

PENGEMBANGAN BIOINSEKTISIDA UNTUK
MENUNJANG BIOTEKNOLOGI PERKEBUNAN¹⁾

THE DEVELOPMENT OF BIOINSECTICIDE
IN CONTROLLING INSECT PESTS OF ESTATE CROPS

Bibiana Lay, Teguh Santoso dan Sugyo Hastowo ²⁾

ABSTRACT

The mainstay of the Indonesian economy is agriculture. The major estate crops in Indonesia are oil palm, rubber, coconut, cocoa, coffee, tea and pepper. Insect pests of various types may attack these crops causing significant economic loss. Chemical pesticides have been used extensively to reduce damage from insect pests, but they have also created serious problems such as environmental pollution, chemical residues, and development of resistance in insect population leading to resurgence of both target and non-target pests.

The group of microorganisms pathogenic for insects is varied and diverse. Among these are a broad range of viruses, bacteria, protozoa and fungi. Each of these groups is composed of a spectrum of organisms that vary in their mode of infection, site of replication, and mechanisms of pathogenicity.

Among the bacteria, the spore-forming bacilli, *Bacillus thuringiensis* is one of the most promising potential agent for use in the management of insect population. *B. thuringiensis* produces characteristic proteinaceous parasporal inclusions in sporulating cells. This parasporal inclusion is also known as delta-endotoxin which is highly toxic to insects in several orders of Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. Although toxic to insect pests, the toxin is harmless to non-target invertebrates, vertebrates and plants.

Due to its potential and selectivity, *B. thuringiensis* has received the greatest commercial attention. Many

¹⁾ Disampaikan pada Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri.
PAU Bioteknologi IPB, Bogor 10 - 11 Desember 1991.

²⁾ PAU Bioteknologi, IPB

registered formulation of *B. thuringiensis* has been produced and marketed. In Indonesia, at least three commercial products are available in the market i.e., Dipel, Thuricide and Bactospeine. The use and success of these commercial products has been reported in many subtropical countries, however, such report concerning the effectiveness of these products in the tropics has not been documented.

In general, each region or country has different insect pests and different problems in controlling these pests. The production of bioinsecticide based on local strains is very important. Selection of indigenous strains isolated in Indonesia can be used to tailor strains with improved potency against key pests, and/or with host ranges more suitable than that of the present commercial strain for controlling the pest complexes.

This paper will discuss on the selection and development of indigenous *B. thuringiensis* for the production of bioinsecticide in controlling insect pests of estate crops in Indonesia.

RINGKASAN

Pengembangan tanaman perkebunan merupakan salah satu unsur yang penting dalam pembangunan pertanian untuk menunjang perekonomian Indonesia. Berbagai jenis serangga-hama dapat menyerang tanaman perkebunan seperti kelapa sawit, karet, kelapa, kopi, teh, coklat, tebu dan lada sehingga mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar. Untuk mengendalikan hama tersebut umumnya digunakan insektisida kimiawi. Penggunaan insektisida kimiawi secara luas dan terus menerus memang dapat menekan kerusakan akibat serangan hama. Namun disamping itu timbul pula masalah pencemaran lingkungan, residu kimiawi, dan timbulnya resistensi serangga yang memungkinkan terjadinya resurgensi.

Berbagai kelompok mikroorganisme mencakup virus, protozoa, bakteri dan cendawan dapat hidup sebagai jasad patogenik pada serangga. Setiap mikroorganisme ini memiliki ciri-ciri sendiri dalam sifat infeksi, cara replikasi, serta mekanisme patogenitasnya.

Salah satu jenis bakteri pembentuk spora yaitu *Bacillus thuringiensis* merupakan pilihan utama dalam pemanfaatan mikroba sebagai agensia pengendalian serangga-hama. *B. thuringiensis* dalam proses pertumbuhannya menghasilkan badan inklusi parasporal berupa kristal protein. Badan inklusi ini dikenal pula sebagai delta-endotoksin yang bersifat toksik terhadap beberapa serangga dalam ordo Lepidoptera, Diptera dan Coleoptera. Walaupun delta-endotoksin bersifat toksik terhadap serangga-sasaran, namun bahan ini tidak toksik terhadap serangga berguna lainnya, hewan, tanaman maupun manusia.

