

**Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem**

Heft 233

November 1986



**Symposium in memoriam Dr. Ernst Berliner
anlässlich des 75. Jahrestages der
Erstbeschreibung von *Bacillus thuringiensis***

Darmstadt, 25. August 1986

Symposium in memoriam Dr. Ernst Berliner
on the occasion of the 75th anniversary
of primary description of *Bacillus thuringiensis*

bearbeitet von
Dr. A. Krieg und Dr. A. M. Huger

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

Berlin, 1986

*Herausgegeben
von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem*

Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
Lindenstraße 44-47, D-1000 Berlin 61

ISSN 0067-5849

ISBN 3-489-23300-X

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek
Symposium in Memoriam Doktor Ernst Berliner
<1986, Darmstadt>:

Symposium in Memoriam Dr. Ernst Berliner: anlässl. d. 75. Jahrestages d. Erstbeschreibung von *Bacillus thuringiensis*; Darmstadt, 25. August 1986 / hrsg. von d. Biolog. Bundesanst. für Land- u. Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. Bearb. von A. Krieg u. A. M. Huger. – Berlin; Hamburg: Parey, [in Komm.] 1987.

(Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem; H. 233)

ISBN 3-489-23300-X

NE: Krieg, Aloysius [Bearb.]; Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft <Berlin, West; Braunschweig>: Mitteilungen aus der . . . ; Symposium in Memoriam Doktor Ernst Berliner

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funk- sendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Werden einzelne Vervielfältigungsstücke in dem nach § 54 Abs. 1 UrhG zulässigen Umfang für gewerbliche Zwecke hergestellt, ist an den Verlag die nach § 54 Abs. 2 UrhG zu zahlende Vergütung zu entrichten, die für jedes vervielfältigte Blatt 0,40 DM beträgt.

1986 Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, Lindenstraße 44-47, D-1000 Berlin 61.
Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, 1000 Berlin 62.

Inhalt

| | Seite |
|--|-------|
| Dr. Ernst Berliner | 5 |
| Curriculum vitae | 6 |
| Vorwort | 7 |
| Symposium: Veranstalter und Vortragende | 8 |
| G. SCHUHMAN: Grußwort | 9 |
| A. KRIEG: Entdeckung des <u>Bacillus thuringiensis</u> durch Dr. Ernst Berliner: Ein Meilenstein der Insektenpathologie und mikrobiologischen Bekämpfung von Schadinsekten. (dtsh.) | 11 |
| J.D. BRIGGS: Frühphase und Fortschritte in der kommerziellen Nutzung von <u>Bacillus thuringiensis</u> in Nordamerika. (engl.) | 25 |
| J. WEISER: Bedeutung des <u>Bacillus thuringiensis</u> für die angewandte Entomologie in Osteuropa und in der Sowjetunion. (engl.) | 37 |
| G.A. LANGENBRUCH: Verfahren der praktischen Anwendung von <u>Bacillus thuringiensis</u> im Pflanzenschutz. (dtsh.) | 51 |
| N. BECKER: <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u> : Eine mikrobielle Alternative in der Bekämpfung von Stechmücken und Kriebelmücken. (dtsh.) | 69 |
| A.M. HUGER, A. KRIEG, G. A. LANGENBRUCH und W. SCHNETTER: Entdeckung eines neuen Stammes von <u>Bacillus</u> <u>thuringiensis</u> , der gegen Käfer wirksam ist. (engl.) | 83 |
| P. LÜTHY: Genetik des <u>Bacillus thuringiensis</u> und Möglichkeiten der genetischen Manipulation. (engl.) | 97 |
| F. KLINGAUF: Schlußwort | 111 |

C o n t e n t s

| | Page |
|--|------|
| Dr. Ernst Berliner | 5 |
| Curriculum vitae | 6 |
| Preface | 7 |
| Symposium: Organization and speakers | 8 |
| G. SCHUHMANN: Address of welcome | 9 |
| A. KRIEG: The discovery of <u>Bacillus thuringiensis</u> by Dr. Ernst Berliner: A milestone in insect pathology and microbial control of insect pests. (in German) | 11 |
| J.D. BRIGGS: Pioneering and advanced phase of commercial use of <u>Bacillus thuringiensis</u> in North-America. (in English) . | 25 |
| J. WEISER: Impact of <u>Bacillus thuringiensis</u> on applied entomology in Eastern Europe and in the Soviet Union. (in English) | 37 |
| G.A. LANGENBRUCH: Methods of practical application of <u>Bacillus thuringiensis</u> in plant protection. (in German)... | 51 |
| N. BECKER: <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u> : A microbial alternative in control of mosquitoes and black flies. (in German) | 69 |
| A.M. HUGER, A. KRIEG, G. A. LANGENBRUCH und W. SCHNETTER: Discovery of a new strain of <u>Bacillus thuringiensis</u> , effective against Coleoptera. (in English) | 83 |
| P. LÜTHY: Genetics and aspects of genetic manipulation of <u>Bacillus thuringiensis</u> . (in English) | 97 |
| F. KLINGAUF: Closing remarks | 111 |



Ernst Berliner

Dr. Ernst Berliner 1880-1957

Dr. Ernst BERLINER
Curriculum vitae

- 1880, 15. Sept. Geburt zu Berlin
Vater: Albrecht Berliner; Mutter: Hedwig, geb. Köppen
- 1901 Abitur am Humboldt-Gymnasium Berlin
- 1900-1904 Königliche Technische Hochschule Berlin-Charlottenburg,
Fachrichtung: Maschinenbau
- 1904-1908 Friedrich-Wilhelm-Universität Berlin, Studium der Naturwissenschaften. Seine akademischen Lehrer waren u.a. die Professoren O. HERTWIG, VIRCHOW, PLATE, WARBURG, insbesondere aber SCHAUDINN, HARTMANN, SCHULZE und BRANCA.
Wissenschaftliche Tätigkeit am Zoologischen Institut der Universität und am Robert-Koch-Institut in Berlin
- 1909, 8. Mai Promotion zum Dr. phil. Dissertation: "Flagellatenstudien" (Archiv für Protistenkunde 15 (3), 28-32, 1909)
- 1909-1912 Assistent und dann Abteilungsleiter an der Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung in Berlin
- 1911 Erstbeschreibung des Bacillus thuringiensis als Pathogen: "Die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe" (Zeitschrift für das gesamte Getreidewesen 3 (3), 63-70, 1911)
- 1912-1914 Abteilungsleiter an der agrikulturchemischen Kontrollstation der Landwirtschaftskammer Halle (Saale)
- 1915 Ausführliche Veröffentlichung: "Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis n.sp." (Zeitschrift für angewandte Entomologie 2, 29-56, 1915)
- 1914-1919 Teilnahme am 1. Weltkrieg als Kriegsfreiwilliger; Leutnant und Kompanieführer in Frankreich und Rußland; Kriegsauszeichnungen: Eisernes Kreuz 2. und 1. Klasse
- ab 1920 Leitender Chemiker bei dem Mühlenkonzern Malmö Stora Walskvarn in Schweden
- ab 1927 Leiter des Forschungsinstituts für Getreidechemie der MIAG in Frankfurt am Main
- 1921 Vermählung mit Helene Martha geb. Ast (verstorben 1954)
- 1922 Geburt eines Sohnes: Kurt Albrecht (gefallen 1944)
- 1928 Geburt einer Tochter: Hildur Hedwig
- 1931 Selbständige Weiterführung des Forschungsinstituts für Getreidechemie in Darmstadt-Eberstadt
- 1927-1933 Privatdozent an der Technischen Hochschule Darmstadt; Vorlesungen über Getreide-Chemie
- 1936-1938 Leitung von wissenschaftlichen Ausbildungskursen in Wien, Prag, Zürich und Paris
- 1933-1945 Rassisch und politisch verfolgt; Arbeitsbeschränkung; Veröffentlichungsverbot
- 1944 Mit seiner Frau zeitweilig in Haft der Geheimen Staatspolizei
- 1949-1957 Arbeitsgemeinschaft im Forschungsinstitut für Getreidechemie in Darmstadt-Eberstadt zusammen mit Dr. Neitzert
- ab 1950 Initiator der alljährlich stattfindenden "Jugenheimer Diskussionstagung" der Arbeitsgemeinschaft Getreidechemie
- 1955 Auszeichnung mit dem Verdienstkreuz am Bande des Verdienstordens der Bundesrepublik Deutschland;
- 1957, 28. Okt. Tod nach längerem schweren Leiden in Bensheim-Auerbach; Beisetzung auf dem Friedhof in Darmstadt-Eberstadt

