

# **Impatto di *Bacillus thuringiensis israelensis* sugli ecosistemi del piano di Magadino, dopo dieci anni di applicazione, per il controllo della zanzara *Aedes vexans* : resoconto della bibliografia**

Autor(en): **Chappuis, Sophie**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bollettino della Società ticinese di scienze naturali**

Band (Jahr): **87 (1999)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-1003281>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

---

# Impatto di *Bacillus thuringiensis israelensis* sugli ecosistemi del Piano di Magadino, dopo dieci anni di applicazione, per il controllo della zanzara *Aedes vexans* Resoconto della bibliografia

Sophie Chappuis

Gruppo di Ricerca per il Monitoraggio del B.t.i. nell'Ecosistema (GRIMOB)  
Fondazione Bolle di Magadino, Casa Comunale, 6573 Magadino  
Istituto Cantonale Batteriosierologico, Via Ospedale 6, 6904 Lugano

---

**Riassunto:** Il livello del lago Maggiore è soggetto a tante fluttuazioni. Le regioni adiacenti sono dunque regolarmente inondate durante i periodi di forti precipitazioni. Come conseguenza alle inondazioni, la zanzara *Aedes vexans* s'è sviluppata fortemente ed è diventata una vera piaga per la popolazione locale e per i turisti. Dal 1988, preparazioni commerciali a base del batterio *Bacillus thuringiensis israelensis* sono state usate regolarmente per limitare il numero di zanzare.

*Bacillus thuringiensis* produce delle proteine insetticide chiamate endotossine delta e sintetizzate durante la fase di sporulazione. Dopo ingestione, queste tossine distruggono l'intestino delle zanzare.

Sebbene *B. thuringiensis israelensis* sia stato considerato come non tossico per gli organismi non bersaglio, la sua applicazione a lungo termine sul Piano di Magadino presenta un'eccellente opportunità per studiare i suoi effetti eventuali. La ricerca sarà condotta per determinare la dinamica delle spore e delle endotossine delta.

**Abstract:** The water level of the Lago Maggiore is object of extreme fluctuations. The adjacent regions are therefore regularly flooded during long lasting raining periods. As a consequence of the regular flooding, the mosquito *Aedes vexans* has become a real threat for the population and for the tourists. From 1988, commercial preparations of *Bacillus thuringiensis israelensis* have been regularly used to limit the number of mosquitoes.

*Bacillus thuringiensis* produces insecticide proteins called delta endotoxins and synthesised during the sporulation phase. Upon ingestion, these toxins destroy the mosquito midgut.

Although *B. thuringiensis israelensis* has an excellent safety record for the non-target organisms, its long term application in the Plain of Magadino is an excellent opportunity to study its eventual effects. The research will be conducted to determine the dynamic of the spores and of the delta endotoxins.

---

## INTRODUZIONE

La topografia del cantone Ticino è assai particolare, poiché sulla maggior parte della sua superficie i laghi si alternano con le montagne, creando dei paesaggi in contrasto come per esempio la neve sulle cime montagnose e le palme sulle rive lacustri. Questa geografia tipica, abbinata ad un microclima insubrico favorevole, hanno fatto di questo cantone una delle regioni turisticamente più importanti della Svizzera. Il turismo rappresenta un settore vitale per l'economia del Ticino.

Un'area particolarmente importante per il turismo ticinese si situa ai bordi della riva nord del Lago Maggiore. È in questa zona che sfociano i tre fiumi Ticino, Verzasca e Maggia. Prima di immettersi nel lago, il Ticino attraversa il Piano di Magadino su tutta la sua lunghezza. Le Bolle di Magadino, una riserva naturale d'importanza nazionale e internazionale, è situata sui due lati dell'estuario formato dal Ticino. Questa riserva è il santuario di rare specie animali e vegetali, in particolare di uccelli migratori. La riserva delle Bolle di Magadino, così come certe regioni agricole del Piano di Magadino, sono periodicamente inondate. Le cause di tali inondazioni sono determinate da una parte da forti precipitazioni (che per di più possono prolungarsi nel tempo), dall'altra dal sistema di regola-

zione artificiale del livello del Lago Maggiore tramite la diga di Sesto Calende (Italia).

L'inondazione periodica del Piano di Magadino ha creato vasti habitat favorevoli allo sviluppo della zanzara *Aedes vexans*. Infatti, a metà degli anni 1980, il numero di *Aedes vexans* aumentò a tal punto, che questa zanzara era diventata un flagello per la popolazione locale così come per i turisti. La qualità di vita era dunque seriamente toccata e l'economia turistica della regione subì delle perdite considerevoli (FOUQUE 1991). Risultò dunque indispensabile controllare la popolazione delle zanzare *Aedes vexans* con il solo agente accettabile per una zona naturale, il batterio *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915, sottospecie *israelensis* (LÜTHY 1987). Nel 1987 furono eseguiti dei lavori di studio sulle zanzare del Piano di Magadino e sul loro trattamento eventuale con *B. thuringiensis israelensis* (LÜTHY 1987). In seguito ai risultati molto positivi ottenuti durante questo studio (sterminio delle larve di zanzara dopo 24 ore), la lotta anti-zanzare fu pianificata ed applicata a partire dal 1988 da un apposito gruppo di lavoro nominato dal Consiglio di Stato (ANONIMO 1988). In seguito, l'efficacia del trattamento poté essere ottimizzata grazie all'applicazione aerea di granuli contenenti il ceppo *B. thuringiensis israelensis*, sopra le zone toccate dalle inondazioni e infestate dalle larve di zanzare. Quattordici comuni della

regione di Magadino e delle rive del Lago Maggiore hanno collaborato fin dall'inizio delle applicazioni (ANONIMO 1988). Così, durante l'ultimo decennio, questo prodotto insetticida a base di *B. thuringiensis israelensis* fu utilizzato regolarmente e con successo sui siti di sviluppo delle larve di *Aedes vexans*.

Dopo 10 anni di trattamenti continui con *B. thuringiensis israelensis* sul Piano di Magadino, si è reputato necessario organizzare un controllo ristretto e permanente degli effetti a lungo termine sull'ambiente. Dopo uno studio della letteratura relativa a questo batterio, un progetto di ricerca è stato avviato, con lo scopo di ottenere informazioni complete sul destino e sulla dinamica delle componenti attive di *B. thuringiensis israelensis* applicate alle regioni periodicamente inondate del Piano di Magadino. Lo scopo del presente contributo è quello di riassumere le conoscenze attuali sull'argomento.

## LA ZANZARA *Aedes vexans*

La specie di zanzara *Aedes vexans* (Fig. 1) appartiene alla famiglia dei Culicidi, all'ordine dei Ditteri e al sott'ordine dei Nematoceri. La sua fisiologia così come il suo modo di svilupparsi fanno sì che la si incontri soprattutto nelle regioni toccate da inondazioni estese e temporanee come in aree palustri e in pozze temporanee (FOUQUE 1991). Le popolazioni di zanzare del Piano di Magadino sono dunque nettamente dominate da questa specie, responsabile principale delle pullulazioni osservabili nelle aree fuori zona edificabile.

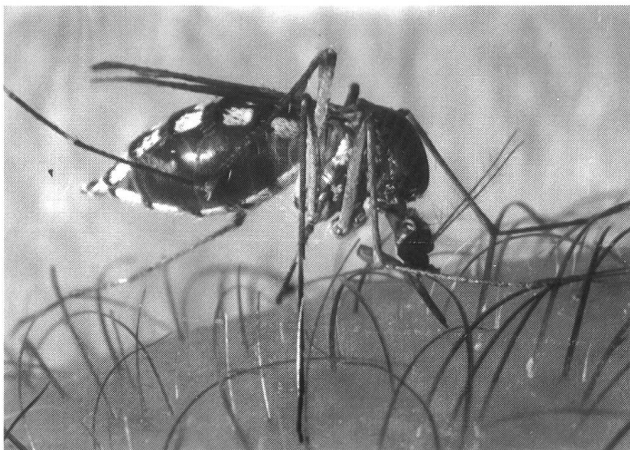


Fig. 1- *Aedes vexans*, adulte femmina. Fotografia gentilmente fornita dal Dott. Roland Kuhn (Mainz, Germania).

Le femmine adulte, capaci di percorrere parecchi chilometri e le cui punture sono dolorose, depongono le loro uova nelle regioni umide e ricche di materie organiche (Fig. 2). Dopo aver raggiunto il loro primo stadio embrionale, le uova entrano in un periodo di latenza finché un'inondazione le ricopre d'acqua e le induce così a schiudersi. Il fattore che dà inizio allo schiudersi delle uova sembra essere la mancanza di ossigeno (BASSI 1995). Le zanzare entrano così nel loro periodo larvale e proseguono il loro sviluppo sulla superficie dell'acqua. Quattro sono gli stadi

larvali, durante i quali la specie è capace di nutrirsi tramite filtraggio dell'acqua e nutrendosi dei microrganismi e della microfauna presenti. La durata dello sviluppo delle larve dipende principalmente dalla temperatura dell'acqua. Essa è di 6-7 giorni a 30°C, e di 21-23 giorni a 15°C (LÜTHY 1987). Una larva è incapace svilupparsi a meno di 12°C (FOUQUE 1991). Una diminuzione della temperatura dell'acqua corrisponde anche ad una diminuzione della capacità di filtrare nutrimento dalle larve di *Aedes vexans* (BECKER & MARGALIT 1993). Dopo i 4 stadi larvali, segue lo stadio di pupa, sempre legato obbligatoriamente all'ambiente acquatico, ma caratterizzato dall'incapacità di nutrirsi. La metamorfosi delle pupe genera degli adulti maschi poco mobili e delle femmine molto mobili e pungenti, la cui presa di sangue è necessaria per la maturazione delle uova prima della loro deposizione. Nella valle superiore del Reno, in Germania, si è osservato che le zanzare *A. vexans* volano soprattutto 30 minuti prima e 30 minuti dopo il tramonto (BOGGASCH & BERNAUER 1991). Esse possono essere pure importanti vettori di malattie quali la malaria, l'oncocercosi o la filariosi (BRAUN 1994).