Karena ciri-ciri yang khas tersebut, maka *B. thuringiensis* telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan dasar untuk produksi bioinsektisida. Di Indonesia paling tidak ada 3 produk yang dipasarkan yaitu Dipel, Thuricide dan Bactospeine. Penggunaan dan keberhasilan insektisida mikrobial tersebut telah dilaporkan diberbagai daerah subtropis. Namun belum diketahui bagaimana keberhasilannya di daerah tropis.

Pada umumnya setiap wilayah dihadapkan pada berbagai jenis hama dan permasalahan pengendalian yang berbeda. Pengembangan produksi bioinsektisida yang berlandaskan pada galur *B. thuringiensis* lokal merupakan langkah awal yang penting. Seleksi terhadap galur *B. thuringiensis* asli-Indonesia dapat dimanfaatkan untuk menciptakan produk bioinsektisida yang lebih ampuh dan lebih sesuai untuk pengendalian hama perkebunan dibandingkan dengan produk komersial yang telah ada.

Makalah ini akan membahas berbagai upaya memperoleh galur *B. thuringiensis* asli-Indonesia serta pemanfaatan dan pengembangannya untuk produksi bioinsektisida. Dengan menggunakan dasar-dasar bioteknologi diharapkan akan dapat dihasilkan suatu insektisida mikrobial yang bermanfaat untuk mengendalikan hama tanaman perkebunan di Indonesia.

PENDAHULUAN

Pembangunan pertanian merupakan salah satu unsur yang penting dalam perekonomian Indonesia. Berbagai jenis serangga-hama dapat menyerang tanaman perkebunan dan pertanian serta dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang besar. Untuk mengendalikan serangan serangga-hama tersebut umumnya digunakan insektisida kimiawi. Penggunaan insektisida kimiawi secara luas dan terus menerus memang dapat menekan kerusakan akibat serangan hama. Namun di samping itu timbul pula masalah pencemaran lingkungan, residu kimiawi, dan timbulnya resistensi serangga yang memungkinkan terjadinya resurgensi dan munculnya hama sekunder.

Untuk mengatasi hal ini, timbul pemikiran untuk mencari insektisida hayati (bioinsektisida). Secara harfiah yang dimaksud dengan bioinsektisida adalah insektisida dengan bahan aktif organisme hidup, misalnya mikroba. Salah

satu mikroba pilihan yang sudah banyak dimanfaatkan untuk produksi bioinsektisida ialah *Bacillus thuringiensis*.

Dalam seminar ini akan dibahas tentang pemanfaatan dan pengembangan mikroorganisme tersebut sebagai upaya mencari insektisida hayati untuk mendukung pembangunan pertanian dan perkebunan yang bersih dari pencemaran lingkungan.

PEMANFAATAN MIKROORGANISME SEBAGAI PENGENDALI HAYATI

Mikroba yang bersifat patogenik terhadap serangga mencakup virus, bakteri, fungi, rickettsiae dan protozoa. Berbagai mikroba ini mempunyai cara infeksi, lokasi replikasi dan mekanisme patogenisitas yang spesifik. Beberapa mikroba mempunyai kisaran serangga inang sasaran yang luas namun ada pula yang mempunyai kisaran serangga inang sempit.

Virus entomopatogenik mencakup virus DNA dan RNA misalnya virus polihedrosis nuklear, polihedrosis sitoplasma dan granulositis. Lazimnya virus pada insekta ini mempunyai kisaran serangga sasaran yang sempit, meskipun ada juga beberapa virus entomopatogenik yang mempunyai kisaran luas. Pada virus, lokasi awal infeksi biasanya terjadi di saluran pencernaan dan cepat menyebar dari satu sel ke sel lainnya.

Fungi entomopathogenik dapat ditemukan pada Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes dan Fungi Imperfecti sedangkan protozoa yang bersifat insektisidal biasanya termasuk dalam keluarga Nosematidae. Umumnya, fungi entomopathogenik ini mempunyai kisaran serangga sasaran yang luas. Infeksi oleh fungi terjadi melalui permukaan tubuh dengan cara merasuk ke dalam lapisan kutikula insekta yang mengandung khitin.

