



Doctoral Thesis

Sporulationsmutanten von *Bacillus thuringiensis*

Author(s):

Cordier, Jean Louis

Publication Date:

1982

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000302432> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

S P O R U L A T I O N S M U T A N T E N V O N
B A C I L L U S T H U R I N G I E N S I S

A B H A N D L U N G
zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
JEAN-LOUIS CORDIER
dipl. Natw. ETHZ
geboren am 22. August 1954
von Meinier GE

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. L. Ettliger, Referent
Prof. Dr. G. Benz, Korreferent
PD Dr. P. Lüthy, Korreferent

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die heutigen mikrobiologischen Präparate gegen landwirtschaftliche Schadinsekten und Stechmücken als Ueberträger humanpathogener Krankheitserreger basieren hauptsächlich auf Stämmen von Bacillus thuringiensis. Die Anwendung von sporenhaltigen Präparaten wird jedoch in verschiedenen Ländern aus Sicherheitsgründen verboten oder erschwert.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von wirtschaftlich interessanten Stämmen, die möglichst wenig hitzeresistente Sporen ausbilden, aber bezüglich ihrer Toxinausbeute und -qualität dem Wildtyp ebenbürtig sein sollten. Ausserdem sollte durch die Einführung einer zweiten Mutation die Reversionsrate weiter gesenkt werden. Die Stämme sollten charakterisiert und, wenn möglich, ihr Einsatz als Produktionsstämme überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Varietäten kurstaki und israelensis, die in der Produktion am häufigsten verwendet werden, näher charakterisiert. Neben verschiedenen Messungen während der vegetativen Wachstumsphase wurde vor allem die Sporulationsphase näher untersucht. Einerseits wurde im Elektronenmikroskop die morphologischen Veränderungen verfolgt, die zur Ausbildung der hitzeresistenten Sporen führen. Andererseits wurden die biochemischen Sporulationsmarker Alanin-Dehydrogenase, Proteasen, alkalische Phosphatase, Glucose-Dehydrogenase, Dipicolinsäure, Lösungsmittel- und Hitzeresistenz, die diese morphologischen Veränderungen begleiten, gemessen. Die biologische Aktivität der zwei Varietäten wurde an den Testinsekten Pieris brassicae und Heliothis virescens sowie Aedes aegypti bestimmt.

Die Ausarbeitung und Optimierung eines geeigneten Mutations- und Erkennungssystems erlaubte es, zahlreiche Sporulationsmutanten zu isolieren. Diese wurden anhand ihrer Morphologie und ihrer biochemischen Marker charakterisiert und klassiert. Die Mutagenese mit MNNG wurde an keimenden Sporen durchgeführt, und die Mutanten konnten auf GYS-Platten nach einer 3-4tägigen Inkubationsdauer als durchscheinende Kolonien erkannt werden. Neben zahlreichen anderen Mutanten konnten rund 20 Stämme isoliert werden, die bezüglich Freisetzung und Ausbeute des Toxins und bezüglich ihrer biologischen Aktivität dem Wildtyp ebenbürtig waren.

Die Untersuchungen mit den Stämmen 380-3 der var. kurstaki und 346-II der var. israelensis wurden bis zu Züchtungsversuchen unter Produk-

tionsbedingungen ausgeweitet. Dabei erwies sich der Stamm 380-3 als vielversprechend.

Um die Reversionsrate von 10^{-8} - 10^{-9} dieser Mutante weiter zu senken, wurden Doppelmutanten gesucht, die nicht mehr in der Lage waren, Dipicolinsäure zu synthetisieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Stamm 380-3-431 isoliert werden, der diese Fähigkeit verloren hatte und eine um ca. 100x geringeren Reversionsrate aufwies. Obwohl die Toxinausbeute etwas geringer war, blieb die spezifische Aktivität des produzierten Toxins erhalten.

Die Untersuchungen während der Lagerung von Sporulationsmutanten zeigten, dass für die Langzeitaufbewahrung die Lyophilisation und das Einfrieren mit Glycerin geeignet sind. Während der Lagerung auf reichen Medien bei Raumtemperatur kam es zu einer Degeneration und Veränderung in der Zusammensetzung der Zellpopulation. Bei 4°C veränderte sich diese Zusammensetzung nicht, doch die Zellen starben innerhalb einiger Wochen ab. Da es auch hier im Falle eines wiederholten Ueberimpfens zu einer Anreicherung von Fremdformen kam, musste eine sichere Methode gefunden werden.

Für mittel- bis langfristige Aufbewahrungszeiten wurden deshalb die Zellen auf verschiedenen Trägern eingetrocknet. Als günstigstes Trägermaterial erwies sich Silicagel. Darauf blieben die Zellen mindestens ein Jahr lang lebensfähig.

8. SUMMARY

Strains of Bacillus thuringiensis are currently the most common source of products used for the microbial control of pest insects in agriculture or of mosquitoes as vectors of human diseases. Because of reasons of safety, the utilization of spore-containing products is limited or forbidden in several countries.

In order to produce B. thuringiensis-products containing no, or a low number of living cells, sporulation mutants were isolated which met the following requirements: a) low frequency of sporulation and b) high yield of toxin with the same characteristics as the wild type toxin. A suitable form of storage for these strains was developed.

Vegetative growth and sporulation were studied in 2 commercially used strains of B. thuringiensis, the varieties kurstaki and israelensis. Morphological changes leading to the formation of the heat resistant spore were observed by electron microscopy. Changes in the following biochemical markers were measured: alanine dehydrogenase, proteases, alkaline phosphatase, glucose dehydrogenase and dipicolinic acid. The development of resistance to solvents and heat was followed.

Optimal mutagenesis occurred when germinating spores were treated with MNNG. Mutants were detected as translucent colonies on GYS plates after an incubation of 3-4 days. About 20 strains were isolated which showed the desired attributes defined above.

The behaviour of the strains 380-3 of the var. kurstaki and 346-II belonging to the var. israelensis was also studied in industrial fermentations. The results obtained with strain 380-3 showed to have commercial potentialities.

It was possible to isolate a double mutant (380-3-431) which had lost the capacity to synthesize dipicolinic acid. This strain showed a rate of reversion lowered by a factor of about 100 compared with 380-3. The production of toxin was somewhat lower but its specific activity remained the same.

During storage on rich media at room temperature, the cells degenerated and the composition of the population changed. At 4°C the cells died within a few weeks and degenerated cells could be enriched by repeated trans-

fers of such cultures.

Lyophilization or freezing in the presence of glycerol was suitable for long-term conservation of sporulation mutants. For the short, middle and even long term storage, the cells were dried on different carriers: silica gel was the most suitable carrier on which the cells survived for at least one year.