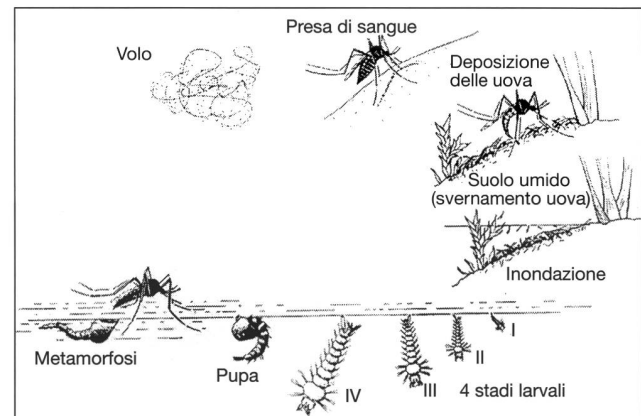


Fig. 2 - Ciclo di sviluppo della zanzara *Aedes vexans*. Disegno gentilmente fornito dal Dott. Roland Kuhn (Mainz, Germania).

## *BACILLUS THURINGIENSIS* E *BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENSIS*

### Generalità

*Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 è un batterio Gram+ aerobico (anaerobico facoltativo). Fintanto che le condizioni ambientali e nutritive lo permettono, il bacillo segue un ciclo normale di sviluppo e di moltiplicazione. Non appena le condizioni diventano poco favorevoli, *B. thuringiensis* entra in una fase di sporulazione (Fig. 3) la cui finalità è la produzione di una cellula chiamata spora. Questa può resistere a condizioni ambientali estreme come a la mancanza di materie nutritive o temperature molto elevate. Un batterio può restare in questa fase di latenza per diversi anni (HUBER & LÜTHY 1981). Quando la spora è di nuovo in contatto con un ambiente favorevole, essa germina e ridiventa una cellula vegetativa capace di moltiplicarsi. La particolarità di *B. thuringiensis* è la sua capacità, parallelamente e in maniera sincrona alla sporulazione, di produrre un'inclusione cristallina (HUBER & LÜTHY 1981), formata

da uno o più tipi di proteine a dipendenza della sottospecie di *B. thuringiensis*. Questo cristallo, una volta attivato, è tossico contro diverse larve di insetti. Le proteine che costituiscono l'inclusione cristallina sono chiamate endotossine delta.

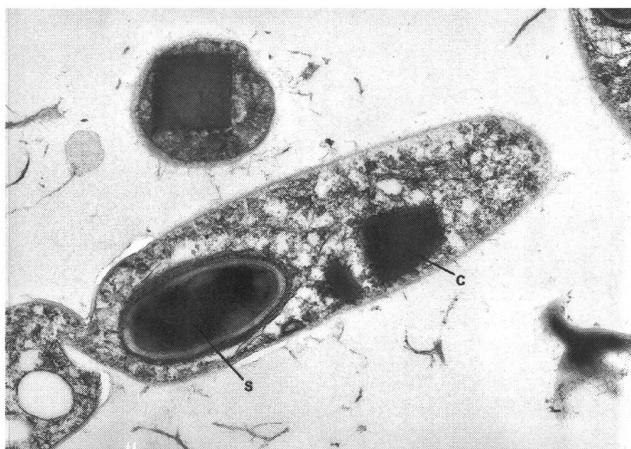


Fig. 3: *Bacillus thuringiensis kurstaki* in fase di sporulazione. S: spora in formazione; C: cristallo insetticida. Fotografia gentilmente fornita dal Prof. Peter Lüthy (EPF, Zurich).

*Bacillus thuringiensis* fu isolato da un lepidottero in Germania, nella provincia di Turingia, e descritto da Berliner nel 1915 come *Bacillus thuringiensis* (MILNER 1994). Lo stesso organismo era precedentemente stato descritto da ISHIWATA nel 1902 come *Bacillus sotto* in Giappone, dove aveva provocato la morte di una popolazione di bachi da seta, ma questa descrizione non era conosciuta da Berliner e *Bacillus thuringiensis* è attualmente il nome accettato da tutti (MILNER 1994). Diverse sottospecie di *B. thuringiensis*, aventi degli spettri di tossicità variabili sui coleotteri e sui lepidotteri, furono scoperti e rapidamente utilizzati come insetticidi biologici per le foreste e per i terreni agricoli. Una nuova sottospecie fu scoperta da GOLDBERG e MARGALIT nel 1976 (HUBER & LÜTHY 1981, LÜTHY 1986, MARGALIT 1990), e descritta da DE BARJAC nel 1978 (DE BARJAC 1978, LÜTHY 1986). Essa fu chiamata *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Bacillus thuringiensis israelensis* è un batterio molto tossico contro i ditteri, e la sua scoperta arrivò nel momento opportuno in cui le zanzare ed i simuliidi rinforzavano progressivamente e rapidamente la loro resistenza contro i pesticidi chimici (SCHNEPF *et al.* 1998).

Fino al 1986, 30 sottospecie e più di 800 ceppi di *B. thuringiensis* furono registrati (LÜTHY 1986) e nel 1998, non meno di 200 prodotti a base di questo bacillo furono registrati negli Stati Uniti (SCHNEPF *et al.* 1998). Certi *B. thuringiensis* sono tossici contro i lepidotteri, per esempio *B. thuringiensis kurstaki* o *B. thuringiensis aizawai*, altri (p. es. *B. thuringiensis morrisoni*) esercitano la loro attività insetticida sui coleotteri. Pubblicazioni recenti descrivono ceppi di *B. thuringiensis* attivi contro gli insetti degli ordini imenotteri, omotteri, ortotteri e mallofagi, così come contro i nematodi, gli acari o i protozoi (SCHNEPF *et al.* 1998). La sottospecie che ci interessa è *Bacillus thuringiensis israelensis*, il cui spettro d'attività è molto ristretto e limitato a poche famiglie del sott'ordine dei nematoceri (ordine dei ditteri).

La più grande suscettibilità a *B. thuringiensis israelensis* è stata mostrata dagli insetti delle famiglie culicidi e simuliidi (LÜTHY & EBERSOLD 1981). Tra questi generi, 12 specie hanno mostrato una sensibilità molto forte durante uno studio sperimentale effettuato nel 1987 (WRAIGHT *et al.* 1987).

A dosi maggiori si è potuto osservare un effetto negativo anche sui ditteri della famiglia dei Chironomidi (ALI 1980, MIURA *et al.* 1980, GARCIA *et al.* 1981, ROGATIN & BAIZHANOV, 1984).

Oltre alla sua azione molto specifica sulle sue specie bersaglio, *B. thuringiensis* sembrerebbe rispondere a tutte le esigenze di biosicurezza, poiché in generale, non è stato osservato alcun effetto nefasto contro gli organismi non mirati («non-target») come i mammiferi, gli uccelli, i pesci, i vertebrati acquatici e non acquatici, gli invertebrati o l'uomo (ANONIMO 1991, BECKER & MARGALIT 1993, SCHNEPF *et al.* 1998). Una pubblicazione recente (BUTLER & REICHHARDT 1999) evidenzia il fatto che sulla tematica degli organismi non mirati dalla tossina di *B. thuringiensis* prodotta dal mais trasgenico (mais-Bt), i ricercatori sono divisi. In effetti, BUTLER & REICHHARDT (1999) descrivono come per esempio William Hutchison della Società Americana di Entomologia non abbia trovato nessuna variazione nel numero di insetti «utili» dopo campionamenti effettuati sia in culture di mais-Bt che di mais ordinario. Angelika Hilbeck della Stazione Federale di Ricerche in Agroecologia e agricoltura (Zurigo) ha invece trovato che in laboratorio, il neurottero Lacewing, un insetto «utile» esplica un'elevato tasso di mortalità quando si nutre di larve di insetti mirati che si sono nutrite di a loro volta mais-Bt, in confronto a larve nutrite con mais ordinario (BUTLER & REICHHARDT 1999).

È stato grazie allo spettro d'attività molto ristretto di *B. thuringiensis* che dal 1938, il primo prodotto insetticida, la Sporeina, fu commercializzato in Francia (TE GIFFEL *et al.* 1997, MILNER 1994). Da allora, *B. thuringiensis* è diventato la fonte del pesticida biologico più largamente usato nel mondo (CARLSON & KOLSTO 1993). Dopo la scoperta di *B. thuringiensis israelensis* nel 1976 e grazie ai numerosi test che ne garantivano la sicurezza ambientale, l'agenzia americana di protezione dell'ambiente ha autorizzato la sua utilizzazione come insetticida biologico a partire dal 1981 (BECKER & MARGALIT 1993).

Gli insetticidi chimici sono ancora di gran lunga i pesticidi più largamente utilizzati nel mondo. Tuttavia, un certo numero di problemi sono apparsi progressivamente, come per esempio una forte capacità d'inquinamento per l'ambiente, così come lo sviluppo di specie d'insetti resistenti (LIU *et al.* 1996). Al contrario, i prodotti a base di *B. thuringiensis* sono riconosciuti come sicuri e non inquinanti. Essi possiedono però qualche svantaggio come una diminuzione rapida della loro efficacia dopo l'applicazione, una forte sensibilità agli ultravioletti, e uno spettro d'attività non sempre alto per tutte le specie di zanzare (LIU *et al.* 1996). I problemi incontrati con gli insetticidi chimici hanno provocato una domanda crescente di insetticidi a base di *B. thuringiensis*, quindi un aumento del loro interesse commerciale e un miglioramento progressivo della qualità

dei prodotti (BAUER 1995). Così, nel 1995, le vendite mondiali di questi pesticidi biologici si elevavano a 90 milioni di dollari americani, ossia il 2% del mercato globale degli insetticidi. La distribuzione mondiale annuale era di 2,3 milioni di kg (SCHNEPF *et al.* 1998).