Di antara bakteri yang bersifat patogenik terhadap serangga, *Bacillus thuringiensis* merupakan salah satu agensia hayati yang paling menonjol dan potensial. *B. thuringiensis* mempunyai kemampuan membentuk badan inklusi parasporal sewaktu bersporulasi. Dalam badan inklusi parasporal ini diakumulasikan delta-endotoksin. Bila termakan oleh larva serangga yang peka, delta-endotoksin yang berupa protoksin ini dalam saluran makanan insekta yang berlingkungan basa diubah menjadi toksin aktif. Saluran makanan larva serangga juga mengandung protease yang berperan dalam pengubahan toksin menjadi toksin aktif. Selain itu protease mengubah daya ikat reseptor dalam saluran makanan sehingga toksin dapat berikatan dengan reseptor untuk memulai daya toksiknya.

PEMANFAATAN *Bacillus thuringiensis* UNTUK BIOINSEKTISIDA

Sejarah

Isolasi *B. thuringiensis* pertama kali dilaporkan oleh Ishiwata pada tahun 1902. Mikroba ini disebut *sotto bacillus* dan diisolasi dari ulat sutra yang sakit. Pada sistem pemilahan saat ini *Bacillus* ini disebut *B. thuringiensis* subsp. *sotto*. Isolasi berikutnya dilakukan oleh Berliner (1915) dari *Anagasta kuehniella* yang berasal dari Theuringen, dan sekarang ini dikenal sebagai *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*.

Di antara tahun 1920 - 1950 telah dilakukan berbagai percobaan lapangan untuk menguji kemampuan insektisidal *B. thuringiensis*. Pengujian ini memberikan hasil yang beragam. Hannay dan Fitz James (1955) membuktikan bahwa badan inklusi parasporal adalah protein sedangkan Angus (1956) membuktikan bahwa daya insektisidal terletak pada badan inklusi parasporal.

Keampuhan produk *B. thuringiensis* tergantung pada struktur kimiawi delta-endotoksin. Galur *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* pertama kali diisolasi oleh Kurstak (1962) dari larvae *Anagasta kuehniella* yang sakit di Perancis. Dulmage (1970), menemukan mikroba ini dari *Pectinophora gossypiella*. Kurstak dan Dulmage mengamati bahwa galur ini lebih ampuh terhadap larvae serangga dibandingkan galur *B. thuringiensis* lainnya.

***Bacillus thuringiensis* sebagai bioinsektisida.**

B. thuringiensis merupakan mikroba tanah dan banyak ditemukan di peternakan ulat sutra. Namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa mikroba ini ditemukan tersebar di alam. *B. thuringiensis* adalah bakteri bentuk batang Gram positif, berspora, dan bersifat aerobik. Salah satu ciri utama *B. thuringiensis* adalah terbentuknya kristal protein yang merupakan badan inklusi yang terletak parasporal. Kristal protein ini dikenal pula sebagai delta-endotoksin. Keistimewaan delta-endotoksin ini adalah daya toksik dengan kisaran sempit terhadap serangga tertentu dari ordo *Lepidoptera*, *Coleoptera* atau *Diptera*. Selain itu delta-endotoksin tidak menimbulkan pencemaran, tidak membahayakan manusia, vertebrata lainnya dan tanaman serta tidak bersifat toksik terhadap serangga berguna.

Daya kerja delta-endotoksin terletak pada kristal protein. Berbagai faktor penentu keampuhan delta-endotoksin antara lain adalah galur *B. thuringiensis*, daya larut kristal protein dalam saluran makanan, serta kepekaan insekta terhadap toksin.

B. thuringiensis menghasilkan toksin polipeptida yang memiliki daya kerja terhadap serangga hama tertentu. Sequens asam amino pada polipeptida delta-endotoksin menentukan daya kerja toksin dan kisaran serangga sasarannya.

Karena itu keragaman kristal protein (Cry protein) berkaitan dengan daya kerjanya terhadap serangga sasaran.