(zusammengestellt mit Hilfe von Frau Hildur Kipper-Berliner und Herrn Dr. Kurt Neitzert)

V o r w o r t

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung von Bacillus thuringiensis bei der Bekämpfung von Schadinsekten wurde von dem Institut für biologische Schädlingsbekämpfung der Biologischen Bundesanstalt am 25. August 1986 ein Internationales Symposium in Darmstadt veranstaltet. Anlaß des Symposiums war die Erstbeschreibung von B. thuringiensis durch Dr. Ernst BERLINER vor 75 Jahren. Anwendungsfertige Präparate dieses Bacillus werden seit 1958 im technischen Maßstab produziert. Inzwischen kennt man verschiedene Pathotypen mit selektiver Wirkung auf bestimmte Gruppen von Insekten.

Wissenschaftler aus dem In- und Ausland berichteten über die Verwendung von B. thuringiensis in der Land- und Forstwirtschaft sowie über seine Verwendung im Hygiene-Sektor zur Bekämpfung von potentiellen Überträgern von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier. Da B. thuringiensis ökologisch und toxikologisch unbedenklich ist, soll sein Einsatz dazu beitragen, weltweit die Verwendung von breitenwirksamen Insektiziden zur Schädlingsbekämpfung weiter einzuschränken.

Des allgemeinen Interesses wegen werden die Beiträge dieses Symposiums hiermit in den Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt veröffentlicht. Die Vorträge wurden in Deutsch bzw. in Englisch gehalten. Eine Zusammenfassung bzw. Summary in der jeweils anderen Sprache ist jeder Publikation vorangestellt.

Darmstadt, 25. August 1986

Dr. A.M. Huger

Dr. A. Krieg

Symposium in memoriam
Dr. Ernst Berliner
anlässlich des
75. Jahrestages der
Erstbeschreibung von
Bacillus thuringiensis

Symposium in memoriam
Dr. Ernst Berliner
on the occasion of the
75th anniversary of
primary description of
Bacillus thuringiensis

Darmstadt, 25. August 1986

Institut für biologische Schädlingsbekämpfung der
Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Darmstadt

Programm-Komitee:

Program-Committee:

Dr. A. KRIEG
Dr. A.M. HUGER

Vortragende:

Speakers:

Dr. N. BECKER, Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der
Stechmückenplage, Ludwigshafen (Rhein)

Prof. Dr. J. D. BRIGGS, Invertebrate Pathology Laboratory, Dept.
of Entomology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Dr. A.M. HUGER, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung
der Biologischen Bundesanstalt, Darmstadt

Dr. A. KRIEG, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung
der Biologischen Bundesanstalt, Darmstadt

Dr. G.A. LANGENBRUCH, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung
der Biologischen Bundesanstalt, Darmstadt

Dr. P. LÜTHY, Mikrobiologisches Institut der Eidgenössischen
Technischen Hochschule Zürich, Schweiz

Dr. J. WEISER, Laboratory of Insect Pathology, Institute of Entomology,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prag, Tschechoslowakei

G r u ß w o r t

Meine sehr verehrten Damen und Herren!

Als Präsident der Biologischen Bundesanstalt heiÙe ich Sie hier in Darmstadt zu diesem Kolloquium herzlich willkommen.

In dem Bestreben, mehr spezifische und weniger toxische Mittel oder Verfahren zur Bekämpfung von Schadorganismen einzusetzen, können Entomophagen und Insektenpathogene allein oder als Bausteine integrierter Systeme zur Bekämpfung von Schadinsekten beitragen.

Das Interesse an einem Symposium anläÙlich des 75. Jahrestages der Erstbeschreibung von Bacillus thuringiensis zeigt, daÙ sich die Insektenpathologie von einer weitgehend unbekanntem Disziplin zu einer Wissenschaft mit praktischen Möglichkeiten entwickelt hat.

In unserer Anstalt bearbeitet das Institut für biologische Schädlingsbekämpfung hier in Darmstadt inzwischen seit 33 Jahren insektenpathologische Probleme und der erste Pilotversuch mit Bacillus thuringiensis liegt genau 30 Jahre zurück. Damals gelang es mit einem im Laboratorium hergestellten Bacillus thuringiensis-Präparat erstmals bei uns, die Raupen des Kohlweißlings auf einem Versuchsfeld wirksam zu bekämpfen. - Seit 1958 bahnte sich dann auf dem Gebiet des Bacillus thuringiensis eine Zusammenarbeit zwischen dem Institut und der Industrie an, die 1964 zur amtlichen Anerkennung eines ersten Biopräparates in Deutschland führte, dem "Biospor" der Firma Hoechst AG. - Feldversuche des Instituts mit kommerziellen Präparaten wurden zunächst im Gemüsebau zur Bekämpfung von Kohlschädlings angelegt und im Obstbau zur Bekämpfung des Goldafters, von Gespinstmotten und verschiedenen Wicklern. Ein größerer Einsatz von Bacillus thuringiensis mit dem Hubschrauber erfolgte 1967 und 1968 auf Veranlassung der hessischen Forstverwaltung im Spessart zur Bekämpfung des Eichenwicklers. Im Jahr 1971 begann die mikrobiologische Bekämpfung des Mais-

zünslers in Hessen und Nordbaden mit Hubschrauber und Bodengeräten. In letzter Zeit gibt es auch eine Zusammenarbeit zwischen Darmstadt und unserem Institut für Vorratsschutz in Berlin mit dem Ziel einer Bekämpfung von Mehlmotten in Getreidelagern mit Bacillus thuringiensis.

Weiterhin ist zu erwähnen die Initiative des Zoologischen Instituts der Universität Heidelberg im Hinblick auf die Rheinschnakenbekämpfung mittels Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Sie führte vor 10 Jahren zur Gründung einer Aktionsgemeinschaft zur biologischen Bekämpfung der Schnakenplage in Ludwigshafen, die heute über 70 Gemeinden in Rheinland-Pfalz und Nordbaden umfaßt. Ihre erfolgreiche Tätigkeit ist inzwischen international anerkannt.

Schließlich gelang hier im Darmstädter Institut 1982 die Isolierung eines neuen Pathotyps von Bacillus thuringiensis, der insbesondere gegen den Kartoffelkäfer wirksam ist. Diese Entwicklung zeigt, daß die Geschichte des Bacillus thuringiensis sicher noch nicht zu Ende ist.

In diesem Sinn wünsche ich Ihnen ein interessantes Symposium über die Fortschritte der Bacillus thuringiensis-Forschung und -Anwendung seit 1911 und hier in Darmstadt einen angenehmen Aufenthalt.