### Habitat

Attualmente, grazie a numerose ricerche, *B. thuringiensis* è molto conosciuto dagli entomologi, dagli ecologi, dai microbiologi e dai biologi molecolari. Ciononostante un tema ancora oggetto di numerose controversie è rappresentato dalla definizione dell'habitat naturale di *B. thuringiensis*. Sembra che questo bacillo sia adattato a diversi ambienti. Degli organismi sono stati isolati nel mondo intero e trovati in habitat variabili come i suoli, gli insetti, la polvere, le foglie di alberi a foglie caduche o le conifere (SCHNEPF *et al.* 1998). Molti pensano che *B. thuringiensis* trovi il suo habitat naturale nel suolo (MARTIN *et al.* 1985, MARTIN & TRAVERS 1989, JARRETT & STEPHENSON 1990), composto da circa lo 0,05% dei batteri capaci di sporulare (LÜTHY & EBERSOLD 1981). Inoltre, uno studio d'isolamento di *B. thuringiensis* tramite campionatura di suoli (con diversi habitat, in regioni possedenti un numero variabile di insetti) ha mostrato che la presenza d'insetti non predice forzatamente la presenza di *B. thuringiensis* in un campione particolare ma che la maggior parte dei *B. thuringiensis* isolati era in associazione con degli insetti (MARTIN & TRAVERS 1989). Altri autori hanno osservato che certi *B. thuringiensis*, e più in particolare la sottospecie *israelensis* non erano sempre associati agli insetti, concludendo che non era evidente che *B. thuringiensis israelensis* fosse un entomopatogeno naturale (MILNER 1994).

Mentre gli argomenti precedenti sembrano dimostrare che *B. thuringiensis* è piuttosto un ospite naturale del suolo, delle esperienze che studiano la persistenza, cioè lo sviluppo o la moltiplicazione del bacillo dopo l'applicazione nell'ambiente tendono a provare il contrario. In effetti, numerose esperienze d'applicazione di *B. thuringiensis*, segnatamente di *B. thuringiensis israelensis* in condizioni naturali o artificiali hanno provato che le spore erano incapaci di germinare nel suolo (PETRAS & CASIDA 1985, LÜTHY & STUDER 1986, OHANA *et al.* 1987). Nel 1988 un'esperienza su prodotti a base di *B. thuringiensis israelensis* ha pure dimostrato che il batterio non aveva alcuna attività residuale sulla superficie dell'acqua dopo 24 ore (GHARIB & HILSENHOFF 1988). La persistenza di *B. thuringiensis* è bassa, cioè l'attività delle sue endotossine delta diminuisce dopo qualche giorno, per aggregazione alle particelle del suolo o per assorbimento da parte della vegetazione (LÜTHY & STUDER 1986, GELERNTER & SCHWAB 1993). Al contrario, quando si osserva l'attività di *B. thuringiensis* negli insetti, sembrerebbe che dopo l'azione insetticida della tossina, le spore di *B. thuringiensis* siano capaci di germinare, di moltiplicarsi ed eventualmente di sporulare di nuovo, sviluppandosi nell'insetto in maniera saprofitica (ANDREWS *et al.* 1987). Uno studio del 1985 sull'azione di *B. thuringiensis israelensis* sugli insetti *Aedes aegypti* e *Aedes vexans* ha di-

mostrato una germinazione e una crescita di *B. thuringiensis israelensis* nelle larve viventi, morenti o morte (ALY 1985). Per esempio, 24 ore dopo la morte delle larve, gli autori osservavano meno spore di *B. thuringiensis israelensis* ma più cellule vegetative nei cadaveri, ciò che dimostrava la loro capacità di germinare e di moltiplicarsi. Alcuni autori hanno perfino osservato la produzione di spore e di cristalli di *B. thuringiensis israelensis* nelle larve morte (OHANA *et al.* 1987).

Ricapitolando, *B. thuringiensis* potrebbe essere un entomopatogeno, un abitante della vegetazione, un microorganismo del suolo o tutto contemporaneamente. I dati disponibili attualmente sono ancora insufficienti per permetterci di trarre delle conclusioni su questo soggetto, sebbene *B. thuringiensis* sembra essere stato isolato più facilmente a partire da cadaveri d'insetti o da materiali in decomposizione che direttamente a partire dal suolo (SCHNEPF *et al.* 1998). Tuttavia, attualmente, si considera ancora *B. thuringiensis* come un patogeno solamente opportunistico degli insetti (SCHNEPF *et al.* 1998).

### Genetica di *Bacillus thuringiensis*

#### Cromosoma

La dimensione del genoma di *B. thuringiensis* può variare da 2.4 a 5.7 milioni di coppie di basi (SCHNEPF *et al.* 1998). Per esempio, il cromosoma del ceppo *B. thuringiensis thuringiensis* HD-2 è di 5.4 milioni di coppie di basi (CARLSON & KOLSTO 1993), mentre quella di *B. thuringiensis* Berliner, 1915 è di 5.7 milioni di coppie di basi (CARLSON *et al.* 1996).

Fra i geni situati sul cromosoma di *B. thuringiensis* si trovano quelli codificanti per gli ARN ribosomici (ARN<sub>r</sub>), tra cui l'ARN<sub>r</sub> 16S di una lunghezza di 1500 nucleotidi, e l'ARN<sub>r</sub> 23S che misura 3000 nucleotidi (AMANN *et al.* 1995). Queste due molecole di ARN<sub>r</sub> sono costituite da campi a sequenze molto conservate, separate da campi a regioni molto variabili (HEAD *et al.* 1998). Queste molecole di ARN<sub>r</sub> (16S e 23S) contengono informazioni a sufficienza per delle analisi filogenetiche, ciò ha permesso di fare un grande passo avanti nella conoscenza dell'evoluzione delle specie (AMANN *et al.* 1995).

#### Plasmidi

##### Generalità

I plasmidi sono delle piccole molecole di ADN a catena doppia, che si trovano generalmente sotto forma circolare. Possiamo trovare dei plasmidi nei batteri e nei lieviti, dove essi si riproducono indipendentemente dal cromosoma. Tutte le sottospecie di *B. thuringiensis* possiedono dei plasmidi (WORKMANN *et al.* 1986) la cui dimensione varia da 1.5 a 180 Mega-Daltons (MDaltons) ed il cui numero di coppie va da 2 a 17 per cellula (ANDREWS *et al.* 1987).

Fin dagli anni '80, si pensò che i geni codificanti per la tossina insetticida di *B. thuringiensis* (l'endotossina delta), dovevano essere posizionati su dei plasmidi. In effetti delle esperienze con dei ceppi di *B. thuringiensis thu-*

*ringiensis* HD-2, incapaci di produrre l'endotossina delta, hanno mostrato che questa carenza era legata alla perdita di un grande plasmidio di 75 MDaltons (GONZALES & CARLTON 1980). Si dimostrò pure che l'assenza di produzione dell'endotossina delta non significava forzatamente assenza di tutti i plasmidi (GONZALES & CARLTON 1980). Esisteva dunque una relazione tra questi elementi di ADN extracromosomico e la produzione della tossina, e sembrava che in ogni ceppo di *B. thuringiensis*, un solo plasmidio fosse implicato nella sintesi di quest'endotossina delta (GONZALES *et al.* 1981, ANDREWS *et al.* 1987). Inoltre, la dimensione del plasmidio portante l'informazione di tossicità era variabile a seconda dei ceppi di *B. thuringiensis* (GONZALES *et al.* 1981, WORKMANN *et al.* 1986). Dal 1982, invece di suggerire, si affermava che i geni strutturali codificanti per l'endotossina delta erano situati sui plasmidi (GONZALES *et al.* 1982, WORKMANN *et al.* 1986). Dal 1987 invece, delle esperienze hanno potuto mostrare che taluni geni codificanti per la tossina potevano ugualmente essere trovati sul cromosoma di

certi ceppi di *B. thuringiensis* (ANDREWS *et al.* 1987, PREFONTAINE *et al.* 1987, BAUM & MALVAR 1995). Per spiegare la variabilità nella dimensione dei plasmidi e nel posizionamento dei loro geni, taluni autori hanno suggerito che dei riarrangiamenti (delezioni, inserzioni, ricombinazioni) si svolgevano da una parte al livello dei plasmidi (GONZALES *et al.* 1981), d'altra parte tra plasmidi e cromosomi.

#### Organizzazione dei geni codificanti per l'endotossina delta

I geni codificanti per le proteine cristalline insetticide di *B. thuringiensis* sono chiamati geni *cry* e nel 1989 sono stati classificati da HÖFTE e WHITELEY secondo la loro tossicità verso gli insetti (Tab. 1, HÖFTE & WHITELEY 1989). Così, i geni *cryI* codificano per le proteine tossiche verso i lepidotteri, i geni *cryII* danno delle tossine allo stesso tempo contro i lepidotteri e i ditteri, i geni *cryIII* codificano per le endotossine delta attive contro i coleotteri e i geni *cryIV* per le tossine attive verso i ditteri (CRICKMORE *et al.* 1998).

