

Bacillus thuringiensis

Verfasserin: Dr. Renate Kaiser-Alexnat
Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)
Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt
(August 2008)

Das Bakterium, das wir heute als *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*, oder kurz *Bt*) bezeichnen, wurde 1901 erstmals von dem japanischen Wissenschaftler ISHIWATA aus einer Seidenraupe isoliert. Er nannte es damals *Bacillus sotto*. Einige Jahre später - 1911 - isolierte der deutsche Wissenschaftler BERLINER aus einer kranken Raupe der Mehlmotte das gleiche Bakterium. Er nannte es *Bacillus thuringiensis*, weil die Mehmotten in denen er es entdeckte aus einer Mühle in Thüringen stammten. Zu diesem Zeitpunkt ahnte noch niemand, dass es sich um ein Bakterium mit ganz besonderen Eigenschaften und einem sehr großen Potential handelt.

B.t. ist ein geographisch sehr weit verbreitetes Bakterium. Es ist auf allen Kontinenten zu finden und konnte sogar in der Antarktis nachgewiesen werden. *B.t.* ist also ubiquitär. Um *B.t.*-Stämme mit toxischer Wirkung auf Schadinsekten zu selektieren, werden sie aus Insekten, von Blattoberflächen und vor allem aus Bodenproben isoliert. Bis auf wenige Ausnahmen konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Habitat und dem Toxizitätsspektrum festgestellt werden.

Biologie und Anwendung

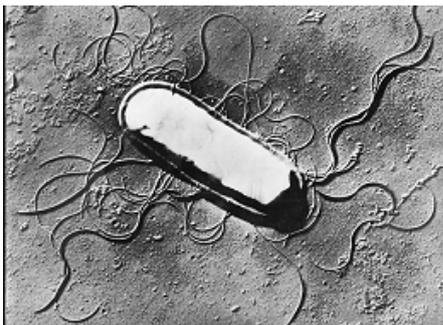


Abb.1: Vegetative Zelle [Quelle: Aloysius Krieg, BBA Darmstadt]

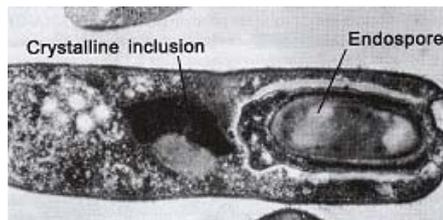


Abb.2: Sporulierende Zelle [Quelle: Mycogen Corporation]

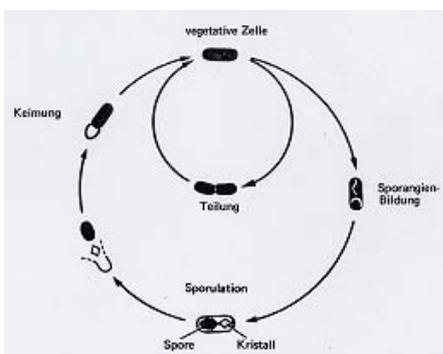


Abb.3: Entwicklungszyklus von *B.t.* [Quelle: Schema von Aloysius Krieg, BBA Darmstadt]

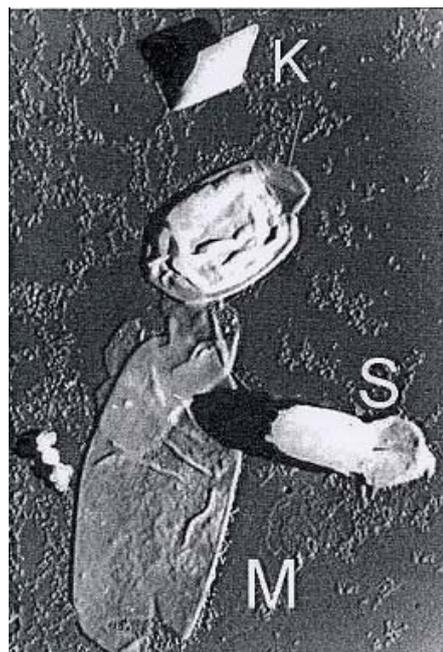


Abb.4: Aufgeplatztes Sporangium mit Kristallprotein (K), Endospore (S) und Sporenmutterzelle (M) [Quelle: Aloysius Krieg, BBA Darmstadt]