Bioesei

Dalam bioesei terhadap lepidoptera diukur kematian dan penurunan aktivitas makan. Bioesei dilakukan dengan cara "force - feeding", pemberian daun yang telah disemprot atau di"dip" dan makanan buatan yang mengandung bioinsektisida. Penentuan serangga, stadia pertumbuhan dan cara pemberian sangat berpengaruh dalam penentuan bioesei. Di Amerika dicoba pembakuan metode dengan menggunakan *Trichoplusia ni* sebagai serangga penguji dan isolat HD-1 sebagai galur rujukan.

Selain penggunaan serangga dapat pula digunakan kultur jaringan invertebrata (*Choristoneura fumiferana*). Pada metoda kultur jaringan dinilai daya kerja toksik kristal protein dengan pengamatan histopatologi, pewarnaan, penghitungan sel yang lisis, pengukuran ATP atau enzim intraseluler laktat dehidrogenase.

Penentuan daya kerja delta-endotoksin *B. thuringiensis* tidak semudah yang diduga karena penelitian tentang daya toksin menggunakan berbagai serangga penguji dan berbagai subspecies *B. thuringiensis*. Pemanfaatan *B. thuringiensis* sebagai bioinsektisida

Pemilihan *B. thuringiensis* sebagai bioinsektisida didasarkan pada berbagai pertimbangan keuntungan dan kelemahannya.

Keuntungan :

1. Delta-endotoksin tidak bersifat toksik terhadap vertebrata serta tanaman dan tidak mengganggu predator dan serangga berguna. Keamanan preparat ini menyebabkan insektisida mikrobial dapat digunakan sampai waktu panen; ini sangat menguntungkan bagi sayuran khususnya.

2. Sampai saat ini belum dilaporkan adanya resistensi serangga terhadap bioinsektisida di lapangan.
3. Seleksi *B. thuringiensis* dapat menghasilkan galur dengan delta-endotoksin yang lebih ampuh serta kisaran serangga sasaran yang berbeda dengan preparat komersial yang ada.
4. Proses pertumbuhan dan pembentukan kristal protein dapat diatur. Ini berarti bahwa untuk produksi kristal protein pengendalian biakan mikroba sampai terbentuknya kristal protein relatif mudah dilakukan.
5. Persistensi yang rendah di alam. Aplikasi *B. thuringiensis* biasanya dilakukan berulang kali. Germinasi yang lambat dari *B. thuringiensis* menjadi salah satu sebab lemahnya persistensi mikroba ini di dalam tanah. Tidak hanya larva serangga mempercepat hilangnya mikroba ini dari lingkungan tanah. Faktor penyebab lainnya adalah kehilangan plasmid, terutama plasmid yang mengandung gen protoksin.

Kelemahan

1. Kisaran serangga sasaran yang sempit menyebabkan insektisida kimiawi menjadi pilihan untuk menanggulangi serangga hama.
2. Aplikasi *B. thuringiensis* harus tepat, sedangkan insektisida kimiawi dapat diberikan sebagai pencegahan terhadap serangan hama. Meskipun daya kerja delta-endotoksin cepat, larvae serangga tidak segera mati. Para petani terbiasa melihat kematian cepat sewaktu penggunaan insektisida kimiawi.
3. *B. thuringiensis* harus dimakan oleh serangga sasaran. Bila toksin yang diberikan tidak cukup, larvae serangga tidak mati.
4. Sampai saat ini, preparat komersial *B. thuringiensis* lebih mahal dibandingkan insektisida kimiawi.

5. Untuk mencari serangga sasaran yang tepat diperlukan bioesei terhadap berbagai serangga.
6. Penyemprotan bioinsektisida pada daun mudah tercuci oleh hujan dan dinaktivasikan sinar matahari sehingga perlindungan jangka-pendek saja yang diperoleh pada aplikasi tunggal bioinsektisida.

