.3	-
	20	24	8.1	-	8.2	-	8.3	-
	23	27	9.3	-	9.2	-	9.1	-

3 priedas

VectoBac 12AS biologinio preparato naudojimo Lietuvoje normos ir dažnis (ištrauka iš biocidinio produkto autorizacijos liudijimo dėl preparato naudojimo <https://biocidai.nvsc.lt/bin.php?a=1&b=1565&c=32939&d=2>):

1. Uodams: 0,25 – 2,5 l/ha produkto. Produktas naudojamas neskiestas arba, priklausomai nuo naudojamos įrangos, praskiestas nuo 0 iki 1000 l. Naudojamos normos priklauso nuo kontroliuojamo organizmo populiacijos gausumo, lervinės stadijos ir vandens kokybės. Mažiausia dozė 0,25 – 1,5 l/ha naudojama siekiant kontroliuoti lervas nuo pirmosios iki ankstyvos ketvirtosios lervinės stadijos. Jeigu lervų gausumas yra didelis, dominuoja ketvirtoji lervinė stadija, vandenyje yra daug organinės medžiagos ir/arba vyksta greita vandens apykaita, didžiausia produkto dozė (1,5 l/ha – 2,5 l/ha) turi būti naudojama. Produkto poveikis: 24 val. po panaudojimo;
2. Mašalams: 0,5 – 40 ppm/min arba 0,05 – 4 ppm/10 min. Produktas naudojamas neskiestas arba, priklausomai nuo naudojamos įrangos, praskiestas nuo 0 iki 1000 l. Naudojamos produkto normos priklauso nuo vandens kelio (srovės greičio, tėkmės, drumstumo, temperatūros ir t.t.). Didesnes normas naudoti, kai vandenyje yra daugiau organinės medžiagos, dumblo, planktoninių dumblių, druskos, gausi vandens augalija ir/arba siekiant užtikrinti didesnį efektyvumą. Produkto poveikis: 4-24 val. po panaudojimo.