Toxine

Bei der Sporulation (generative Phase) bildet *B.t.* Kristallproteine. Wenn die Kristallproteine eine toxische Wirkung haben, spricht man auch von Kristall-Toxinen bzw. δ -(Delta-)Endotoxinen. Sie sind stammspezifisch und haben verschiedene Formen [Abb. 5]. *B.t. sv. kurstaki* weist beispielsweise bipyramidale Kristall-Toxine auf [siehe Abb. 4]. Bei *B.t. v. tenebrionis* sind die Kristall-Toxine plattenförmig und fast quadratisch [Abb. 6 und 7]. Und *B.t. sv. israelensis* bildet irregulär geformte Kristall-Toxine. Manche Stämme haben auch mehrere Kristall-Toxine je Sporangium, die gleichartig oder unterschiedlich aufgebaut sein können.

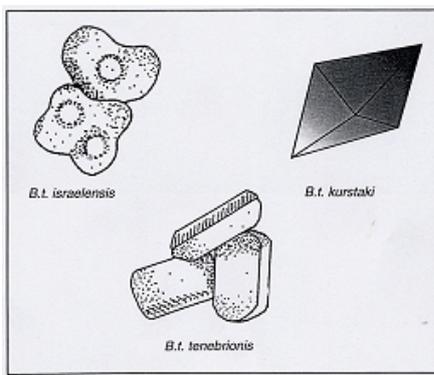


Abb.5: Formen von Kristall-Toxinen [Quelle: ABBOTT B.t. Products Manual]

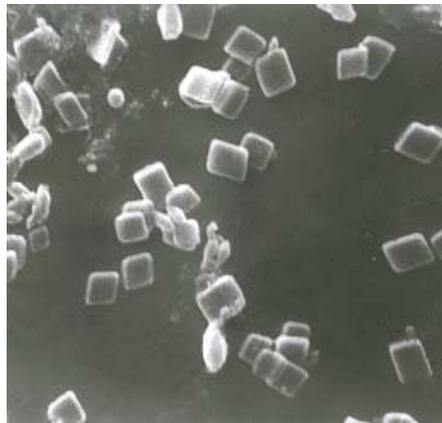


Abb.6: Plattenförmige Kristall-Toxine von *B.t. v. tenebrionis* [Quelle: Alois Huger, BBA Darmstadt]

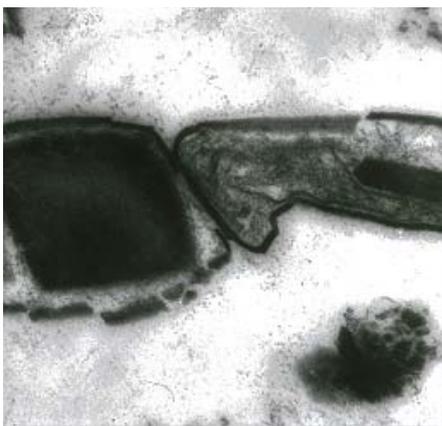


Abb.7: In der Mitte links ist ein Toxin-Plättchen von *B.t. v. tenebrionis* zu erkennen [Quelle: Alois Huger, BBA Darmstadt]

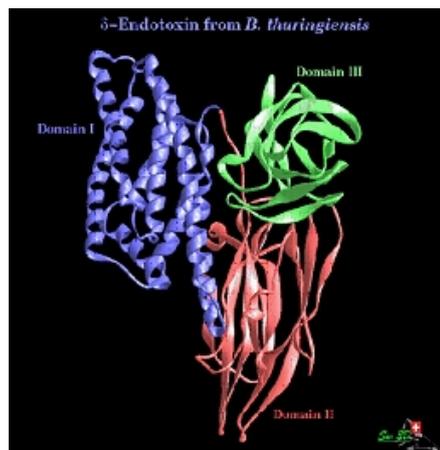


Abb.8: Aufbau eines δ -Endotoxins [Quelle: Swissprot, Li et al. (1991): Nature 353, 815-821]

Die δ -Endotoxine bestehen aus drei Teilbereichen, den so genannten Domänen [Abb. 8], die für den spezifischen Wirkungsmechanismus (siehe unten) verantwortlich sind. Die Domäne I ist für die Porenbildung und die Domäne II für die Rezeptorbindung entscheidend. Domäne III soll die strukturelle Unversehrtheit bedingen und ebenfalls an der Porenbildung und Rezeptorbindung beteiligt sein.