Gene		Proteina				
Vecchio nome <sup>a</sup>	Nuovo nome <sup>b</sup>	Peso molec. (kDa)	Bersaglio <sup>c</sup>	Forma	Proprietà	Referenze
<i>cryI</i>			L			CRICKMORE <i>et al.</i> 1998
<i>cryII</i>			L / D			CRICKMORE <i>et al.</i> 1998
<i>cryIII</i>			C			CRICKMORE <i>et al.</i> 1998
<i>cryIVA</i>	<i>cry4Aa</i>	134.4	D	Sferica ad emisferica	Piccola inclusione ad alta densità elettronica	BOYLE & DEAN 1990 CRICKMORE <i>et al.</i> 1998 FEDERICI <i>et al.</i> 1990 LERECLUS <i>et al.</i> 1993 SEN <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup> WARD & ELLAR 1987 <sup>d</sup>
<i>cryIVB</i>	<i>cry4Ba</i>	127.8	D	Sferica ad emisferica	Piccola inclusione ad alta densità elettronica	BOYLE & DEAN 1990 CHUNGJATUPORNCHAI <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup> CRICKMORE <i>et al.</i> 1998 FEDERICI <i>et al.</i> 1990 LERECLUS <i>et al.</i> 1993 SEN <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup> TUNGPRADUBKUL <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup> YAMAMOTO <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup>
<i>cryIVC</i>	<i>cry10Aa</i>	77.8	D			CRICKMORE <i>et al.</i> 1998 LERECLUS <i>et al.</i> 1993 THORNE <i>et al.</i> 1986 <sup>d</sup>
<i>cryIVD</i>	<i>cry11Aa</i>	72.4	D	Rettangolare	Inclusione a densità elettronica moderata	ADAMS <i>et al.</i> 1989 <sup>d</sup> BOYLE & DEAN 1990 CRICKMORE <i>et al.</i> 1998 DONOVAN <i>et al.</i> 1988 <sup>d</sup> FEDERICI <i>et al.</i> 1990 LERECLUS <i>et al.</i> 1993
<i>cytA</i>	<i>cyt1Aa</i>	27.4	Non specifico	Arrotondata a poliedrica	Grande inclusione a bassa densità elettronica	CRICKMORE <i>et al.</i> 1998 EARP & ELLAR 1987 <sup>d</sup> GALJART <i>et al.</i> 1987 <sup>d</sup> LERECLUS <i>et al.</i> 1993 WAALWIJK <i>et al.</i> 1985 <sup>d</sup> WARD & ELLAR 1986 <sup>d</sup>
<sup>a</sup> Secondo HÖFTE & WHITELEY 1989		<sup>c</sup> L = lepidotteri; C = coleotteri; D = ditteri				
<sup>b</sup> Secondo CRICKMORE <i>et al.</i> 1998		<sup>d</sup> Referenze d'isolamento del gene				

Tab. 1- Geni codificanti per l'endotossina delta e proprietà delle proteine.

Oltre alle endotossine delta, la sottospecie *B. thuringiensis israelensis* possiede una proteina chiamata fattore emolitico e codificata dal gene *cytA*. Questa tossina si associa alle endotossine delta per formare il complesso cristallino. *Bacillus thuringiensis israelensis* possiede dunque quattro geni codificanti per quattro endotossine delta di dimensioni differenti (*cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC* e *cryIVD*) e un gene codificante per il fattore emolitico (*cytA*) (Tab. 1). È stato dimostrato che questi cinque geni sono situati su uno stesso plasmidio di 72 MDalton (LERECLUS *et al.* 1993, SCHNEPF *et al.* 1998). Il numero di copie di plasmidi portatori dei geni *cry* non è stato determinato, ma nella maggior parte dei ceppi di *B. thuringiensis*, deve essere basso, con forse qualche copia per cellula (BAUM & MALVAR 1995). Le prime clonazioni e sequenzaggi di un gene *cry* sono state fatte dal gruppo di HELEN WHITELEY nel 1981 (BROADWELL 1994). A poco a poco, le sequenze di differenti ceppi sono state ottenute (ANDREWS *et al.* 1987), ed i metodi attuali hanno permesso di ottenere il codice genetico più o meno completo di tutti i geni *cry* e *cyt* (SCHNEPF *et al.* 1998).

L'ipotesi che dei riarrangiamenti potevano aver luogo tra i geni codificanti per le proteine cristalline del *B. thuringiensis* (GONZALES *et al.* 1981) è rapidamente stata accettata, grazie alla scoperta, sui plasmidi portanti i geni *cry*, di elementi trasponibili, tra cui delle sequenze d'inserzione e dei trasposoni, che permettono la mobilità di questi geni (PREFONTAINE *et al.* 1987, BAUM & MALVAR 1995, LERECLUS *et al.* 1993, LERECLUS *et al.* 1984, KRONSTAD & WHITELEY 1984, SCHNEPF *et al.* 1998).

#### Trasferimento di plasmidi

I plasmidi batterici hanno la caratteristica di essere facilmente trasferiti da una cellula all'altra fra individui di una stessa specie, come pure di specie differenti. È il caso in particolare dei plasmidi di *B. thuringiensis* la cui frequenza di trasferimento è del 75% (GONZALES *et al.* 1982). Affinché questi trasferimenti si facciano tra i bacilli, deve esserci contatto tra la cellula donatrice e la cellula ricevente (WORKMANN *et al.* 1986, SEKAR 1990). I grandi e i piccoli plasmidi sono trasferibili in maniera equivalente tra ceppi di *B. thuringiensis* come pure da *B. thuringiensis* a *B. cereus* Frankland & Frankland, 1887 (SEKAR 1990, TE GIFFEL *et al.* 1997), ma sembrerebbe che i grandi plasmidi siano autotrasmissibili, mentre i piccoli siano trasferiti contemporaneamente ai grandi (LERECLUS *et al.* 1993). Inoltre, delle esperienze di trasferimento di plasmidi di ceppi *B. thuringiensis* in larve di lepidotteri hanno suggerito che il trasferimento può svolgersi anche in condizioni naturali, con delle frequenze simili alle esperienze di laboratorio (JARRETT & STEPHENSON 1990, SCHNEPF *et al.* 1998). Dei plasmidi di *B. thuringiensis* sono pure stati trasferiti in ceppi di *Bacillus subtilis* Ehrenberg, 1835 e di *Bacillus anthracis* Cohn, 1872 (JARRETT & STEPHENSON 1990). Si è ugualmente scoperto il set plasmidico di *B. thuringiensis israelensis* composto dai quattro geni *cry* così come dal gene *cyt* in sottospecie di *B. thuringiensis* diverse di *B. thuringiensis israelensis* (SCHNEPF *et al.* 1998). Osservato in laboratorio, il pro-

cesso di trasferimento orizzontale di geni *cry* tra le popolazioni di *B. thuringiensis* sembra dunque possibile pure in condizioni naturali.

#### Regolazione dei geni codificanti per l'endotossina delta

Il complesso di proteine cristalline raggiunge circa il 30% del peso secco di una coltura di *B. thuringiensis* in sporulazione (MILNER 1994). La formazione di cristallo implica dunque l'accumulazione di un grande numero di endotossine delta (AGAISSE & LERECLUS 1995). Per accumulare una grande quantità di proteine, una strategia consiste nell'esprimere il gene corrispondente tramite un promotore forte in una cellula che non si stia dividendo, dunque di evitare alle proteine la diluizione causata dalla divisione cellulare (AGAISSE & LERECLUS 1995). È quello che succede in *B. thuringiensis*, dove la formazione del cristallo avviene in fase stazionaria (AGAISSE & LERECLUS 1995), cioè durante la sporulazione (ANDREWS *et al.* 1987, HUBER & LÜTHY 1981, LÜTHY & STUDER 1986, BAUM & MALVAR 1995). Questi risultati sono stati dimostrati in *Bacillus thuringiensis kurstaki*, dove l'ARN messaggero (ARNm) specifico dei geni codificanti per la proteina cristallina, è presente solamente nelle cellule in sporulazione ed esclusivamente durante i periodi di sintesi del cristallo (ANDREWS *et al.* 1987). Dei risultati simili sono stati ottenuti per *B. thuringiensis israelensis* (ANDREWS *et al.* 1987).

#### Nuova nomenclatura dei geni *cry*

Nel 1989, HÖFTE & WHITELEY hanno proposto una nomenclatura sistematica per classificare i 14 tipi di proteine cristalline conosciute, secondo la loro tossicità nei confronti di differenti ordini d'insetti (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Da allora, il numero di geni conosciuti è passato da quattordici a un centinaio, e la revisione della nomenclatura si è rivelata necessaria (CRICKMORE *et al.* 1998, SCHNEPF *et al.* 1998). Così, nel 1998, CRICKMORE ed i suoi collaboratori hanno proposto una nuova nomenclatura non più basata sulla tossicità delle proteine batteriche, ma sulla divergenza nell'evoluzione dei geni gli uni nei confronti degli altri (Tab. 1). Questo evita dunque ai ricercatori di testare ogni nuova proteina su un gran numero di insetti, prima di poterla classificare. Per facilitare la lettura, i capitoli seguenti designano ancora i geni secondo la vecchia nomenclatura di HÖFTE & WHITELEY.

#### Endotossina delta

##### Morfologia del cristallo

Le proteine insetticide di *B. thuringiensis* sono organizzate in cristalli, ciò sembra conferire loro una migliore resistenza alle degradazioni proteolitiche (SCHNEPF *et al.* 1998). La biosintesi del cristallo insetticida si svolge durante il processo di sporulazione (HUBER & LÜTHY 1981, LÜTHY & STUDER 1986, BAUM & MALVAR 1995), essa comincia circa 4 ore dopo l'inizio di quest'ultima e raggiunge il suo massimo circa 3 ore più tardi (ANDREWS *et al.* 1987). Una volta formato, questo insieme proteico rappresenta circa il 30% del peso secco di una coltura di cellule in sporulazione (MILNER 1994). All'analisi al mi-

croscopio elettronico, il cristallo di *B. thuringiensis israelensis* si presenta circondato da un involucro, ed è suddiviso in 3 frammenti. Ogni frammento presenta un proprio involucro di densità elettronica variabile (LÜTHY & STUDDER 1986, FEDERICI *et al.* 1990). Contrariamente alle altre sottospecie di *B. thuringiensis*, il cristallo della sottospecie *israelensis* è sferico ed i 3 frammenti o inclusioni presentano proprietà diverse (Tab. 1, FEDERICI *et al.* 1990).