Der Präsident
der Biologischen Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft

Prof. Dr. G. Schuhmann

A. KRIEG

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

Die Entdeckung des *Bacillus thuringiensis* durch Dr. Ernst Berliner:
Ein Meilenstein der Insektenpathologie und der mikrobiologischen Bekämpfung
von Schadinsekten.
- Rückblick und Ausblick -

The Discovery of *Bacillus thuringiensis* by Dr. Ernst Berliner:
A Milestone in Insect Pathology and Microbial Control of Pest Insects
- A retrospective and prospective view -

Summary

A period of about 75 years passed between the discovery of *B. thuringiensis* subspec. thuringiensis as pathogen of the Mediterranean flour moth (Ephestia kühniella) in 1911 by BERLINER in Germany and the first commercial use in 1960. Later on DULMAGE isolated the HD-1 strain, which is significantly more effective than many other strains; therefore, most of the commercial preparations for control of lepidopterous pests are nowadays based on this strain. - In 1976 GOLDBERG and MARGALIT discovered *B. thuringiensis* subspec. israelensis in samples from a mosquito breeding place in the Negev Desert. Already five years later preparations of this strain suitable for mosquito control were available on the market. - Recently in 1982 KRIEG et al. isolated from the Yellow mealworm (Tenebrio molitor) a strain of *B. thuringiensis* subspec. tenebrionis, which is pathogenic for some chrysomelids. Pilot experiments in the laboratory and in the field demonstrated the sensitivity of larvae of the Colorado beetle against this new pathotype. - Future work should focus not only on production of preparations with an improved efficiency, but also on preparations based on strains with new host ranges. Beside screening of new isolates also efforts in genetic engineering (recombinant DNA techniques) may have here some chance of success.

Ernst Berliner wurde 1880 in Berlin geboren. Nach dem 1901 bestandenen Abitur und dem Besuch der Technischen Hochschule in Charlottenburg studierte er ab 1904 an der Friedrich-Wilhelm-Universität seiner Heimatstadt Naturwissenschaften. Aufgrund einer Inaugural-Dissertation über "Flagellaten-Studien" wurde er 1909 in der philosophischen Fakultät zum Dr. phil. promoviert. Nach kurzer Assistenten-Zeit am Robert-Koch-Institut des Kaiserlichen Gesundheitsamtes, ging er als wissenschaftlicher Mitarbeiter zur "Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung". Hier, ebenfalls in Berlin, beschäftigte er sich auf Veranlassung des Direktors dieses Instituts, Prof. Dr. Buchwald, mit den natürlichen Gegenspielern (Entomophagen) der Mehlmotte und zwar mit dem Fernziel einer biologischen Schädlingsbekämpfung. Wie realistisch er damals schon die Situation einschätzte geht aus folgendem Zitat von BERLINER (1911) hervor:

"Ist auch die natürliche Bekämpfungsmethode von Insektenschädlingen infolge vieler Fehlschläge zurzeit etwas in Mißkredit geraten, so liegt hier nicht die Hauptschuld in der Methode selbst, sondern darin, daß man mit übertriebenen Hoffnungen an die Sache herantrat und infolgedessen ein eingehendes, systematisches Studium für entbehrlich hielt. Das Auftauchen immer neuer chemischer Bekämpfungsmittel gegen unsere Schädlinge in Wald, Feld und Speicherräumen beweist, daß es unter ihnen nur recht wenige gibt, die wirklich ihren Zweck erfüllen und deshalb sollte auch allen Krankheiten der Schädlinge, seien sie parasitärer oder nicht parasitärer Natur, endlich einmal die gebührende Aufmerksamkeit geschenkt werden, zumal durch ihr Studium gleichzeitig zahlreiche Lücken in unseren Kenntnissen der Insektenbiologie ausgefüllt werden würden."

Über die im Zusammenhang mit seinen Parasiten-Studien erfolgte Entdeckung des Bacillus thuringiensis ist schnell berichtet: Im Jahr 1909 trat in einer Einsendung von Mehlmotten aus einer thüringischen Mühle spontan eine seuchenhafte Erkrankung auf. In Analogie zu manchen anderen Insektenkrankheiten wurde sie aufgrund der auffälligen Symptome als "Schlaffsucht" bezeichnet. Sie breitete sich alsbald in verschiedenen Mehlmotten - Zuchten des Instituts aus und wurde deshalb 1910 eingehender untersucht. Über die ersten Versuchsergebnisse berichtete BERLINER dann 1911 in der Zeitschrift für das gesamte Getreidewesen unter dem Titel: "Die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe". Weitere Ergebnisse, die BERLINER noch vor seiner Teilnahme am 1. Weltkrieg erarbeitet hatte, wurden im Jahr 1915 in der Zeitschrift für angewandte Entomologie publiziert: "Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis n. sp.". In dieser Arbeit wird bereits die Wirtsspezifität von B. thuringiensis erwähnt,

speziell, daß im Gegensatz zu Mehlmotten-Larven der Gemeine Mehlkäfer (Tenebrio molitor) und seine Larven nicht empfindlich sind.

Nach dem 1. Weltkrieg veranlaßten dann im Jahr 1921 Prof. Dr. Harms und Geheimrat Korschelt, daß zunächst von Herrn Lütke und nach dessen Tod von Herrn Mattes die Arbeiten über die Schlaffsucht der Mehlmotte und ihren Erreger am Zoologischen Institut der Universität Marburg fortgesetzt wurden. Da der Original-Stamm von Berliner nicht hinterlegt worden war, mußte von Mattes in Marburg der Schlaffsucht-Erreger neu isoliert werden, was aber offenbar keine großen Schwierigkeiten bereitete. Mattes produzierte nach der Vorschrift von Berliner wirksames Sporenmateriale, mit dem er Mehl bestäubte oder besprühte. Da er aber als Versuchstiere sich bereits einspinnende Altraupen der Mehlmotte verwendete, gelangte er leider zu recht unbefriedigenden Ergebnissen hinsichtlich einer infektionsbedingten Abtötungsrate. Nach Veröffentlichung der diesbezüglichen Ergebnisse von MATTES in den "Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesamten Naturwissenschaften" zu Marburg im Jahr 1927 wurden die Arbeiten offenbar nicht weiter fortgesetzt.

Dafür liefen von 1929 bis 1931 Arbeiten über B. thuringiensis im Rahmen eines von den USA unterstützten internationalen Projektes zur mikrobiologischen Bekämpfung des Maiszünslers mit Schwerpunkt in Südosteuropa. Die in diesem Zusammenhang von METALNIKOV und Mitarbeiter isolierten wirksamen Sporenbildner konnten später größtenteils als Stämme von Bacillus thuringiensis identifiziert werden. Von diesen seien genannt: Bacterium ephestiae, Bacterium galleriae, Bacterium pyraustae, Bacterium cazaubon, Bacterium italicum und Bacterium pyrenei, die 1929 bzw. 1930 beschrieben wurden.

Schon 1928 erzielte HUSZ in Ungarn im Rahmen dieses internationalen Projekts erste Erfolge mit B. thuringiensis gegen den Maiszünsler (Ostrinia nubilalis syn. Pyrausta nubilalis). Auch CHORINE berichtete 1931 über entsprechende Ergebnisse aus Kroatien. Demgegenüber fand ECKSTEIN 1934 in Deutschland mit den ihm zur Verfügung stehenden Präparaten keine überzeugende Wirkung am Maiszünsler. Auch POSPELOV erzielte 1936 bei Feldversuchen in der Nähe von Leningrad nur einen mäßigen Erfolg gegenüber diesem Schädling, konnte dafür aber einen befriedigenden Effekt beim Kohlweißling (Pieris brassicae) verbuchen. Schließlich beobachtete METALNIKOV 1938 in Frankreich auch eine gewisse Wirkung von B. thuringiensis auf verschiedene Wickler (Clysia ambi-

guella, Sparganothis pilleriana, Lobesia botrana) im Weinbau.

Als nach 1950 im Zusammenhang mit den damals sehr modernen Kontaktinsektiziden eine Reihe von schwerwiegenden Problemen (im Hinblick auf Folgekalamitäten, Persistenz, Resistenz und Toxizität) auftauchten, entstand plötzlich eine große Nachfrage nach selektiven und toxikologisch unbedenklichen Mitteln. In diesem Zusammenhang stieg das Interesse an spezifischen biologischen Agentien wie etwa B. thuringiensis insbesondere in Nordamerika und Europa.