Die Endotoxine werden in zwei Familien, die Cry- und Cyt-Toxine unterteilt. Sie sind unterschiedlich aufgebaut und wirken unterschiedlich, sind aber bei vielen *B.t.*-Stämmen beide an der insektiziden Wirkung beteiligt. Bisher sind ca. 400 Cry-Toxine bekannt, die in 52 Klassen eingeteilt werden. Bei den Cyt-Toxinen werden zwei Klassen, Cyt 1 und Cyt 2, unterschieden, die zusammen 26 Toxine umfassen. Die Bezeichnung „Cry“ leitet sich von „crystal“ (englisch Kristall) und „Cyt“ von der allgemeinen cytolytischen *in vitro* Aktivität dieser Toxine ab.

In der Wachstumsphase (vegetative Phase) werden von den vegetativen *B.t.*-Zellen so genannte VIPs (vegetative insecticidal proteins) und Exotoxine gebildet und an die Umgebung der Zellen abgegeben. Während die Endotoxine überwiegend spezifisch gegen bestimmte Insektengruppen wirksam sind, haben die Exotoxine eine unspezifische Wirkung.

Wirkungsmechanismus

Damit die Endotoxine ihre toxische Wirkung entfalten können, müssen sie von den Larven durch Fraß aufgenommen werden. Die in den Kristallproteinen vorliegenden Toxine stellen inaktive Protoxine dar. Die Kristall-Toxine werden zunächst im Darm pH-abhängig gelöst. Da die Toxine Proteine sind, werden sie mittels spezifischer Proteasen gespalten. Dadurch werden die inaktiven Protoxine in die aktive Toxinform prozessiert und so an spezifische Rezeptoren der Darmwand gebunden. Ein Teil der Toxine senkt sich in die Zellmembran. Es kommt zur Bildung von Poren, wodurch die Darmwand aufgelöst wird [Abb. 9]. Schließlich stirbt das Insekt, was sich schon vorher durch Fraßstopp ankündigt.

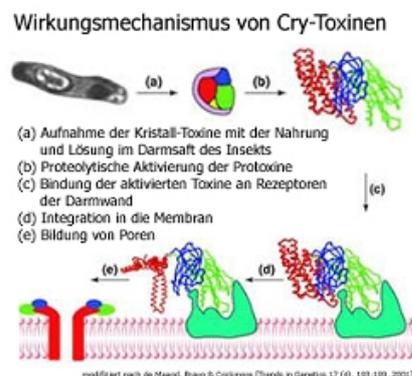


Abb.9: Wirkungsmechanismus von Cry-Toxinen [Quelle: modifiziert nach de Maagd, Bravo & Crickmore (2001): Trends in Genetics 17 (4), 193-199.]

Die Primärwirkung beruht also auf den Toxinen (Toxämie). Doch als Folge der Zerstörung des Darmepithels können die auskeimenden Endosporen in die Leibeshöhle eindringen, sich dort vermehren und dabei Stoffwechselgifte produzieren, die eine Septikämie (Blutvergiftung) verursachen, sodass auch die Sporen eine Bedeutung für den pathologischen Prozess im Insekt haben können.

Taxonomie

Weltweit wird die Anzahl der bekannten *B.t.*-Stämme, d.h. unterschiedliche Isolate, auf etwa 50.000 geschätzt. Von den vielen bekannten *B.t.*-Stämmen werden jedoch nur wenige kommerziell genutzt.

Die Einteilung der *B.t.*-Stämme erfolgte zunächst nach biochemischen Eigenschaften. Später wurde eine Klassifizierung nach den serologischen Unterschieden eingeführt. Danach werden die *B.t.*-Stämme in 82 serologische Varietäten bzw. Serovare zusammengefasst. Zur serologischen Unterscheidung werden die Geißeln der vegetativen Zellen herangezogen, die aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut sein können.