#### Struttura dell'endotossina delta

Come si è visto precedentemente, il cristallo di *B. thuringiensis israelensis* è composto da quattro geni codificanti per quattro endotossine delta (*cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC* e *cryIVD*) e da un gene codificante per il fattore emolitico (*cytA*, Tab. 1). Questi cinque geni sono situati sullo stesso plasmidio di 72 MDaltons (LERECLUS *et al.* 1993, SCHNEPF *et al.* 1998).

Per poter agire sulle cellule epiteliali intestinali, il cristallo di *B. thuringiensis* deve essere attivato per solubilizzazione e proteolisi tramite il liquido intestinale delle larve d'insetti. Una volta attivata, l'endotossina delta *CryIVD* è di 30 kDaltons mentre *CryIVA* e *CryIVB* sono scisse al livello delle loro parti N- e C-terminali, per produrre delle tossine di 60 e 65 kDaltons rispettivamente (LERECLUS *et al.* 1993).

Presa separatamente, ciascuna delle cinque proteine del cristallo di *B. thuringiensis israelensis* ha un grado di tossicità variabile contro le zanzare (almeno le specie *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens*, LERECLUS *et al.* 1993), ma nessuna è così tossica come il cristallo stesso (FEDERICI *et al.* 1990). Sembra dunque esserci un effetto sinergico delle differenti tossine, quando sono raggruppate (BECKER & MARGALIT 1993, GELERNTER & SCHWAB 1993, LERECLUS *et al.* 1993). Inoltre, esperienze di tossicità fatte su tre specie di zanzare hanno mostrato che il polipeptide *CytA* non era né essenziale alla tossicità del cristallo, né specifico (LERECLUS *et al.* 1993, SCHNEPF *et al.* 1998). Esso esercitava il suo effetto tossico come un detergente, cioè perturbando in maniera generalizzata la membrana cellulare (SCHNEPF *et al.* 1998).

#### Modo d'agire dell'endotossina delta di *B. thuringiensis israelensis* sulla zanzara *Aedes vexans*

L'epitelio intestinale della larva è il primo bersaglio delle endotossine delta (LÜTHY & EBERSOLD 1981). La loro specificità suggerisce che dei ricettori o altri componenti della membrana cellulare sono implicati esclusivamente dall'organismo bersaglio (LÜTHY & EBERSOLD 1981). Il meccanismo d'azione delle proteine *Cry* necessita innanzitutto la solubilizzazione del cristallo nell'intestino della larva grazie al liquido intestinale alcalino. In seguito, la sfaldatura proteolitica delle protossine (endotossine delta inattive), grazie a delle proteasi intestinali, da come risultato delle proteine attive, le tossine (FEDERICI *et al.* 1990, BAUER 1995, SCHNEPF *et al.* 1998). Una volta attivate, le endotossine delta si legano ai ricettori specifici della membrana intestinale (grazie alle loro parti C-

terminali) e le parti N-terminali idrofobe si inseriscono nella membrana, formando dei buchi o dei pori (BAUER 1995, SCHNEPF *et al.* 1998). Il legame delle tossine è un processo in due tappe, una reversibile e l'altra irreversibile. La fase irreversibile necessita l'inserimento dei domini idrofobi di eliche alfa nella membrana, rendendo così le tossine insensibili alle proteasi ed agli anticorpi monoclonali (SCHNEPF *et al.* 1998).

L'intestino viene reso permeabile. L'uscita di liquido intestinale dall'intestino e l'entrata di emolinfa nell'intestino paralizza il sistema digestivo della larva. Inoltre, si è visto che *B. thuringiensis* può utilizzare la larva come ospite occasionale (ALY 1985, SCHNEPF *et al.* 1998), ciò significa che il batterio è capace di germinare e di moltiplicarsi nella larva, provocandovi una setticemia e poi la morte dell'insetto (BAUER 1995).

#### *Bacillus thuringiensis* e altri *Bacillus*

Nel genere *Bacillus*, le specie *thuringiensis*, *cereus*, *mycoides* Flügge, 1886, *anthracis* sono geneticamente molto vicine le une alle altre (ANDREWS *et al.* 1987). Il criterio principale per differenziare *B. thuringiensis* dalle altre tre specie è la sua capacità di produrre il complesso cristallino insetticida (ANDREWS *et al.* 1987, TE GIFFEL *et al.* 1997). Tuttavia, degli stipiti di *B. thuringiensis* incapaci di produrre il cristallo non hanno potuto essere differenziati dalla specie *B. cereus* (MILNER 1994), un batterio comunemente incontrato nel suolo. Ciò ha suscitato delle discussioni tra i batteriologi e molti considerano che *B. thuringiensis* è solamente una variante di *B. cereus*.

Delle esperienze d'ibridazione ADN/ADN (SOMERVILLE & JONES 1972) hanno confermato l'impossibilità di distinguere *B. thuringiensis* da *B. cereus*. In un altro studio (SEKI *et al.* 1978), gli autori hanno trovato tra il 54 e l'80% di omologia fra tre ceppi di *B. thuringiensis*, ed un ceppo di *B. cereus*. Questi stessi autori indicano che *B. thuringiensis* potrebbe costituire una specie unica con *B. cereus*. Per rafforzare questa osservazione, delle esperienze di costruzione di una carta fisica di *B. thuringiensis* grazie a degli enzimi di restrizione (CARLSON & KOLSTO 1993), hanno mostrato che *B. thuringiensis* era così vicino a *B. cereus* come lo sarebbero due ceppi di *B. cereus* tra di loro. Altre esperienze di omologia di sequenze di ADN hanno mostrato da 50 a 100% di omologia tra diversi ceppi delle quattro specie *B. anthracis*, *cereus*, *mycoides* e *thuringiensis* (PRIEST *et al.* 1994). Questo stesso autore afferma che queste quattro specie sono considerate come un solo gruppo fenotipico e che esse hanno delle sequenze di ARN ribosomico 16S altamente conservate. Solo gli importanti attributi patogenici di *B. anthracis* e di *B. thuringiensis* sono considerati come sufficienti per mantenere uno statuto di specie separate per questi batteri, rispetto ai loro omologhi *B. cereus* e *B. mycoides* (PRIEST *et al.* 1994). Un'esperienza d'ibridazione con dei macroframmenti di restrizione ha pure mostrato che la regione contenente i geni codificanti per l'ARN ribosomico era simile nei ceppi *B. thuringiensis* Berliner, 1915 e *B. cereus* ATCC 14579, confermando così che questa regione è



conservata tra i cromosomi di *B. thuringiensis* e *B. cereus* (CARLSON *et al.* 1996). Un tentativo di distinzione tra *B. cereus* e *B. thuringiensis* tramite l'analisi della regione variabile V1 dell'ARN ribosomico 16S (TE GIFFEL *et al.* 1997), ha permesso la differenziazione di tutti i ceppi di riferimento, ma ha dato 3 risultati sospetti in un totale di 14 campioni. Dal punto di vista biochimico, le cose non sono più chiare, poiché neppure i profili degli zuccheri strutturali presenti nelle cellule vegetative e delle spore permettono di fare una differenza tra *B. cereus* e *B. thuringiensis* (WUNSCHERL *et al.* 1994).

Riassumendo, i metodi classici di biochimica e di morfologia utilizzati per classificare i batteri non permettono la distinzione fra *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Inoltre i metodi moderni (ibridazione dell'ADN cromosomico, analisi dei fosfolipidi e degli acidi grassi, confronto delle sequenze dell'ARN ribosomico 16S, analisi del polimorfismo di frammenti amplificati e analisi di frammenti di restrizione del genoma) sono ugualmente a favore dell'ipotesi che *B. thuringiensis* e *B. cereus* siano in realtà una sola specie (SCHNEPF *et al.* 1998).

*Bacillus cereus* è un contaminante frequentemente trovato nel latte crudo e nei prodotti lattieri (CARLSON & KOLSTO 1993, ASANO *et al.* 1997). Esso produce delle grandi quantità di enzimi proteolitici che digeriscono la caseina, dando al latte un gusto ed un odore caratteristici. Oltre alla degradazione dei prodotti lattieri, *B. cereus* causa dei problemi di sanità pubblica, poiché alcuni ceppi sono conosciuti per produrre una enterotossina extracellulare, provocando delle diarree negli animali superiori (ASANO *et al.* 1997). Questo fa dunque di *B. cereus* un batterio potenzialmente patogeno per l'essere umano, contrariamente a *B. thuringiensis* che è considerato piuttosto come un organismo benefico, grazie alla sua attività insetticida (CARLSON & KOLSTO 1993). Su cinque ceppi di *B. thuringiensis*, delle esperienze di costruzione di una carta fisica grazie a degli enzimi di restrizione (CARLSON & KOLSTO 1993) hanno dato dei risultati positivi a dei test di presenza dell'enterotossina del tipo *B. cereus*. Il fatto che dei ceppi di *B. thuringiensis* siano capaci di produrre un'enterotossina del tipo *B. cereus* suggerisce che questi batteri insetticidi potrebbero essere considerati come dei ceppi di *B. cereus* produttrici di enterotossine e aventi acquisito dei plasmidi codificanti per il cristallo parasporeale (CARLSON & KOLSTO 1993). Un'altra esperienza di clonazione e di sequenzaggio del gene codificante per questa enterotossina ha mostrato che esso è presente nei ceppi *B. cereus* FM1, *B. thuringiensis* sotto e *B. thuringiensis israelensis* ONR-60A (ASANO *et al.* 1997). È ugualmente stato dimostrato che alcuni ceppi di altre sottospecie di *B. thuringiensis* contenevano una sequenza di ADN omologa ad una regione del gene codificante per l'enterotossina. Dato che nessuna pubblicazione su problemi di sanità pubblica associati a *B. thuringiensis* è stata fatta, due ipotesi sono state proposte: (i) delle differenze minori di aminoacidi tra le enterotossine dei ceppi *B. thuringiensis* e *B. cereus* ridurrebbero la patogenicità di *B. thuringiensis* o (ii) *B. thuringiensis* sarebbe incapace di moltiplicarsi nell'intestino umano (ASANO *et al.* 1997).