Erste Erfolge im Freiland erzielte dann KLEMENT 1951 gegen den Weißen Bärenspinner (Hyphantria cunea) in Ungarn und zur gleichen Zeit STEINHAUS (1951) gegen den Luzerne-Heufalter (Colias eurytheme) in Californien. Kurz darauf berichteten GRISON u. BEGUIN (1954) über Bekämpfungserfolge gegen den Kiefernprozessionsspinner (Thaumetopoea pityocampa) in Frankreich. Zu dieser Zeit wurden auch in unserem Institut hier in Darmstadt entsprechende Versuche mit B. thuringiensis aufgenommen. So konnte KRIEG 1957 über gute Bekämpfungsergebnisse gegen Raupen des Kohlweißlings (Pieris brassicae) im Freiland berichten. Entsprechende Ergebnisse hatten inzwischen auch LEMOIGNE u. Mitarb. 1956 in Frankreich erhalten, wo sich in Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur eine Gruppe von Wissenschaftlern unter Leitung von GRISON in La Minière bei Versailles intensiv mit der Nutzung von B. thuringiensis beschäftigte. Kurz darauf kamen Berichte aus Irkutsk in der UdSSR, daß TALALAEV 1958 mit einem neuen Isolat von B. thuringiensis gleichfalls gute Ergebnisse gegen den Sibirischen Arvenspinner (Dendrolimus sibiricus) erzielt hatte. - Auch im Vorratsschutz besann man sich jetzt wieder auf B. thuringiensis. So konnte JAKOBS 1950 eine erfolgreiche Bekämpfung der Mehlmotte (E. kühniella) durch eine Oberflächen-Kontamination von Getreideschüttungen erreichen. Auch zur Bekämpfung der Wachsmotte (Galleria mellonella) bot sich B. thuringiensis besonders deshalb an, weil er im Gegensatz zu synthetischen Insektiziden für die Honigbiene völlig ungefährlich ist. Entsprechende Versuche von KRIEG u. FRANZ (1959) bestätigten die Brauchbarkeit von B. thuringiensis zu diesem Zweck.

Als BERLINER im Jahr 1957 in der Nähe von Darmstadt und zwar in Bensheim-Auerbach starb, war so aufgrund inzwischen vorliegender praxisbezogener Versuche in Labor und Freiland die Hoffnung in Erfüllung gegangen, seinen Bacillus in der biologischen Bekämpfung von Schadinsekten angewandt zu sehen.

Während es sich aber bei den bis 1957 durchgeführten Versuchen durchweg um Pilot-Versuche mit Laborpräparaten in kleinem Maßstab handelte, begannen nun verschiedene Firmen mit der Produktion von B. thuringiensis in technischem Maßstab, wobei die Verfahren z.T. durch Patente abgesichert wurden (BONNEFOI - franz. Patent 1960; MECHALAS - US-Patent 1961; DRAKE u. SMYTHE - US-Patent 1960; MEGNA - Canad. Patent 1962). Im Jahr 1958 wurden dann die ersten Felderprobungen gegen den Kleinen Kohlweißling (Pieris rapae) und die Amerikanische Gemüseeule (Trichoplusia ni) mit einem kommerziellen Produkt der Biofarm Corporation in Californien erfolgreich abgeschlossen. Inzwischen hatten auch entsprechende Safety-Tests die pathologische und toxikologische Unbedenklichkeit von B. thuringiensis für Mensch und Vieh bzw. entsprechende Modelltiere gezeigt (FISHER u. ROSNER, 1959). So konnte 1960 das "Thuricide" als erstes industrielles Biopräparat auf der Basis des "German Strain" (wie der MATTES-Stamm genannt wurde) vom USDA offiziell für Bekämpfungszwecke zugelassen werden (HARVEY, 1960). In kurzer Zeit wurden weltweit 8 industrielle Biopräparate dieser Art produziert und in den USA, Frankreich, Deutschland und der UdSSR amtlich zugelassen. Daraufhin konnten die ersten größeren Bekämpfungsaktionen gegen Raupenplagen in der Land- und Forstwirtschaft anlaufen. Über die dabei erzielten Erfolge wurde bereits anderorts ausführlich berichtet (z.B. KRIEG, 1961, 1967, 1970, 1986).

Nachdem 1970 von DULMAGE in den USA der besonders virulente Stamm HD-1 (B. thuringiensis subsp. kurstaki) isoliert worden war, wurden mit industriell hergestellten Präparaten auch gute Erfolge gegen weniger empfindliche Lepidopteren-Arten erzielt. Inzwischen dürften die mit diesem Stamm alljährlich behandelten Flächen weltweit in der Land- und Forstwirtschaft zwischen 2 und 4 Millionen Hektar liegen. Die entsprechende Produktion dürfte sich auf 3000 bis 4000 Tonnen pro Jahr belaufen.

Was den Wirtsbereich von B.t. subsp. thuringiensis betrifft, so berichteten bereits METALNIKOV u. CHORINE (1929), daß neben dem Maiszünsler auch noch Schwammspinner (Lymantria dispar), Weidenspinner (Stilpnotia salicis), Baumwweißling (Aporia crataegi) und Kohlweißling (Pieris spp.) empfindlich sind im Gegensatz zu vielen anderen Insekten. Deshalb betrachteten schon diese Autoren den Bacillus als selektiv auf Schmetterlingsraupen wirksam. Bis zum Jahre 1960 kannte man bereits etwa 150 empfindliche Lepidopteren-Arten und bis heute hat

sich diese Zahl noch einmal verdoppelt.

Während BERLINER vor allem eine toxische Wirkung von B. thuringiensis auf den Raupendarm als Krankheitsursache bei der Mehlmotte ansah, hob MATTES hingegen die Bedeutung der im Raupendarm auskeimenden Bazillen und deren Durchbruch durch die Darmwand für eine terminale Septikämie besonders hervor.

Sowohl BERLINER als auch MATTES beschrieben neben der Spore einen rhomboiden "Restkörper" im Sporangium. Doch wies erst HANNAY 1953 auf die mögliche Bedeutung dieses "parasporalen Körpers" für die Wirksamkeit gegenüber Insekten hin. ANGUS (1954) stellte dann die toxische Natur von alkali-gelösten Kristallen für empfindliche Schmetterlingsraupen fest, während HANNAY u. FITZ-JAMES (1955) schließlich den Proteincharakter des Kristalltoxins nachwiesen. Diese Grundlagenarbeiten waren in verschiedenen Forschungs-Instituten in Canada durchgeführt worden. Über pathologische Reaktionen und insbesondere über eine toxisch bedingte Darmparalyse bei Raupen berichteten ausführlich HEIMPEL u. ANGUS (1959) vom Insect Pathology Laboratory in Sault Ste. Marie in Canada.

Nach diesen Untersuchungsergebnissen erfolgt im Anschluß an die perorale Aufnahme von sporuliertem B. thuringiensis in den Insektendarm die Auflösung der Kristalle im alkalischen Darmsaft. Das durch Teil-Hydrolyse freiwerdende Toxin wirkt nekrotisierend auf das Darmepithel. Die Folge ist ein Zusammenbruch der Darmschranke gefolgt von einer Toxämie oder auch einer Bakteriämie nach Keimung der Sporen. Bei ausreichender Dosis sterben die Raupen innerhalb weniger Tage, wobei zuvor schon - kurz nach Aufnahme der tödlichen Dosis - ein Fraßstop auftritt. Obwohl inzwischen detaillierte Ergebnisse sowohl über das Vorkommen verschiedener pathologischer Reaktionstypen als auch über die den pathologischen Veränderungen zugrundeliegende Membranschädigung der Darmepithelzellen vorliegen, kann hier nicht näher auf die Physiopathologie der B. thuringiensis-Wirkung eingegangen werden (hierzu vgl. KRIEG, 1986).