Im Hinblick auf ihren praktischen Einsatz wurden die *B.t.*-Stämme 1986 von Dr. Aloysius Krieg, einem ehemaligen Wissenschaftler des BBA Instituts für biologischen Pflanzenschutz, nach ihrem Wirtsspektrum in so genannte Pathotypen eingeteilt. Er unterschied drei Pathotypen.

Pathotyp A: Lepidopteren-spezifisch
Pathotyp B: Dipteren-spezifisch
Pathotyp C: Chrysomeliden-spezifisch

Da die serologischen Verwandtschaftsverhältnisse nicht mit den Pathotypen übereinstimmten, führten HÖFTE und WHITLEY 1989 erstmals eine Klassifizierung der *B.t.*-Toxine ein. Zusätzlich zum Wirtsspektrum wurde bei diesem System auch die Homologie der δ -Endotoxin-Gene (Cry-Gene) berücksichtigt, also die Homologie der Nukleotidsequenz der Gene, die das *B.t.*-Toxin codieren. Sie unterschieden folgende Klassen:

CryI: Lepidopteren-spezifisch
CryII: Lepidopteren- und Dipteren-spezifisch
CryIII: Coleopteren-spezifisch
CryIV: Dipteren-spezifisch
CryV: Coleopteren- und Lepidopteren-spezifisch

Aufgrund der Fülle der neu entdeckten *B.t.*-Toxine führten CRICKMORE *et al.* 1998 eine Nomenklatur ein, die allein auf der Sequenz-Homologie der Proteine beruht. Der Bezug zum Wirtsspektrum wurde aufgegeben. Dieses System ist stammbaumartig aufgebaut und berücksichtigt auch die Cyt-Toxine [[Bacillus thuringiensis Toxin Nomenclature](#)].

Einsatz von *B.t.* im Pflanzenschutz (*B.t.*-Präparate)

Das weltweit erste kommerzielle *B.t.*-Präparat hieß „Sporeine“ und kam 1938 in Frankreich auf den Markt. In Deutschland werden *B.t.*-Präparate seit über 40 Jahren eingesetzt, wobei „Biospor“ 1964 als erstes *B.t.*-Präparat zur Bekämpfung von Raupen als Pflanzenschutzmittel amtlich anerkannt wurde. Der Durchbruch kam 1970 mit der Entdeckung des besonders virulenten Stammes HD-1 von *Bacillus thuringiensis* sv. *kurstaki*. Das Spritzpulver „Dipel“ zählt zu den ältesten und bekanntesten *B.t.*-Präparaten und wurde bereits 1972 in Deutschland zugelassen. In den letzten Jahren wurde es durch die Flüssigformulierung „Dipel ES“ ersetzt. Der Name „Dipel“ ist von der Ordnung *Lepidoptera* abgeleitet, gegen die es eingesetzt wird. Vom Ordnungsnamen werden die ersten fünf Buchstaben rückwärts gelesen.

Im Jahr 1976 entdeckte MARGALIT einen weiteren bedeutenden Stamm, der nach seinem Fundort in der Negev-Wüste in Israel *B.t.* sv. *israelensis* genannt wurde. Dr. Alois Huger vom BBA Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt entdeckte 1982 einen Stamm, der für den praktischen Einsatz große Bedeutung erlangte. Sein Name *B.t.* v. *tenebrionis* ist vom Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*) abgeleitet, da dieser Stamm aus einer Mehlkäfer-Puppe isoliert wurde.

Der Einsatz von *B.t.*-Präparaten erfolgt vor allem im ökologischen Landbau. Weltweit betrachtet nehmen sie mittlerweile ca. 1% des Marktes für Agrarchemikalien und 90% des Marktes für biologische Schädlingsbekämpfungsmittel ein.