PENGEMBANGAN BIOINSEKTISIDA

Selama 30 tahun terakhir ini pengembangan *B. thuringiensis* untuk produksi bioinsektisida dibayangi oleh keberhasilan insektisida kimiawi yang dapat diproduksi dengan harga murah dan ampuh terhadap berbagai serangga. Resistensi terhadap insektisida kimiawi, gangguan keseimbangan populasi serangga, serta pencemaran lingkungan menjadikan *B. thuringiensis* sebagai mikroba pilihan pengganti insektisida kimiawi. Meskipun produk *B. thuringiensis* tidak dapat memusnahkan seluruh populasi serangga sasaran, namun daya kerjanya cukup kuat untuk menekan kerugian ekonomi akibat serangan serangga hama.

Untuk menjaga agar lingkungan tetap bersih dan tidak tercemari telah dilakukan berbagai penelitian untuk mengendalikan serangga hama secara hayati. Diantara berbagai agens pengendali hayati, *B. thuringiensis* menjadi mikroba pilihan karena tidak membahayakan manusia, hewan, tumbuhan serta serangga berguna. Preparat komersial pertama, Sporeine diproduksi oleh Perancis. Beberapa perusahaan Amerika memproduksi *B. thuringiensis* setelah perang dunia. Contoh preparat komersial yang dipasarkan ini adalah Bakthane 1-69, Biotrol, BTB, Parasporin, Thuricide, Agritol, Larvitol. Kemudian di Perancis diproduksi Bac-tospeine dan di Uni Soviet diproduksi Entobacterin-3. Pada mulanya preparat komersial didasarkan pada serotipe 1 (subsp. *thuringiensis*) yang menghasilkan beta-eksotoksin.

Produk akhir dapat beragam, tergantung banyaknya eksotoksin dalam hasil fermentasi.

Preparat komersial *B. thuringiensis* seringkali berupa campuran spora - kristal protein. Campuran ini diaplikasikan pada daun dan mudah diinaktivasikan oleh sinar ultra violet; spora yang jatuh ke tanah akan bercampur dengan mikroflora lainnya tanpa menimbulkan gangguan. Namun demikian penyebaran mikroorganisme di alam harus dihindarkan. Kandungan spora yang berlebihan dikhawatirkan akan menimbulkan gangguan ekosistem. Berdasarkan hal ini, telah diteliti penggunaan mutan yang tidak berspora. Salah satu kesulitan penerapan mutan ini adalah tidak mantapnya sifat "tidak berspora" (spo^-), karena seringkali sifat ini berubah menjadi spo^+ setelah beberapa kali pemindahan biakan.

Prospek Pemanfaatan

Salah satu kelemahan preparat *B. thuringiensis* adalah kisaran serangga sasaran yang sempit. Seleksi mikroba dari berbagai lingkungan mungkin menghasilkan isolat dengan kisaran yang lebih luas ataupun dengan daya toksik yang baru. Selain itu, kisaran serangga sasaran dapat diperluas dengan memasukkan gen kristal protein melalui rekayasa genetik. Hal ini dapat terjadi misalnya melalui perpindahan plasmid galur *B. thuringiensis*. Kelemahan lainnya dari preparat komersial *B. thuringiensis* adalah stabilitas terbatas di lapangan. Untuk mengatasi kelemahan ini dapat dilakukan pemasukan gen yang mengelola kristal protein ke organisme yang bertautan dengan akar, seperti misalnya bakteri endofitik. Pendekatan lainnya adalah perasukan gen yang mengelola kristal protein melalui Tn5 ke dalam kromosom *Pseudomonas fluorescens* dan *Agrobacterium radiobacter* yang mengkolonisasi akar seperti misalnya pada tanaman jagung. Dalam percobaan, kedua transforman

yang dihasilkan dapat mengekspresikan kristal protein dan bersifat toksik terhadap *Manduca sexta*.

Penciptaan tanaman transgenik yang bersifat resisten terhadap serangan hama menggunakan sistem transformasi yang menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Ciri yang digunakan adalah resistensi terhadap kanamycin. Tanaman tembakau yang berhasil ditransformasikan resisten terhadap *Manduca sexta*, dan kandungan kristal protein dalam jaringan tanaman sejalan dengan konsentrasi kristal protein.