Für die Praxis ist wichtig zu wissen, daß sporulierte Kulturen bzw. aus ihnen hergestellte Präparate nur eine Wirkung auf die gefräßigen Larven von empfindlichen Zielinsekten zeigen. Dabei nimmt die Empfindlichkeit mit dem Alter der Larven deutlich ab, so daß es sich empfiehlt, vor allem Junglarven zu bekämpfen. Empfindlichkeits-Unterschiede zwischen verschiedenen Wirtspopulationen sind bekannt, aber meist nicht allzu groß. Im Hinblick auf einen mög-

lichen Resistenzerwerb war nur in Einzelfällen als Folge von Selektionsversuchen mit hohem Selektionsdruck im Labor eine gewisse Empfindlichkeits-Abnahme feststellbar. Im allgemeinen induzierten solche Selektionsversuche jedoch keine Resistenz. Erwähnenswert ist noch, daß die Wirkung des B. thuringiensis auf Insekten stark temperaturabhängig ist entsprechend der Temperatur/Reaktionsgeschwindigkeits-Regel.

Im Jahr 1976 begann eine neue Ära der B. thuringiensis-Forschung mit der Entdeckung eines neuen Pathotyps, der selektiv gegenüber Mückenlarven wirksam ist. Der entsprechende Stamm (A 60), von GOLDBERG u. MARGALIT aus Proben von einem Mückenbrutplatz in der Negev-Wüste isoliert, konnte einer neuen Subspecies zugeordnet werden: B. thuringiensis subspec. israelensis. Seine Wirksamkeit ist auf Larven von Dipteren und zwar speziell von Mücken (Nematoceren) beschränkt. Erste Versuche zur Bekämpfung von Mückenlarven in Brutgewässern verliefen bereits 1979 in den USA und Europa erfolgreich, und seit 1981 befinden sich industriell produzierte Präparate auf dem Markt. Durch die Möglichkeit, mit diesem Stamm eine Reihe von wichtigen Krankheits-Überträgern (wie Gelbfiebermücke und Malaria-Mücke) erfolgreich zu bekämpfen, erschloß sich dem Bacillus ein völlig neuer Sektor im Bereich von Hygiene und Gesundheitsschutz.

Die jüngste Entdeckung betrifft die Isolierung eines für bestimmte Coleopteren pathogenen Stammes (BI 256-82) von B. thuringiensis aus einer Puppe des Gemeinen Mehlkäfers (Tenebrio molitor) durch KRIEG u. Mitarb. 1983. Inzwischen gelang es, mit diesem neuen Isolat der subspec. tenebrionis in mehreren Versuchen in der Nähe von Darmstadt, Larven des Kartoffelkäfers im Freiland erfolgreich zu bekämpfen. Auch die erwachsenen Käfer zeigten einen Fraßstop, und die Weibchen stellten anschließend die Eiablage ein.

Auch für die Nutzung der beiden neuen Pathotypen wurden Patente angemeldet (GOLDBERG - US-Patent 1979 bzw. KRIEG, HUGER u. SCHNETTER - dtsh. Patent 1985).

Heute ist B. thuringiensis als ein zur biologischen Bekämpfung geeignetes Insektenpathogen weltweit anerkannt. Die Beschränkung des Wirtsbereichs seiner verschiedenen Pathotypen auf bestimmte Gruppen von Insekten macht ihn zu einem selektiven und umweltschonenden Mittel, das nicht nur viele Nutzinsekten

verschont, sondern insbesondere für Wirbeltiere harmlos ist. - Was die Wirtschaftlichkeit betrifft, so läßt sich B. thuringiensis ohne besonderen Aufwand in einfachen künstlichen Nährmedien preiswert produzieren. Die sporulierte Biomasse ist in getrocknetem Zustand ohne Aktivitätsverlust jahrelang lagerfähig. Entsprechend praxisgerecht formulierte Präparate werden mit der in der Schädlingsbekämpfung üblichen Anwendungstechnik ausgebracht. Ansonsten handelt es sich beim B. thuringiensis um ein gegenüber Sonnenstrahlen empfindliches und daher nicht-persistentes Agens. Da sich der Bacillus im Habitat auch nicht epidemisch auszubreiten vermag, muß er jeweils dem empfindlichen Schadinsekt nachgeführt werden. Der laufende Mittelbedarf der Praxis muß durch eine laufende industrielle Produktion abgedeckt werden.

Was das natürliche Vorkommen von B. thuringiensis betrifft, so wurde er häufig aus kranken Insekten sowie aus Abfällen von Insektenzuchten (z.B. der Seidenraupe) isoliert. Er fand sich ferner in Getreideprodukten und nicht zuletzt in Erdproben, wo er jeweils gemeinsam mit B. cereus vorkam. Im Hinblick auf die Taxonomie ist festzustellen, daß es sich bei B. thuringiensis um spezielle Stämme von B. cereus handelt, die parasporale Toxinkristalle bilden. Insofern hat die Species-Bezeichnung thuringiensis als nomen conservandum heute mehr praktische als wissenschaftliche Bedeutung. Früher wurden B. thuringiensis-Stämme durchweg biochemisch determiniert (vgl. HEIMPEL u. ANGUS, 1958). Dann entwickelten 1962 BONNEFOI u. deBARJAC am Institut Pasteur (Paris) ein System zur Einteilung von B. thuringiensis-Stämmen aufgrund von Geißel- bzw. H-Antigenen. Dieses System hat sich gut bewährt und führte in der Zwischenzeit zur Aufstellung von 30 H-Serotypen. Neuerdings stellten dann SEKIJIMA u. ONO 1982 in Japan ein weiteres serologisches System auf der Basis von Oberflächen- bzw. O-Antigenen auf, das bisher 14 O-Serotypen umfaßt. Beide Systeme ergänzen sich und leisten so bei der Charakterisierung neuer Stämme, bei der Identifizierung von Präparaten und bei der Bearbeitung epidemiologischer Fragen gute Dienste.

In der Praxis hingegen interessieren vor allem die verschiedenen Pathotypen, seitdem man weiß, daß es neben Lepidopteren-pathogenen Stämmen auch Dipteren-wirksame und sogar Coleopteren-pathogene Stämme gibt. Nach Untersuchungen von KRIEG u. Mitarb. (1986) zeigen die parasporalen Toxinkristalle eines jeden Pathotyps serologische, biochemische und oft sogar morphologische Unterschiede, auf deren Basis sie charakterisiert werden können. Andererseits sind

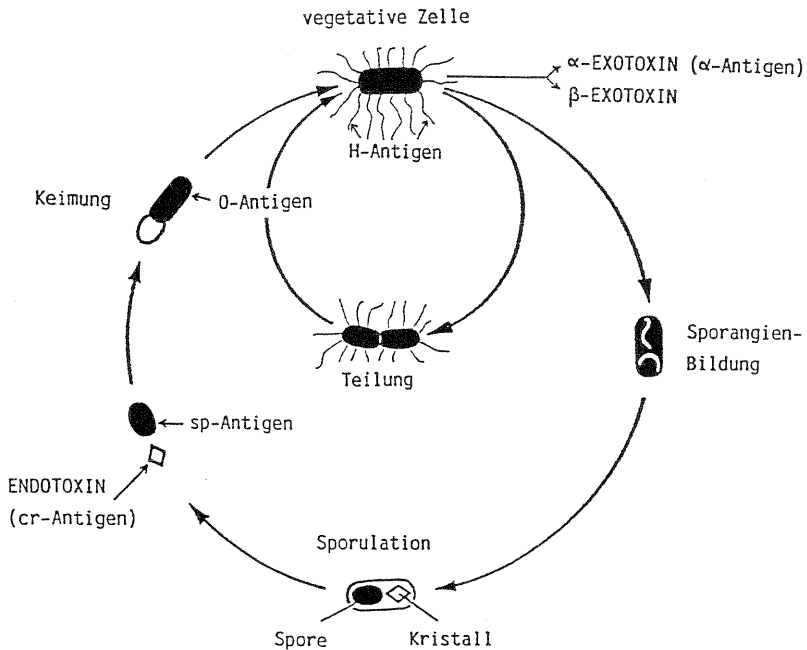


Abb. 1: *Bacillus thuringiensis*: vegetativer und reproduktiver Zyklus.
 In der vegetativen Phase werden gebildet: α -Exotoxin (Protein) und ggf. noch β -Exotoxin (Nucleotid); ihre toxikologische Wirkung ist unspezifisch.
 In der reproduktiven Phase entsteht neben der Spore ein parasporaler Proteinkristall, der eine pathotyp-spezifische Wirkung auf Insekten hat (Endotoxin).