Spezifität

Nicht alle *B.t.*-Stämme sind toxisch gegenüber Insekten. Bei den toxischen Stämmen sind ca. 170 natürlich vorkommende *B.t.*-Toxine mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum bekannt. Der Wirkungsmechanismus folgt dabei stets dem oben beschriebenen Grundmuster und ist im Einzelfall von den artspezifischen Gegebenheiten im Darm der jeweiligen Insekten abhängig. Die spezifische Wirkung basiert also auf einem Zusammenspiel aus applizierten Kristall-Toxinen, pH-Wert und Proteasen des Darmsaftes sowie Rezeptoren der Darmwand. Nur wenn im Zielorganismus die spezifischen Bedingungen zusammen kommen, können die Kristall-Toxine schädigend wirken.

Die [“*Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database](#)“ ist eine umfangreiche Datensammlung zur Wirksamkeit von *Bacillus thuringiensis*, wobei nach Biotests mit verschiedenen Zielorganismen oder Toxin-Genen gefiltert werden kann.

Die toxische Wirkung von *B.t.* ist auf Lepidopteren-, Dipteren- oder Coleopteren-Larven beschränkt. Die meisten *B.t.*-Stämme wirken gegen Raupen bestimmter Lepidopteren-Arten und mehr als 75 Schadraupen-Arten wurden schon mit Erfolg mit *B.t.* bekämpft. Die *B.t.*-Stämme mit Lepidopteren-spezifischer Wirksamkeit werden zum Pathotyp A zusammengefasst, wobei im Wesentlichen zwei Varietäten eine Rolle spielen. *B.t.* sv. *kurstaki*, abgekürzt *B.t.k.*, wirkt gegen Raupen bestimmter Schmetterlingsarten, aber nicht gegen Noctuidae, also Eulen-Raupen. *B.t.* sv. *aizawai*, abgekürzt *B.t.a.*, wirkt ebenfalls gegen Raupen bestimmter Schmetterlingsarten einschließlich Eulen-Raupen.

Der Pathotyp B umfasst Stämme, die gegen Larven einer Reihe von Dipteren wie Mosquitos (Stechmücken) und Nematoceren (Mücken) wirksam sind. Die kommerziellen Stämme gehören zu *B.t. sv. israelensis* - abgekürzt *B.t.i.*

Der Pathotyp C ist durch die Wirkung auf Blattkäfer (*Chrysomelidae*) definiert und umfasst Stämme von *B.t. v. tenebrionis* - abgekürzt *B.t.t.*

Wirkungsspektrum - Tabellarische Übersicht

Pathotyp A

- *B.t. sv. kurstaki* (*B.t.k.*) gegen Larven bestimmter Lepidopteren, nicht gegen Noctuidae (Eulen)
- *B.t. sv. aizawai* (*B.t.a.*) gegen Larven bestimmter Lepidopteren, auch gegen Noctuidae (Eulen)

Pathotyp B

- *B.t. sv. israelensis* (*B.t.i.*) gegen Larven bestimmter Dipteren

Pathotyp C

- *B.t. v. tenebrionis* (*B.t.t.*) gegen Larven bestimmter Chrysomeliden

B.t.-Präparate

B.t.-Präparate vom Pathotyp A

B.t. sv. kurstaki (*B.t.k.*): Dipel, Dipel ES, Bactospeine XL

B.t. sv. aizawai (*B.t.a.*): Turex, XenTari, Raupenfrei, B 401

B.t.-Präparate vom Pathotyp B

B.t. sv. israelensis (*B.t.i.*): Biomükk, Culinex, Neudomück

B.t.-Präparate vom Pathotyp C

B.t. v. tenebrionis (*B.t.t.*): Novodor FC

Weltweit entfallen 80% des *B.t.*-Marktes auf den Pathotyp A, 15% auf den Pathotyp B und nur 5% auf den Pathotyp C. Bei den *B.t.*-Präparaten vom Pathotyp A sind bei *B.t.k.* insbesondere „Dipel“ und „Dipel ES“ von Bedeutung. Und bei *B.t.a.* spielen vor allem „Turex“ und „XenTari“, aber auch „Raupenfrei“ und „B 401“ eine Rolle. „Turex“, „XenTari“ und „Raupenfrei“ zeichnen sich, im Gegensatz zu den Dipel-Präparaten, durch eine bessere Wirksamkeit gegen Eulen-Raupen aus. Ferner gibt es ein spezielles Präparat – „B 401“ – das von Imkern zur Bekämpfung von Raupen der Großen Wachsmotte in Bienenstöcken auf die Waben gesprüht wird.