## PIANO DI RICERCA E METODOLOGIE

Si è potuto constatare che il Piano di Magadino è una regione facilmente inondabile, dunque un luogo prediletto per le zanzare *Aedes vexans* le quali, una quindicina d'anni fa sono diventate un vero flagello per la popolazione e per i turisti della regione del Lago Maggiore. Dal 1988, le regioni dove si sviluppano le larve di *Aedes vexans* sono regolarmente trattate con un prodotto a base di *B. thuringiensis israelensis*. Da dieci anni questo trattamento insetticida è attuato due, tre volte all'anno. Un apposito gruppo di ricerca è stato costituito nel 1998 (GRIMOBÉ). Esso vede coinvolti la Fondazione Bolle di Magadino, l'Istituto Cantonale Batteriosierologico e Laboratoire d'Ecologie Microbienne (Lugano, Ginevra), il Prof. P. Lüthy (EPF, Zurigo), il Laboratoire de Microbiologie dell'Università di Neuchâtel e l'Ufficio Federale dell'ambiente, delle foreste e del paesaggio (UFAPF). Proprio l'UFAPF, sulla scorta delle conoscenze attuali di questo bacillo, sostiene un progetto nella regione di Magadino, iniziato nel 1999 e ha lo scopo di verificare se questa applicazione volontaria non abbia, come specificato dalla maggior parte delle pubblicazioni, veramente alcun effetto sull'ambiente.

### Determinazione della persistenza delle spore di *B. thuringiensis israelensis* nell'ambiente

Le spore batteriche possono restare in latenza nell'ambiente durante parecchi anni. Esse resistono alle difficili condizioni ambientali come temperature elevate o periodi prolungati di siccità. Se delle materie nutritive sono disponibili in quantità sufficienti per sopportare la loro crescita e la loro moltiplicazione, le spore possono germinare ed il batterio moltiplicarsi. Dopo la proliferazione, se il nutrimento diventa troppo raro, per evitare la morte, le cellule vegetative attivano il loro meccanismo di sporulazione. Conoscendo questi fatti, è lecito quindi postulare un accumulo di spore e un aumento di cellule di *B. thuringiensis israelensis* depositate volontariamente nel suolo e nelle acque del Piano di Magadino, anche se le pubblicazioni scientifiche sul soggetto non abbiano ancora confermato questa ipotesi (PETRAS & CASIDA 1985, LÜTHY & STUDER 1986, OHANA *et al.* 1987, GHARIB & HILSENHOFF 1988).

Uno dei punti della ricerca è quello di determinare se il numero di spore applicate artificialmente nell'ambiente dal 1988 diminuisce, resta stabile o aumenta per accumulazione o proliferazione nella natura. Si tratterà quindi di fare una determinazione quantitativa del numero di spore. I metodi descritti nella letteratura a disposizione (WEST *et al.* 1984:128-133, WEST *et al.* 1984:121-127, PETRAS & CASIDA 1985, TRAVERS *et al.* 1987, MARTIN & TRAVERS 1989, PALM *et al.* 1994, VON ROBERT 1994, HEAD *et al.* 1998) saranno adattati per l'analisi dei campioni rappresentativi di suolo, di acqua e di sedimenti trattati.

Dopo l'estrazione dal suolo, dall'acqua o dal sedimento, il numero di spore presenti nei campioni può essere determinato con il metodo del conteggio di colonie germinate su piastre d'agar. Un metodo possibile potrebbe essere l'ibridazione dove dei frammenti di ADN marcati

(sonde) riconoscono la porzione di un gene codificante per l'endotossina delta di *B. thuringiensis israelensis*. Un'alternativa all'ibridazione potrebbe essere l'amplificazione (PCR) di porzioni di questi geni *cry* o *cyt*. Tali metodi dovranno essere sviluppati in modo specifico per questa ricerca. Bisognerà anche mettere a posto un test di determinazione della sottospecie *israelensis* in confronto agli altri organismi.

Il numero di spore di *B. thuringiensis israelensis* determinate nel suolo, nell'acqua o nei sedimenti di differenti siti trattati con l'insetticida sarà cartografato. È previsto di fare delle campionature di questi siti su un periodo di almeno due anni, con lo scopo di studiare la dinamica e le eventuali fluttuazioni del numero di spore.

### Trasferimento orizzontale dei geni codificanti per le endotossine delta

È attualmente stabilito che dei plasmidi possano essere trasmessi da un organismo ad un altro, particolarmente se le specie sono geneticamente vicine l'una all'altra. Siccome questo è già stato descritto (GONZALES *et al.* 1982, WORKMANN *et al.* 1986, SEKAR 1990, TE GIFFEL *et al.* 1997, JARRETT & STEPHENSON 1990, SCHNEPF *et al.* 1998), le cellule di *Bacillus thuringiensis israelensis* sono dunque potenzialmente capaci di scambiare i loro plasmidi con altri organismi del suolo, per esempio con la specie *Bacillus cereus*. I geni codificanti per le endotossine delta essendo situati su uno stesso plasmidio, *B. cereus* potrebbero quindi produrre un cristallo completo.

Delle esperienze di trasformazione di *B. thuringiensis israelensis* con *B. cereus* saranno svolte in laboratorio e ne sarà stabilito il grado di trasformazione. Inoltre, una tecnica di rilevamento di cellule di *B. cereus* portanti il plasmidio codificante per i geni *cry* sarà messa a punto e testata con dei campioni di suolo, d'acqua, o di sedimento, al fine di dimostrare la capacità di trasformazione di *B. thuringiensis israelensis* in condizioni naturali. Il grado di scambio di plasmidio tra le cellule di *B. thuringiensis israelensis* e gli organismi della microfauna del suolo sarà così determinato.

### Persistenza delle endotossine delta nell'ambiente

Come si è visto precedentemente, le cellule di *B. thuringiensis israelensis* producono le quattro endotossine delta codificate dai geni *cryIVA*, *B*, *C*, e *D*, così come il fattore emolitico codificato dal gene *cytA* (LERECLUS *et al.* 1993, SCHNEPF *et al.* 1998). Queste cinque proteine costituiscono il cristallo parasporale formato durante la sporulazione di *B. thuringiensis israelensis*. Alcuni studi hanno dimostrato che i cristalli sono rapidamente degradati nell'ambiente dalla proteolisi (BOGGASCH & BERNAUER 1991) e da microrganismi indigeni (BECKER & LUDWIG 1993). È pure stato dimostrato che essi sono eliminati dalla zona di nutrizione delle larve nelle ore che seguono la loro applicazione, per adsorbimento da parte delle particelle del suolo (ANONIMO 1991).

Il grado di persistenza del complesso cristallino sarà determinato nel suolo, nell'acqua, e nei sedimenti del Piano di Magadino. Per questo saranno applicati test immuno-

logici basati sulla tecnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (HUBER-LUKAC *et al.* 1986, JAQUET *et al.* 1988, WIE *et al.* 1982, SMITH & ULRICH 1983, WIE *et al.* 1984, TAPP & STOTZKY 1995, PALM *et al.* 1994, GROAT *et al.* 1990). La fattibilità dei differenti metodi sarà innanzitutto testata in laboratorio, utilizzando da una parte i cristalli di colture di *B. thuringiensis israelensis* in sporulazione come antigeni, e dall'altra parte degli anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro questa tossina insetticida. La tappa seguente sarà la determinazione quantitativa delle endotossine delta presenti nei campioni naturali del Piano di Magadino.

Le quantità di cristalli ottenuti saranno cartografate. Le campionature saranno effettuate su un periodo di almeno due anni, con lo scopo di studiare la fluttuazione del tenore in tossina del materiale prelevato.

### Apparizione e sviluppo nelle larve di insetti di una resistenza contro *B. thuringiensis israelensis*

Dall'inizio degli anni '80, delle esperienze di selezione in laboratorio hanno permesso di ottenere diverse popolazioni d'insetti che avevano acquisito diversi gradi di resistenza alle endotossine delta di *B. thuringiensis* (SCHNEPF *et al.* 1998). Nel 1986, delle esperienze di selezione della zanzara *Aedes aegypti* con un prodotto a base di *B. thuringiensis israelensis* hanno mostrato che gli insetti diventavano due volte meno sensibili dopo 14 e 25 generazioni (MARRONE & MACINTOSH 1993). Nel 1982 e 1984, la selezione della specie *Culex quinquefasciatus* con *B. thuringiensis israelensis* ha provocato una diminuzione della sensibilità di 6 e 16,5 volte. Dopo un arresto del trattamento durante tre generazioni, la suscettibilità riaumentava del 50% (MARRONE & MACINTOSH 1993). Contrariamente alle altre specie, la resistenza in laboratorio dei ditteri contro *B. thuringiensis israelensis* sembra relativamente limitata.