| Pathotyp | Varietät Subspecies | Vegetative Zelle Antigene | | Parasporaler Kristall | | |
|----------|------------------------|------------------------------|-----|------------------------|---------|---------------|
| | | H | O | Gestalt | Antigen | Toxizität |
| A | thuringiensis | 1 | I | bipyramidal | a | Lepidoptera |
| | kurstaki | 3a3b | XII | bipyramidal | | Lepidoptera |
| | galleriae | 5a5b | XII | bipyramidal | | Lepidoptera |
| | aizawai | 7 | XII | bipyramidal | | Lepidoptera |
| | morrisoni | 8a8b | IX | bipyramidal | | Lepidoptera |
| B | Stamm PG-14 | 8a8b | | sphärisch | b | Nematocera |
| | israelensis | 14 | | komplex | | Nematocera |
| C | tenebrionis | 8a8b | IX | flach - quadratisch | c | Chrysomelidae |

Tabelle 1: *Bacillus thuringiensis*, ausgewählte Varietäten
 (Daten nach KRIEG, 1986)

aber durchaus nicht alle B. thuringiensis-Stämme toxisch wirksam. So fanden OHBA u. AIZAWA (1986) bei fast 200 Boden-Isolaten aus Japan nur 36% insektenwirksame Stämme von denen 2/3 für Schmetterlingslarven und 1/3 für Mückenlarven toxisch waren. Käferwirksame Isolate waren nicht darunter. Da die Autoren die Wirksamkeit gegen andere Insekten nicht prüften, ist selbstverständlich nicht ausgeschlossen, daß sich unter den restlichen 64% der Isolate auch noch unbekannte Pathotypen befinden können. In Tabelle 1 sind bedeutende Vertreter der drei verschiedenen Pathotypen von B. thuringiensis aufgeführt und die wichtigsten Eigenschaften ihrer parasporalen Toxinkristalle.

Neben dem parasporalen Kristall, der für die wirtsspezifische Wirkung auf Insekten verantwortlich ist, produzieren B. thuringiensis-Stämme während ihres Wachstums in der Kultur ggf. noch einige andere toxische Metabolite, wie z.B. Exotoxine. Es handelt sich hierbei einerseits um ein thermolabiles Protein, das sog. α -Exotoxin, und andererseits um ein thermostabiles Nucleotid, das sog. β -Exotoxin. Beide Exotoxine sind jedoch in der gewaschenen sporulierten Biomasse von B. thuringiensis nicht mehr enthalten und haben daher auch auf die Anwendung von Präparaten, die nur Sporen und Kristalle enthalten, keinen Einfluß.

Das β -Exotoxin, das nur von bestimmten B. thuringiensis-Stämmen gebildet wird (jedoch nicht von den heute im Westen verwendeten Produktionsstämmen), wirkt sowohl nach Injektion als auch peroral auf verschiedene Insekten-Arten (BURGERJON u. deBARJAC, 1966). Für Wirbeltiere ist es wenig toxisch. - Das α -Exotoxin wird dagegen von allen bisher geprüften Stämmen des B. cereus und B. thuringiensis gebildet und wirkt sowohl auf Insekten als auch auf andere Tiere nach Injektion (KRIEG, 1971). Experimentell hat es als Enterotoxin einen Effekt auf den Kaninchendarm (TURNBULL, 1981). Der Verdacht, auf diese Weise könnte B. thuringiensis auch als Lebensmittelvergifter wirken, veranlaßte das Bundesgesundheitsamt, die Anwendung von B. thuringiensis mit einer Wasserschutzgebiets-Auflage zu belegen.

Diese Wasserschutzgebiets-Auflage schränkt jedoch in der Bundesrepublik nicht nur die Anwendung der selektiven B. thuringiensis-Präparate ein, sondern setzt sie auch dem Verdacht aus, nicht ganz ungefährlich zu sein. Hierzu ist festzustellen, daß sich B. thuringiensis hygienisch ähnlich wie der ihm verwandte B.

bildner. Bei der Anwendung von B. thuringiensis handelt es sich somit nur um eine zeitlich und räumlich begrenzte Titterschwankung in bezug auf die B. cereus / B. thuringiensis-Gruppe im Habitat, wobei der Anteil von B. thuringiensis nach einer Ausbringung durchweg unter 1% liegt. Unter hydrogeologisch ungünstigen Bedingungen im Bereich von Brunnenanlagen (nicht ausreichende Sorption; Störungen im Bodenprofil) würde in jedem Fall der höherkonzentriert im Erdboden vorkommende B. cereus im Grundwasser gegenüber B. thuringiensis dominieren, falls kontaminierte Oberflächenwässer jemals unvorhergesehenweise ins Grundwasser gelangen sollten. Da aber weder Sporen von B. thuringiensis noch solche von B. cereus im Brunnen- und Leitungswasser auskeimen können, besteht für die Wasserversorgung und Wassernutzung selbst dann keine Gefahr, wenn solche Sporen irgendwie einmal im Grundwasser auftauchen sollten. Peroral aufgenommene Sporen von B. cereus oder B. thuringiensis sind für Mensch und Wirbeltiere ohnehin völlig gefahrlos. Da es aber hygienisch unmöglich ist, dem nicht nur im Boden, sondern auch in Lebensmitteln wie Feldfrüchten, Cerealien und sogar Milch ubiquitär vorkommenden und in der Natur dominierenden B. cereus auszuweichen, wird nicht nur die Begründung für eine Wasserschutzgebiets-Auflage sinnlos, sondern auch ihr Zweck. Deshalb wurde weder in der DDR noch im Ausland eine entsprechende Auflage für die Anwendung von B. thuringiensis-Präparaten erlassen (vgl. KRIEG, 1983).

Die Bedeutung von B. thuringiensis als biologisches Insektizid liegt vor allem in seiner Selektivität im Gegensatz zu breitwirksamen synthetischen Insektiziden. Nicht-Zielorganismen werden daher von ihm nicht angegriffen. Insbesondere bleiben Nutzinsekten wie Honigbiene und Entomophagen unversehrt. Lediglich die Seidenraupe (die aber bei uns keine Rolle spielt) ist durch Lepidopteren-spezifische B. thuringiensis-Stämme gefährdet, jedoch nicht durch mücken- oder käferpathogene Stämme. Durch die Schonung der Entomophagen sind insbesondere keine Sekundärkalamitäten als Folge einer B. thuringiensis-Anwendung zu befürchten, wie dies bei der Anwendung nicht-selektiver Mittel immer wieder der Fall ist.

In manchen Fällen besteht sogar die Möglichkeit, allein das Kristalltoxin von B. thuringiensis als biogenes Insektizid einzusetzen, insbesondere dort, wo die Applikation lebender Sporen unerwünscht ist, z.B. im Vorratsschutz. Auch zur Bekämpfung von Mückenlarven im Oberflächenwasser ist allein das entsprechende Kristalltoxin notwendig. Während man heute derartige B. thuringien-

sis-Präparate durch Inaktivierung der Sporen herstellt, besteht auch die Möglichkeit, hierzu sporenlose aber kristallophore Mutanten zur Produktion zu verwenden.

