

Diss. ETH No. 7540

ON THE DELTA-ENDOTOXIN OF BACILLUS
THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

IGNATIUS DAVIS KONIKKARA

M.Sc. Microbiology (St. Xavier's College, BOMBAY)

born 27th December, 1950

Citizen of India

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. L. Ettliger, examiner
PD Dr. P. Lüthy, co-examiner

1984

SUMMARY

Bacillus thuringiensis var. israelensis (Bti) is shown to produce two kinds of proteinic inclusions. One type is mosquito toxic and under certain specific conditions, mouse toxic. The other type is non-toxic. The toxic inclusions are the denser and the more abundant of the two. These are clusters of enveloped, roughly sphaerical, at least partially crystalline structures. In the native state, the toxic inclusions harbour some of the non-toxic lighter inclusions, which were successfully extricated by a freeze-thaw-sonication process, which probably brings about rupture of the envelope. The smallest proteinic structure derived from either of these inclusions by various solubilization techniques is of MW 22,000 to 25,000 as detected in SDS-PAGE. The toxic type yields four additional polypeptides, MW 35-40,000, 54-64,000, 86-87,000 and 130-145,000. A total carbohydrate content of 8.4% is also detected in the toxic inclusion, a value that is seen to decline with alkaline exposures.

Almost 100% recovery of toxicity of dissolved inclusions was obtained when mosquito larvae were made to take it up after precipitation at pH 4.5., followed by maintenance of the precipitated state using an acid medium for bioassay. The precipitated state was essential since only particulate matter is orally consumed by the filter feeding mosquito larvae. Such assays on culture filtrates and extracts of vegetative cells conclusively rule out extracellularly released mosquito toxin in Bti.

About 45% of the protein in the toxic inclusions are extracted in 0.05 M carbonate buffer, pH 10.5. This fraction is non-toxic to mosquitoes on precipitation, but lethal to mice on intravenous injection. The remaining 55% is toxic to mosquito larvae, as also to mice, when injected as a pH 10.5 DTT extract.

There is evidence indicating that mild alkaline solubilization of inclusions at least partly involve DTT resistant thiol dependent proteases that accompany them. There is also some indication that these proteases may contribute to mosquito toxicity and that a polypeptide of MW 86,000,

or its higher assembly, is necessary for the same.

An asporogenic mutant derived from Bti is seen to be as efficient as the wild type, both in the laboratory and field. Spore counts associated with mutant treatments were negligible. In the field, deep water bodies were more adequate for larval mortality than shallow ones. Field dosages based on surface area of the water body was found to be more realistic than those based on water volume.

ZUSAMMENFASSUNG

Bacillus thuringiensis var. israelensis bildet zwei Arten von Einschlüssen, die aus Protein bestehen. Die eine Art ist toxisch gegenüber Mückenlarven und unter bestimmten Bedingungen auch gegenüber Mäusen. Die toxischen Partikel überwiegen mengenmässig und zeichnen sich gegenüber den biologisch inaktiven durch eine höhere Dichte aus. Der toxische, von einer widerstandsfähigen Hülle umgebene Einschluss, enthält aber auch noch nicht toxisches Material. Es gelang durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren mit anschliessender Ultraschallbehandlung, die Hüllen aufzubrechen und die nicht toxischen von den toxischen Elementen zu trennen. Für beide Fraktionen wurde mittels Gelelektrophorese die kleinste Polypeptid-einheit in einem Molekulargewichtsbereich von 22'000 - 25'000 gefunden. Bei den das Toxin enthaltenden Einschlüssen wurden weitere vier Banden mit den Molekulargewichtsbereichen 35'000-40'000, 54'000-64'000, 86'000-87'000 und 130'000-145'000 nachgewiesen. Die toxischen Einschlüsse enthielten zudem 8,4% Kohlenhydrat. Dieser Anteil sank mit der Verwendung von Lösungsmitteln steigender Alkalinität.

Durch Präzipitation der gelösten Einschlüsse bei pH 4.5 mit 12% Citronensäure gelang es, praktisch 100% der biologischen Aktivität zurückzugewinnen. Bedingung war, dass der Biotest unter leicht sauren Verhältnissen durchgeführt wurde, um ein Auflösen des gefällten Toxins zu verhindern, da Mückenlarven nur feste Nahrungsbestandteile aufnehmen. Kulturfiltrate, Extrakte vegetativer Zellen und Sporen erwiesen sich im Biotest frei von Toxin.

Etwa 45% des Proteins der toxischen Einschlüsse ist in 0.05 M Carbonatpuffer, pH 10.5 löslich. Diese Fraktion ist gegenüber Mückenlarven ohne Aktivität. Hingegen ist sie toxisch für Mäuse nach intravenöser Injektion. Die in Carbonatpuffer nicht löslichen 55% besitzen Aktivität sowohl gegen Mückenlarven wie auch gegen Mäuse, sofern das Material als DTT Extrakt bei pH 10.5 injiziert wird.

Es wurden Hinweise gefunden, dass an der Auflösung der Einschlüsse unter alkalischen Bedingungen Thiolproteasen beteiligt sind. Vielleicht erzeugen diese Proteasen das Polypeptids mit Molekulargewicht 86'000,

das für die Aktivität gegenüber Mückenlarven verantwortlich sein könnte. Arbeiten mit einer asporogenen Mutante der Varietät israelensis haben gezeigt, dass diese unter Labor- wie Feldbedingungen dem Wildtyp ebenbürtig war. Die im Mutantenpräparat vorhandenen Sporenzahlen waren äusserst gering. B. thuringiensis Behandlungen waren in tiefem Wasser wirkungsvoller als an Stellen mit niedrigem Wasserstand. Es erwies sich als vorteilhaft, bei der Berechnung der Aufwandmengen nur die zu behandelnde Wasseroberfläche und nicht das Volumen zu berücksichtigen.