In condizioni naturali, il primo caso di resistenza è stato individuato nel 1990 sul lepidottero *Plutella xylostella* in una coltura agricola hawaiana (MARRONE & MACINTOSH 1993, SCHNEPF *et al.* 1998). Per quanto riguarda i ditteri, non è ancora stato dimostrato nessun caso di resistenza naturale contro *B. thuringiensis israelensis* (ANONIMO 1988, WUNSCHHEL *et al.* 1994). Una tale ricerca è stata fatta nella valle dell'Alto Reno (Germania), dove il trattamento con *B. thuringiensis israelensis* si faceva da 10 anni (BECKER & LUDWIG 1993). Non è stata osservata nessuna differenza di sensibilità, in paragone con delle popolazioni di una regione mai trattata con *B. thuringiensis israelensis*. Due spiegazioni sono state proposte. La prima è che le zanzare *Aedes vexans* ed i simuliidi si spostano molto, dunque che solo una parte delle popolazioni è esposta alle sostanze tossiche. Questo permette quindi un miscuglio costante dei geni e avrebbe come conseguenza di diminuire o di ritardare l'apparizione di una resistenza (BECKER & MARGALIT 1993). L'altra proposta per spiegare l'assenza di resistenza nelle zanzare è che la sostanza tossica è complessa, composta da un insieme di proteine dirette contro dei ricettori differenti e in più agendo in maniera sinergica (BECKER & MARGALIT 1993, MARRONE & MACINTOSH 1993). In effetti, un'esperienza di

trattamento di *Culex quinquefasciatus* con una preparazione di *B. thuringiensis israelensis* contenente un miscuglio spore/tossine è stata fatta durante 20 generazioni (MARRONE & MACINTOSH 1993). Questa stessa popolazione è stata in seguito selezionata con la sola endotossina delta *CryIVD*. Le zanzare hanno sviluppato una resistenza di 70 volte contro questa proteina, mentre la loro resistenza alla preparazione spore/tossine non era che di 3 volte. In un'altra esperienza, il gene codificante per il fattore emolitico *cytA* fu clonato in un microrganismo poi utilizzato contro delle zanzare (BECKER & MARGALIT 1993). Una resistenza a questa proteina fu indotta dopo solamente qualche generazione.

Diversi meccanismi di resistenza sono stati proposti, ma finora, si è potuto osservare che questi sembravano unicamente legati ad alterazioni nel legame specifico della tossina alla membrana intestinale del insetto (MARRONE & MACINTOSH 1993, MCCAUGHEY 1994). Un altro meccanismo fu proposto, ma non fu osservato. Si tratta dell'inattivazione per proteolisi delle endotossine delta al livello dell'intestino (MARRONE & MACINTOSH 1993). Inoltre, altri meccanismi di resistenza detti di post-legame sono stati proposti. Essi potrebbero agire a livello dell'inserimento della tossina nella membrana, della formazione dei pori (MARRONE & MACINTOSH 1993, BAUER 1995), della fuga dell'emolinfa o dell'efficacia dei meccanismi di riparazione del insetto (BAUER 1995). Infine, un potenziale meccanismo di resistenza potrebbe essere una diminuzione della solubilità del cristallo nell'intestino (SCHNEPF *et al.* 1998).

Lo sviluppo di resistenze da parte degli insetti ai prodotti a base di *B. thuringiensis* sembra inevitabile, e si è dunque intensificata la ricerca nello sviluppo di strategie ritardanti o evitanti questa evoluzione (MCCAUGHEY 1994). Queste strategie sono le seguenti: utilizzo di tossine multiple, rotazione delle colture agricole, dosaggi d'insetticida da elevati a molto elevati, creazione di rifugi temporali e spaziali per gli insetti (MARRONE & MACINTOSH 1993, BAUER 1995, SCHNEPF *et al.* 1998).

Nel Piano di Magadino, da osservazioni sporadiche effettuate nel 1997 e 1998, cioè dopo 9 rispettivamente 10 anni consecutivi di trattamento delle zanzare con *B. thuringiensis israelensis*, sembra che il prodotto abbia perso la sua efficacia iniziale. Se si potesse provare che questa riduzione di tossicità sia dovuta all'apparizione di specie di zanzare resistenti, sarebbe una situazione grave, poiché non esiste attualmente alcuna alternativa biologica per rimpiazzare *B. thuringiensis israelensis*. Un lavoro di diploma incentrato su questo problema è attualmente in corso. Esso fornirà dati preliminari per indagini più mirate.

#### Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento è dovuto alla divisione dell'Ambiente del dipartimento del Territorio, Cantone Ticino, per la realizzazione del programma occupazionale e alla Fondazione Bolle di Magadino, per aver reso possibile l'inizio del lavoro. In particolare, si ringrazia l'ing. Stefano Giamboni per l'aiuto fornito nella traduzione del testo in italiano e il biologo N. Patocchi, responsabile delle Bolle di Magadino e coordinatore del progetto.

Ringraziamo inoltre il Prof. P. Lüthy per la competente consulenza scientifica su *B. thuringiensis*, sui trattamenti insetticidi e per aver fornito la maggiore parte del materiale bibliografico.

Un grazie infine al gruppo di ricerca dell'Istituto Cantonale Batteriosierologico di Lugano (Prof. R. Peduzzi) per aver dato la possibilità di iniziare la ricerca in laboratorio e per l'eccellente sostegno scientifico.

#### CONCLUSIONI

La produzione su grande scala di *B. thuringiensis* è aumentata lentamente ma regolarmente durante questi ultimi trent'anni. Il contrario è successo per gli insetticidi chimici, il cui picco di produzione è stato raggiunto qualche anno fa, ma è rapidamente diminuito, in seguito a problemi di sicurezza per le popolazioni non bersaglio così come a dei problemi di resistenza delle popolazioni bersaglio. Attualmente, la produzione annuale mondiale di prodotti a base di *B. thuringiensis* è di circa 3'000 tonnellate (SCHNEPF *et al.* 1998), di cui la maggior parte è utilizzata per il controllo dei lepidotteri nell'agricoltura e nelle foreste, così come per il controllo delle zanzare e dei simuliidi, i quali possono essere dei vettori di malattie infettive umane. I principali produttori sono gli Stati Uniti d'America, la Cina e l'India. Inoltre, *B. thuringiensis* gioca un ruolo sempre più importante nei paesi tropicali dove delle produzioni su piccola scala sono previste allo scopo di coprire i bisogni locali.

In Svizzera, sebbene ufficialmente raccomandati per proteggere gli alberi da frutto, i legumi e le vigne contro gli insetti, i prodotti a base di *B. thuringiensis* non sono utilizzati che in maniera locale. I prodotti a base di *B. thuringiensis israelensis* sono distribuiti come insetticidi domestici nelle drogherie e nei supermercati (classe di tossicità 5S) e le uniche due operazioni su larga scala hanno luogo nel Piano di Magadino dal 1988 e nella regione del Lago di Gruyères dal 1993.

Il numero importante di trattamenti effettuati nel Piano di Magadino è un'opportunità unica per controllare gli effetti a lungo termine di *B. thuringiensis israelensis* nell'ambiente. Il nostro studio, la cui parte pratica è iniziata nel dicembre 1998, permetterà di ottenere un risultato sulla biosicurezza di questo insetticida microbico ed i risultati potranno essere considerati in un contesto d'importanza generale dunque internazionale.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS L.F., VISICK J.E. & WHITELEY H.R., 1989. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 171: 521-530.
- AGAISSE H. & LERECLUS D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. J. Bacteriol., 177(21): 6027-6032.
- ALI A., 1980. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates. J. Invertebr. Pathol., 38: 264-272.
- ALY C., 1985. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores in the gut of *Aedes* larvae (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol., 45: 1-8.
- AMANN R.I., LUDWIG W. & SCHLEIFER K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 59(1): 143-169.
- ANDREWS JR. R.E., FAUST R.M., WABIKO H. & RAYMOND K.C., 1987. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 6(2): 163-232.
- ANONIMO, 1988. La lotta alle zanzare nel corso dell'anno 1988 nel basso Piano di Magadino. Non pubblicato, disponibile a richiesta.
- ANONIMO, 1991. Jahresbericht 1991 zur Stechmückenbekämpfung. Non pubblicato, disponibile a richiesta.
- ASANO S.I., NUKUMIZU Y., BANDO H., TOSHIHIKO I. & YAMAMOTO T., 1997. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 63(3): 1054-1057.
- BASSI G. Jr., 1995. Determinazione della tolleranza della *Aedes vexans* del Piano di Magadino al *Bacillus thuringiensis*. Lavoro di diploma, non pubblicato, disponibile a richiesta.
- BAUER L.S., 1995. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florid. Entomol., 78(3): 414-443.
- BAUM J.A. & MALVAR T., 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol., 18(1): 1-12.
- BECKER N. & LUDWIG M., 1993. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. J. Am. Mosq. Contr. Assoc., 9(2): 221-224.
- BECKER N. & MARGALIT J., 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. Wiley & Sons Publishers, Chichester, pp. 147-170.
- BOGGASCH U., BERNAUER D., 1991. Der Anteil der Culicidae an der Fluginsektenfauna ausgewählter Rheinauengebiete. Lavoro di diploma, non pubblicato, disponibile a richiesta.
- BOYLE T.M. & DEAN D.H., 1990. Cloning of *Bacillus thuringiensis israelensis* mosquito toxin genes. Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies, edited by H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NY, pp. 78-93.
- BRAUN R., 1994. Bestimmung der Toleranz von *Aedes vexans* gegenüber *Bacillus thuringiensis* nach fünfjähriger Behandlung in der Magadino Ebene. Lavoro di diploma, non pubblicato, disponibile a richiesta.
- BROADWELL A.H., 1994. Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. Agric. Ecosyst. Environ., 49(1): 27-29.
- BUTLER D. & REICHHARDT T., 1999. Long-term effect of GM crops serves up food for thought. Nature, 398(6729): 651-656.
- CARLSON C.R. & KOLSTO A.B., 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. J. Bacteriol., 175(4): 1053-1060.
- CARLSON C.R., JOHANSEN T., LECADET M.M. & KOLSTO A.B., 1996. Genomic organisation of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1915. Microbiol., 142: 1625-1634.
- CHUNGJATUPORNCHAI W., HÖFTE H., SEURINCK J., ANGSUTHANASOMBAT C. & VAECK M., 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. Eur. J. Biochem., 173: 9-16.
- CRICKMORE N., ZEIGLER D.R., FEITELSON J., SCHNEPF E., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J. & DEAN D.H., 1998. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Biol. Rev., 62(3): 807-813.
- DE BARJAC H., 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 286, Série D, pp. 797-800.
- DONOVAN W.P., DANKOSIK C. & GILBERT M.P., 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol., 170: 4732-4738.
- EARP D.J. & ELLAR D.J. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. Nucleic Acids Res., 15: 3619.
- FEDERICI B.A., LÜTHY P. & IBARRA J.E., 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis* - Structure, protein composition and toxicity. Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies, edited by H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NY, pp. 16-44.
- FOUQUE F., 1991. La démoustication de la Plaine de Magadino. Diss., ETH N°9603.
- GALJART N.J., SIVASUBRAMANIAN N. & FEDERICI B.A., 1987. Plasmid location, cloning and sequence analysis of the gene encoding a 23-kilodalton cytolytic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14). Curr. Microbiol., 16: 171-177.
- GARCIA R., DES ROCHERS B. & YOZER W., 1981. Studies on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis* against organisms mosquito larvae and other organisms. Proc. Calif. Mosq. Vect. Control Assoc., 49: 25-29.
- GELERNTER W. & SCHWAB G.E., 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. Wiley & Sons Publishers, Chichester, pp. 89-104.
- GHARIB A.H. & HILSENHOFF W.L., 1988. Efficacy of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against *Aedes vexans* and safety to non-target macroinvertebrates. J. Am. Mosq. Contr. Assoc., 4(3): 252-255.
- GONZALEZ JR. J.M. & CARLTON B.C., 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. Plasmid, 3: 92-98.
- GONZALEZ JR. J.M., DULMAGE H.T. & CARLTON B.C., 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid, 5: 351-365.
- GONZALEZ JR. J.M., BROWN B.J. & CARLTON B.C., 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6951-6955.
- GROAT R.G., MATTISON J.W. & FRENCH E.J., 1990. Quantitative immunoassay of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* products. Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*, ACS Symposium Series N° 432, pp. 88-97.