Di Indonesia, pada saat ini sudah beredar insektisida mikrobial yang menggunakan bahan dasar *Bacillus thuringiensis* antara lain adalah Thuricide, Dipel dan Bactospeine. Keberhasilan preparat komersial ini telah banyak dilaporkan di daerah subtropis, namun keberhasilannya di daerah tropis masih belum banyak dilaporkan.

Upaya untuk mengisolasi *Bacillus thuringiensis* dari tanah di Indonesia sangat penting, karena setiap wilayah dihadapkan pada berbagai jenis serangan hama dan permasalahan pengendalian yang berbeda. Untuk mencapai sasaran "Clean Agriculture" upaya pengembangan insektisida mikrobial (bioinsektisida) yang memanfaatkan *B. thuringiensis* isolat asli Indonesia merupakan langkah awal yang penting.

Seleksi terhadap galur *B. thuringiensis* asli - Indonesia dapat dimanfaatkan untuk menciptakan produk bioinsektisida yang lebih ampuh dan lebih sesuai untuk pengendalian serangga hama dibandingkan produk komersial yang telah ada.

Dari hasil penelitian yang telah dirintis oleh PAU Bioteknologi - IPB telah dapat diisolasi dan dicirikan sejumlah *B. thuringiensis* dari tanah yang berasal dari berbagai wilayah di Indonesia. Penelitian awal menunjukkan bahwa beberapa isolat Indonesia memiliki kemampuan insektisidal. Isolat tersebut memberikan harapan untuk pemanfaatan dan pengembangan sebagai bahan dasar produksi

bioinsektisida. Namun demikian masih diperlukan seleksi galur *B. thuringiensis* asli Indonesia yang memiliki daya keampuhan insektisidal yang tinggi serta berdaya toksik terhadap kisaran serangga yang lebih luas.

**CONTOH BEBERAPA JENIS SERANGGA HAMA PENTING
YANG MENYERANG TANAMAN PERKEBUNAN**

JENIS TANAMAN	SERANGGA	
	NAMA UMUM	NAMA ILMIAH
Kelapa	Hama Perusak Daun	<i>Thosea assigna</i>
Kelapa sawit		<i>Setora nitens</i>
Lada		
Kapas	Penggerek Buah	<i>Helicoverpa amigera</i> <i>Pectinophora gossypiella</i>
Tebu	Penggerek pucuk	<i>Chilo auricillius</i> <i>Scirpophaga nivella</i>
	Penggerek batang	<i>Chilo sacchariphagous</i> <i>Diatraea saccharalis</i>
Teh	Penggulung DAUN	<i>Caloptilia theivora</i> <i>Homona coffearia</i>
Kopi	Bubuk buah kopi	<i>Hypothenemus hampei</i>
	Penggerek ranting	<i>Xylosandrus morrigerus</i>
Cacao	Kakao mot	<i>Acrocercops cramerella</i>
	Kepik Penghisap	<i>Helopeltis sp.</i>
Karet	Uret	Scarabaeidae

DAFTAR PUSTAKA

- Aronson, A.I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens Microbiol. Reviews 50 : 1- 24
- Burges, H.D. 1986. Production and use of pathogens to control insect pests. J. Appl. Bacteriol. 127 S - 137 S
- Dulmage et al. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control pp. 193 - 222. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 - 1980. Hofte, H. and H.R. Whitely. 1989. Insecticidal Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53 : 242 - 255
- Jaquet, F., R. Hutter, and P. Luthy. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Applied and Env. Microbiol. 53 : 500 - 504
- Lay, B. 1990. Pencirian *Bacillus thuringiensis* isolat Indonesia - metode serologi dan biokimia. Laporan Penelitian-PAU Biotek-IPB.
- Lay, B. 1991. Analisa Imunokimiawi kristal protein *B. thuringiensis* - isolat Indonesia. Laporan Penelitian - PAU Biotek - IPB.
- Ohba, M., and K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. J. Invert. Pathol. 47 : 277 - 282.
- Oka, I.N. dan M. Sukardi. 1982. Dampak lingkungan penggunaan pestisida. J. Litbang Pertanian 2 : 49 - 56.
- Widner, W.R., and H.R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171 : 965 - 974.