B.t.i. wurde in Deutschland durch Großeinsätze zur umweltfreundlichen Bekämpfung von Stechmücken-Larven am Ober-Rhein bekannt. Als Präparate auf der Basis von *B.t.i.*, mit Wirksamkeit gegenüber Dipteren-Larven sind „Biomükk“, „Culinex“ und „Neudomück“ zu nennen.

Auf der Basis von *B.t.t.* ist in Deutschland nur das Präparat „Novodor FC“ zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers zugelassen.

Die im Handel erhältlichen *B.t.*-Präparate enthalten als Hauptkomponenten Endotoxinkristalle und

Sporen. Eine Ausnahme bilden die Präparate auf der Basis von *B.t.i*, bei denen die Sporen nicht an der Wirkung gegen Stechmücken beteiligt sind und deshalb vor solchen Einsätzen inaktiviert werden. Neben den aktiven Bestandteilen sind Trägerstoffe sowie Netzmittel, Haftmittel und gegebenenfalls weitere Zusätze wie beispielsweise fraßsteigernde Stoffe enthalten.

B.t.-Präparate sind in Deutschland in Genossenschaften und Gartenbedarfsgeschäften erhältlich. Sie werden als Flüssigformulierungen oder in Pulverform angeboten. Zur Anwendung im Freiland wird das *B.t.*-Präparat in Wasser suspendiert und in Form einer Spritzbrühe mit den üblichen Pflanzenschutzgeräten ausgebracht. Um einen guten Bekämpfungserfolg zu erzielen, sollten die Temperaturen nach der Ausbringung bei 20-25°C liegen, weil bei niederen Temperaturen die Fraßleistung der Larven und damit einhergehend die Aufnahme des *B.t.*-Präparates stark abnimmt. Der Wirkungsgrad liegt bei sachgerechter Anwendung in vielen Fällen bei 70-90%.

Wirksamkeit

B.t.-Präparate können nur wirksam werden, wenn sie von den Schadinsekten beim Fraß aufgenommen werden. Daher hängt der Bekämpfungserfolg entscheidend davon ab, dass die Präparate am Fraßort abgelagert werden. Vor allem offen fressende Larven sind im jungen Stadium mit den Präparaten gut bekämpfbar. Bei versteckt fressenden Arten hängt der Bekämpfungserfolg von der Präparatmenge ab, die am Fraßort vorhanden ist. *B.t.*-Präparate wirken innerhalb einer Schädlingsart je nach Körpergewicht dosisabhängig. Daher sind sie besonders gegen junge Larven wirksam, während ältere Larven mit zunehmendem Gewicht widerstandsfähiger werden. Obwohl der Tod empfindlicher Insekten erst mehrere Tage nach der Aufnahme des Toxins eintritt, ist eine sofortige Wirkung vorhanden, weil die Larven schon nach einigen Stunden den Fraß einstellen.

Die *B.t.*-Präparate werden rasch durch UV-Strahlen inaktiviert, wobei hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit zwischen Spore und Toxin differenziert werden muss. Die Spore ist UV-empfindlich und verträgt eine Bestrahlung durch direktes Sonnenlicht nicht länger als 1 Stunde. Doch das Kristall-Toxin ist UV-stabil. Im Hinblick auf die Stabilität nach der Ausbringung sind eine gute Benetzung bevorzugt an der Blattunterseite und eine gute Durchdringung des Bestandes wichtig.

Der besondere Vorteil von *B.t.*-Präparaten ist ihre selektive Wirkung, die einen gezielten Einsatz ermöglicht. Im Gegensatz zu breit wirkenden chemischen Insektiziden bleiben so unbeteiligte Tiere, Nützlinge und der Mensch verschont. Bei standardisierter Herstellung und fachgerechter Anwendung ist das Risiko für Mensch und Umwelt äußerst gering. *B.t.* zählt daher zu den sichersten Insektiziden überhaupt.