Ein weiterführendes Projekt ist die genetische Manipulation von B. thuringiensis-Stämmen mit dem Ziel, durch Gentransfer "maßgeschneiderte" Produktionsstämme zu erhalten (genetic engineering). Diese Entwicklung nahm ihren Ausgang von der Entdeckung, daß das für Kristallprotein codierende Gen meist in einem Plasmid, also einem extrachromosomalen Genträger, lokalisiert ist. Inzwischen war es möglich, das betreffende Gen in andere Organismen zu transferieren und ggf. sogar "insektizide Pflanzen" als Ergebnis moderner Gentechnologie zu erhalten.

Das Nahziel, das wir verfolgen, ist indessen, durch weiteres intensives Screening von neuen Isolaten sowohl virulentere Stämme zu finden als auch solche mit einem neuen Wirtsbereich, also neuen Pathotypen in der Natur nachzuspüren. Diesem Ziel dienen sowohl entsprechende Anstrengungen in einer Reihe von Einzelinstituten als auch internationale kooperative Programme, die im Hinblick auf die Einschränkung breitwirksamer Insektizide auch von FAO und WHO unterstützt werden.

Literatur:

- ANGUS, T.A., 1954. Nature (London), 173, 545.
- BERLINER, E., 1911. Zschr. ges. Getreidewesen (Berlin), 3, 63-70.
- BERLINER, E., 1915. Zschr. angew. Entom., 2, 29-56.
- BONNEFOI, A., deBARJAC, H., 1962. Entomophaga, 8, 223-229.
- BURGERJON, A., deBARJAC, H., 1960. Compt. rend. Acad. Sci. Paris, 251, 911-912.
- DULMAGE, H.T., 1970. J. Invertebr. Pathol., 15, 232-239.
- ECKSTEIN, F., 1934. Arb. physiol. angew. Entom. (Berlin-Dahlem), 1, 109-131.
- FISHER, R.A., ROSNER, L., 1959. J. agric. Food Chem. (Washington), 7, 686-688.
- GOLDBERG, L.J., MARGALIT, J., 1977. Mosquito News, 37, 355-358.
- GRISON, P., BEGUIN, A., 1954. Compt. rend. Acad. Agric. France, 40, 413-416.
- HANNAY, C.L., 1953. Nature (London), 172, 1004.
- HANNAY, C.L., FITZ-JAMES, P.C., 1955. Canad. J. Microbiol., 1, 694-710.
- HARVEY, J.L., 1960. US Federal Reg., Rules and Regulations 1960, 3207-3208.
- HEIMPEL, A.M., ANGUS, T.A., 1958. Canad. J. Microbiol., 4, 531-541.
- HEIMPEL, A.M., ANGUS, T.A., 1959. J. Insect Pathol., 1, 152-170.
- HUSZ, B., 1929. Intern. Cornborer Invest., Sci. Repts., 2, 99-110.
- JAKOBS, S.E., 1950., Proc. Soc. appl. Bact., 13, 83-91.
- KLEMENT, Z., 1951. (Jahrbuch d. Zentralinstituts f. landwirtschaftl. Versuchswesen, Budapest), 3, 118-127.
- KRIEG, A., 1957. Z. Pflanzenkrankh., 64, 321-327.
- KRIEG, A., 1961. Mittlg. Biol. Bundesanstalt (Berlin-Dahlem), 103, 79 pp.
- KRIEG, A., 1967. Mittlg. Biol. Bundesanstalt (Berlin-Dahlem), 125, 106 pp.
- KRIEG, A., 1970. Nachrbl. dtsh. Pflanzenschutzd., 22, 97-103.
- KRIEG, A., 1971. J. Invertebr. Pathol., 17, 134-135.
- KRIEG, A., 1983. Anz. Schädlingkde., 56, 41-42.
- KRIEG, A., 1986. Bacillus thuringiensis, ein mikrobielles Insektizid, Grund-

lagen und Anwendung. Acta Phytopathologica Heft 10. Verlag Paul Parey, Berlin, 191 pp.

KRIEG, A., FRANZ, J., 1959. Naturwissenschaften, 46, 22-23.

KRIEG, A., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., SCHNETTER, W., 1983. Zschr. angew. Entom., 96, 500-508.

KRIEG, A., SCHNETTER, W., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., 1986. System. Appl. Microbiol. im Druck

LEMOIGNE, M., BONNEFOI, A., BEGUIN, S., GRISON, P., MARTOURET, D., SCHENK, A., VAGO, C., 1956. Entomophaga, 1, 19-34.

MATTES, O., 1927. Sitzungsber. Ges. Beförd. ges. Naturwiss., Marburg, 62, 382-417.

METALNIKOV, S., 1938. Compt. rend. Acad. Agric. France, 24, 652-660.

METALNIKOV, S., CHORINE, V., 1929. Intern. Cornborer Invest. Sci. Repts., 2, 60-61.

OHBA, M., AIZAWA, K., 1986. J. Invertebr. Pathol., 47, 12-20.

POSPELOV, V.P., 1936. (Zusammenfassung wiss. Forschungsarbeiten d. Inst. f. Pflanzenschutz i.J. 1935) Akad. Landwirtschafts-Wiss. Leningrad, 318-321.

SEKIJIMA, Y., ONO, K., 1982. Appl. Entom. Zool. (Jap.) 17, 393-397.

STEINHAUS, E.A., 1951. Calif. Agric. (Berkeley), 5, 5.

TALALAEV, E.V., 1958. Ent. Obozr., 37, 641-652.

TURNBULL, P.C.B., 1981. Pharmac. Therap., 13, 453-505.

J.D. BRIGGS

Invertebrate Pathology Laboratory, Department of Entomology,
The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Pioneering and advanced phases of commercial use of
Bacillus thuringiensis in North America

Frühphase und Fortschritte in der kommerziellen Nutzung von
Bacillus thuringiensis in Nordamerika

Zusammenfassung

Bacillus thuringiensis hat als mikrobielles Agens zur Bekämpfung von Insekten nahezu 30 Jahre als Modell gedient. Entsprechende Arbeiten stimulierten in Nordamerika industrielle Investitionen zur Produktion ausreichender Mengen von Präparaten gleichbleibender Qualität als Voraussetzung für eine amtliche Zulassung. Die erfolgreiche Anwendung von B. thuringiensis in der Land- und Forstwirtschaft, im Gesundheitsbereich sowie in kommunalen Habitaten einerseits und die Entdeckung von Subspecies mit anderen insektiziden Eigenschaften sowie die Fortschritte auf biochemischem und genetischem Gebiet andererseits haben inzwischen in den USA zu entsprechend revidierten Zulassungsbestimmungen geführt. Bisher ist die genetische Bedeutung von B. thuringiensis als Modellsystem für eine Zusammenarbeit zwischen Mikrobiologen, Phytomedizinern und Entomologen noch nicht hinreichend erkannt. Trotzdem ist aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse und laufenden Fortschritte zu erwarten, daß B. thuringiensis im Laufe des nächsten Jahrzehnts den ihm gebührenden Platz zwischen genetisch so gut untersuchten Systemen wie Escherichia coli und Zea mays einnehmen wird.

An analogy with aeronautical and space events is appropriate for the development of Bacillus thuringiensis in North America. We are familiar with the sight through the news media of the launch of space vehicles. Acceleration of velocity can occur initially and in flight, and events, particularly application of force, can change the direction and the orbit of the vehicle, and assure continued travel away from the launch site. With our imaginations we can appreciate the contributions of persons and events as the forces which provide thrusts to B. thuringiensis development. We shall not overlook the German origins of elements in the analogy.

Before the mid point of the 20th century a productive and sophisticated chemical industry in North America was developing and producing an extensive array of useful and apparently beneficial synthetic organic chemical insecticides. Benefits were celebrated for public health, the housewife, the urban gardener, and agriculture. Biological control was generally alien to the beneficiaries of the chemical gifts. Biological control activities, had with rare exceptions, engaged predacious and parasitic organisms principally in subtropical habits and under the guidance of public servants. An exception was the limited production of Bacillus popillae in a family owned industry in New York State.