- HEAD I.M., SAUNDERS J.R. & PICKUP R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.*, 35: 1-21.
- HÖFTE H. & WHITELEY H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.
- HUBER H.E. & LÜTHY P., 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: composition and activation. *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, edited by E.W. Davidson. Allanheld, Osmun & Co. Publishers, Totowa, New Jersey, pp. 209-234.
- HUBER-LUKAC M., JAQUET F., LÜTHY P., HÜTTER R. & BRAUN D.G., 1986. Characterization of monoclonal antibodies to a crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Infect. Immun.*, 54(1): 228-232.
- JAQUET F., GEISER M. & LÜTHY P., 1988. Comparison of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins originating from different genes. *Bacterial Protein Toxins*, Zbl. Bakt. Suppl. 17, edited by Fehrenbach *et al.* Gustav Fischer, Stuttgart, New York, pp. 55-56.
- JARRETT P. & STEPHENSON M., 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1608-1614.
- KRONSTAD J.W. & WHITELEY H.R., 1984. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.*, 160(1): 95-102.
- LERECLUS D., RIBIER J., KLIER A., MENOUE G. & LECADET M.M., 1984. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J.*, 3(11): 2561-2567.
- LERECLUS D., DELÉCLUSE A. & LECADET M.M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. Wiley & Sons Publishers, Chichester, pp. 37-69.
- LI J., CARROLL J. & ELLAR D.J., 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353: 815-821.
- LIU J.W., YAP W.H., THANABALU T. & PORTER A.G., 1996. Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of Gram-negative bacteria in mosquito control. *Nature Biotechnol.*, 14: 343-347.
- LÜTHY P. & EBERSOLD H.R., 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathology and molecular mode of action. *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, edited by E.W. Davidson. Allanheld, Osmun & Co. Publishers, Totowa, New Jersey, pp. 235-267.
- LÜTHY P., CORDIER J. & FISCHER H., 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. *Microbial and viral pesticides*, edited by E. Kurstak. Marcel Dekker, New York, pp. 35-74.
- LÜTHY P. & STUDER D., 1986. Control of simuliid blackflies and mosquitoes with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *MIR-CEN J.*, 2: 91-99.
- LÜTHY P., 1986. Insect pathogenic bacteria as pest control agents. *Biological Plant and Health Protection*, Published by G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 201-216.
- LÜTHY P., 1987. Il problema delle zanzare nel comprensorio delle Bolle di Magadino. Non pubblicato, disponibile a richiesta.
- MARGALIT J., 1990. Discovery of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*, edited by H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NY, pp. 3-9.
- MARRONE P.G. & MACINTOSH S.C., 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. Wiley & Sons Publishers, Chichester, pp. 221-235.
- MARTIN P.A.W., HARANSKY E.B., TRAVERS R.S. & REICHELDERFER C.F., 1985. Rapid biochemical testing of large numbers of *Bacillus thuringiensis* isolates using agar dots. *BioTechniques*, 3(5): 386-392.
- MARTIN P.A.W. & TRAVERS R.S., 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(10): 2437-2442.
- MCGAUGHEY W.H., 1994. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 49(1): 95-102.
- MILNER F.J., 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 49(1): 9-13.
- MIURA T., TAKAHASHI R.M. & MULLIGAN F. S. III, 1980. Effects of the bactericidal mosquito larvicide *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on selected aquatic organisms. *Mosq. News*, 40: 619-622.
- OHANA B., MARGALIT J. & BARAK Z., 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(4): 828-831.
- PALM C.J., DONEGAN K., HARRIS D. & SEIDLER R.J., 1994. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.*, 3: 145-151.
- PETRAS S.F. & CASIDA JR L.E., 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(6): 1496-1501.
- PREFONTAINE G., FAST P., LAU P.C.K., HEFFORD M.A., HANNA Z. & BROUSSEAU R., 1987. Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2808-2814.
- PRIEST F.G., KAJI D.A., ROSATO Y.B. & CANHOS V.P., 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiol.*, 140: 1015-1022.
- ROGATIN A.B. & BAIZHANOV M., 1984. Laboratory study of *Bacillus thuringiensis israelensis* serotype H-14 on various groups of hydrobionts. *Izv. Akad. Nauk. Kaz. SSR Ser. Biol.* D6 22, (in russo).
- SCHNEPF E., CRICKMORE N., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J., ZEIGLER D.R. & DEAN D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 62(3): 775-806.
- SEKAR V., 1990. Genetics of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*, edited by H. de Barjac and D.J. Sutherland. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, NY, pp. 66-77.
- SEKI T., CHUNG C.K., MIKAMI H. & OSHIMA Y., 1978. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28(2): 182-189.
- SEN K., HONDA G., KOYAMA N., NISHIDA M., NEKI A., SAKAI H., HIMENO M. & KOMANO T., 1988. Cloning and nucleotide sequences of the two 130 kDa insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 873-878.
- SMITH R.A. & ULRICH J.T., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(2): 586-590.
- SOMERVILLE H.J. & JONES M.L., 1972. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of Bacilli. *J. Gen. Microbiol.*, 73: 257-265.
- TAPP H. & STOTZKY G., 1995. Dot Blot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2): 602-609.
- TE GIFFEL M.C., BEUMER R.R., KLIJN N., WAGENDORP A. & ROMBOUTS F.M., 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on va-

- riable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 146: 47-51.
- THORNE L., GARDUNO F., THOMPSON T., DECKER D., ZOUNES M., WILD M., WALFIELD A.M. & POLLOCK T.J., 1986. Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. «*kurstaki*» and «*israelensis*». *J. Bacteriol.*, 166: 801-811.
- TRAVERS R.S., MARTIN P.A.W. & REICHELDERFER C.F., 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(6): 1263-1266.
- TUNGPRADUBKUL S., SETTASATIEN C. & PANYIM S., 1988. The complete nucleotide sequence of a 130 kDa mosquito-larvicidal delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Nucleic Acids Res.*, 16: 1637-1638.
- WAALWIJK C., DULLEMANS A.M., VANWORKUM M.E.S. & VISSEER B., 1985. Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr28,000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res.*, 13: 8207-8217.
- WARD E.S. & ELLAR D.J., 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin: nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 191: 1-11.
- WARD E.S. & ELLAR D.J., 1987. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 kDa delta-endotoxin. *Nucleic Acids Res.*, 15: 7195.
- VON ROBERT L., 1994. Bestimmung der Konzentration von *Bacillus thuringiensis* Sporen nach fünfjähriger Behandlung gegen *Aedes vexans* in der Magadinoebene. Lavoro di diploma, non pubblicato, disponibile a richiesta.
- WEST A.W., BURGESS H.D. & WYBORN C.H., 1984. Effect of incubation in natural and autoclaved soil upon potency and viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 44: 121-127.
- WEST A.W., BURGESS H.D., WHITE R.J. & WYBORN C.H., 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J. Invertebr. Pathol.*, 44: 128-133.
- WIE S.I., ANDREWS JR R.E., HAMMOCK B.D., FAUST R.M. & BULLA JR L.A., 1982. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4): 891-894.
- WIE S.I., HAMMOCK B.D., GILL S.S., GRATE E., ANDREWS JR R.E., FAUST R.M., BULLA JR L.A. & SCHAEFER C.H., 1984. An improved enzyme-linked immunoassay for the detection and quantification of the entomocidal parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 57: 447-454.
- WORKMAN W.E., MCLINDEN J.H. & DEAN D.H., 1986. Genetic engineering applications to biotechnology in the genus *Bacillus*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 3(3): 199-234.
- WRAIGHT S.P., MOLLOY D.P. & SINGER S., 1987. Studies on the culicine mosquito host range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with notes on the effects of temperature and instar on bacterial efficacy. *J. Invertebr. Pathol.*, 49: 291-302.
- WUNSCHER D., FOX K.F., BLACK G.E. & FOX A., 1994. Discrimination among the *B. cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *System. Appl. Microbiol.*, 17: 625-635.
- YAMAMOTO T., WATKINSON I.A., KIM L., SAGE M.V., STRATTON R., AKANDE N., LI Y., MA D.-P. & ROE B.A., 1988. Nucleotide sequence of the gene coding for a 130-kDa mosquito-cidal protein of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Gene*, 66: 107-120.