Produktion

B.t. eignet sich hervorragend zur biotechnologischen Produktion, wobei die industrielle Produktion als Submerskultur in gut belüfteten Fermentern mit Nährmedien bei einer Temperatur von 25-30°C erfolgt. Die Dauersporen und parasporalen Kristalle bilden sich nur bei Nährstoffmangel und in Anwesenheit von Sauerstoff. Der Anteil an aktiven Bestandteilen, d.h. Sporen und Kristalle, beträgt nur ca. 5 % des Fermenterinhalt. Sie werden durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt

und schließlich gewaschen. Um eine Lagerung bis zum Verbrauch zu ermöglichen wird die verbleibende Biomasse getrocknet. Wenn die eingesetzten *B.t.*-Präparate keine oder nur sehr wenige lebende Sporen, wie beispielsweise bei Präparaten auf der Basis von *B.t.i*, enthalten sollen, dann werden die Produkte Gamma-bestrahlt, wodurch die Sporen inaktiviert, die Kristalle aber nicht verändert werden.

Verwendung von *B.t.* in der Grünen Gentechnik (*B.t.*-Pflanzen) - Grundlagen

Wegen der hohen Selektivität der *B.t.*-Toxine gegenüber bestimmten Schädlingen wurden die kodierenden Gene aus *Bacillus thuringiensis* mit Hilfe gentechnischer Verfahren in Kulturpflanzen übertragen. Die so entstandenen *B.t.*-Pflanzen produzieren ihre Insektizide selbst und wehren damit ihre Fraßfeinde ab. Es sind also insektenresistente Pflanzen. Die aktiven Toxine aus *B.t.*-Pflanzen und *B.t.*-Präparaten sind in ihrer Wirkung vergleichbar. Unterschiedlich ist, dass die in die Pflanze eingeführten *B.t.*-Gene verkürzt und an die Pflanze angepasst worden sind. Außerdem liegt das Protein dort nicht als Kristall, sondern in gelöster Form vor. Bei etwa 30 Pflanzenarten wird daran gearbeitet, durch Übertragung von *B.t.*-Toxin-Genen Resistenzen gegen verschiedene Fraßinsekten zu erzeugen. Zurzeit sind hier insbesondere Mais, Baumwolle und Kartoffeln zu nennen.

Die ersten gentechnisch veränderten Pflanzen wurden 1996 in den USA ausgesät. Inzwischen ist ihre Anbaufläche weltweit auf über 100 Millionen Hektar angestiegen. Gut die Hälfte der globalen Flächen, die mit gentechnisch veränderten Pflanzen bestellt werden, entfallen auf die USA. Unter den gentechnisch veränderten Pflanzen nehmen die *B.t.*-Pflanzen den größten Anteil ein.

Bedeutende *B.t.*-Pflanzen

B.t.-Mais gegen Maiszünsler mit Toxin Cry1Ab

B.t.-Mais gegen Maiswurzelbohrer mit Toxin Cry3Bb1

B.t.-Mais gegen Maiswurzelbohrer mit binärem Toxin Cry34Ab1/Cry35Ab1

B.t.-Baumwolle gegen Baumwollkapselwurm mit Toxin Cry1Ac

B.t.-Kartoffel gegen Kartoffelkäfer mit Toxin Cry3A

In der EU wird ausschließlich gentechnisch veränderter Mais, also *B.t.*-Mais, angebaut, wobei die Anbaufläche in Deutschland im Jahr 2006 ca. 950 Hektar umfaßte. Daher wird in der BBA seit längerer Zeit über Auswirkungen von *B.t.*-Mais geforscht.

Links

[- *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature](#)

[- *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database](#)

[- *Bacillus* Genetic Stock Center \(BGSC\)](#)

[- COST action 862: Bacterial Toxins for Insect Control](#)

[- GM Crop Database](#)

[- Vorlesung an der TU Darmstadt: *Bacillus thuringiensis* Folien](#)

[- Vorlesung an der TU Darmstadt: *Bacillus thuringiensis* Skript](#)

(Die Vollständigkeit der *B.t.*-Präparate kann nicht garantiert werden.)