Two decades earlier investigators meeting in Chicago, Illinois, suggested employing Bacillus thuringiensis for control of the European cornborer (Pyrausta nubilalis) (see HUSZ, CHORINE, and METALNIKOFF in ELLINGER, 1928, 1929, 1930). Later, Dr. EDWARD A. STEINHAUS in 1949-50 suggested B. thuringiensis for control of the alfalfa caterpillar (Colias eurytheme) (STEINHAUS, 1951). The recommendations were based on research which attempted to capitalize on the vigorous saprophytic growth and development of B. thuringiensis, first on solid media, and subsequently in liquid media.

Drs. E.A. STEINHAUS and C.G. THOMPSON in 1949-50 in the University of California, Berkeley, California, provided the spark to ignite an entomological revolution in North America. An historic event was the proof of the usefulness of the insecticidal activity of B. thuringiensis produced by fermentation in agitated and aerated liquid media in volumes which exceeded 250 ml. STEINHAUS took an initial step in cooperation with an acquaintance who was a scientist

in Cutter Laboratories in Berkeley, California. Cutter Laboratories, among members of the pharmaceutical industry operated relatively large fermentors in pilot plants and for production facilities, ranging in volumes from 10 to 50,000 liters. The producers of antibiotics and vitamins in aerated and agitated liquid medium, and with recovery systems, had the knowledge and experience to produce a saprophytic insecticidal microorganism. STEINHAUS recognized these facts. A candidate inoculum was needed, and Bacillus thuringiensis was it.

Cutter Laboratories provided STEINHAUS with small amounts of production samples of final whole cultures (FWC) of B. thuringiensis for his alfalfa caterpillar investigations. The samples were insecticidal. The opportunity was at hand to carry the work of Dr. E. BERLINER (1911) into entomological history in North America. The principal initiative for product development, formulated as liquid concentrates, dusts, and wettable powders, was provided in 1956-61 by Bioferm Corporation, a yeast and vitamin B₁₂ producer in Wasco, California. The company acted immediately to petition for registration of formulations of B. thuringiensis for use on agricultural crops. With support of the presumption of the safety of B. thuringiensis for beneficial insects, plants, humans and animals based on historical evidence, Bioferm petitioned the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for an exemption from a residue tolerance of the B. thuringiensis products on agricultural commodities. The company was successful with the petitions, and eventually a profit was made with "Thuricide". The registration exemptions were for B. thuringiensis.

The exemption permitted additional producers to similarly benefit without cost to them for the petitions. It was presumed by industry and government that the insecticidal value was centered in the spores. At mid century the U.S. Department of Agriculture (USDA) was required to certify that an insecticidal agent was useful. The two agency registration and labeling system, and the existing criteria for registration were designed for chemical insecticides, and the chemical companies were working well with the system.

Completed in 1968, the Mrak Report was the result of an investigation of the impact of pesticides, particularly DDT, on the environment, (Department of Health, Education and Welfare, 1969). It anticipated the 1970 reorganization in the Executive Branch of the United States government and the emergence of

the U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Subsequently, revision of Federal laws occurred which provide for the recognition of microbial insecticides and other "biorational agents", in addition to chemical agents. One of the 14 recommendations of the Mrak report to the public, politicians, and the bureaucracy is: "Provide incentives to industry to encourage the development of more specific pest control chemicals". Patent law and financial incentives were suggested.

The Mrak Report was significant in accelerating the development of B. thuringiensis, and the report was significant politically by the duration of the investigations leading to the report. The public hearings extended over three different federal administrations (KENNEDY, JOHNSON, and NIXON). Further the public stimulation for politicians to bring forth the report was assisted by the publication in 1960 of *Silent Spring* by Racheal CARSON. I believe Dr. BERLINER would have appreciated the efforts of Racheal CARSON.

Pertinent to the registration and sale of a product, how was the insecticidal action of the formulated B. thuringiensis to be expressed? Before the international inter-industry initiative in 1966 in the Wageningen Insect Pathology Colloquium and subsequent agreement on the designation of International Units of activity per gram of formulation to express toxicity for larval Lepidoptera, the products were labeled only as containing a number of viable spores per gram. In addition to industry having the knowledge and skill for production of B. thuringiensis, they had the discipline for quantifying production yields and formulated products. The methods were applicable to B. thuringiensis and provided a permanent solution to the lack of precision in the sales of spores per gram.

It is one thing to stimulate initial interest of industry in a product, it is another matter to sustain that interest. The nature of the insecticidal activity and potential market for products capitalizing on the unique characteristics of B. thuringiensis were not sufficient to keep most of the interested industries in a competitive position. By 1962 approximately 10 profit making organizations advanced to the point of producing FWC concentrates, creating product names, and hiring technical persons for product development. Two or three organizations exist today, 25 years later, which have a sustained history in microbial control. The organizations which have maintained an

interest have extended the microbial control "product line" or have a research investment for that purpose. The groups who discontinued activities did so for an important economic reason: profits were anticipated to be below an acceptable return on investment.

B. thuringiensis brought industrial activities into biological control in new ways that continue today to be mutually beneficial. The organism is useful when subject to industrial procedures and discipline, and in certain circumstances it returns a profit. Further, B. thuringiensis appeared initially to be a conspicuous realistic alternative to certain chemical insecticides which have received increasing social and political attention from 1960 to the present. By 1964 certain corporations had expanded their product lines to include a Heliothis Baculovirus. Today in North America Abbott Laboratories and Reuter Laboratories are two B. thuringiensis producers with expanding product lines to include additional groups of insect pathogenic microorganisms.

With respect to the selection of resistance in populations of insects to B. thuringiensis, published reports are rarely in evidence. A review of the "biochemical aspects of insect immunology" (DUNN, 1986) cites a single reference. An important contribution to the evidence concerning the selection for resistance is the stored products Lepidoptera investigations by McGAUGHEY (1985) in the U.S. Grain Marketing Research Laboratory in Kansas. This is one more isolated contribution to a research area in which evidence is overwhelming that the probability is low that selection will occur in the use of B. thuringiensis products. The conditions for the McGAUGHEY investigation are realistic for intensive selective pressure. North American entomologists continue to be sensitive to the genetic bases for selection in host insects and to Bacillus spp. as the result of the many investigations by Dr. Walter ROTHENBUHLER and colleagues in Iowa and Ohio using the honey bee (Apis mellifera) and the causative agent of American foulbrood B. larvae.

The agricultural and forest use in North America of B. thuringiensis subspecies kurstaki (H-serotype 3a3b) will increase with government respect in all nations for integrated pest management (IPM) on large areas and in regions. The consumer with many different insect problems on small areas e.g. the home gardener has frequently expressed disappointment in the narrow

spectrum of activity in B. thuringiensis. The difficulty can be minimized when B. thuringiensis is an element in a program, which, for example, can demonstrate the benefits of the conservation of natural enemies. This is the case in North America where the labor intensive "scouting" in IPM and use of narrow spectrum agents is demonstrated to be cost effective. With continued evidence provided to the public, administrators, and most importantly to the agriculturist who is faced with increasing costs of agricultural practices the long term economy of IPM will continue to accelerate B. thuringiensis volume usage (Table 1).

| Year | 1979 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 |
|------|------|------|------|------|------|
| % | 1 | 3 | 22 | 52 | 71 |

Table 1: The percent of hectares of eastern Canadian forests on which Bacillus thuringiensis is used for control of damage by the spruce budworm (Choristoneura fumiferana) (BURGES and DAOUST, 1986)

World sales of B. thuringiensis are approximately US 40 million Dollars of which 60% are for control of damage by the spruce budworm (Choristoneura fumiferana) and the gypsy moth (Lymantria dispar).

In 1960 Drs. T.A. ANGUS and A.M. HEIMPEL were cooperating with Bioferm Corporation on the utility of B. thuringiensis for application in Canadian forests for reduction of spruce budworm damage. The enormous scale of the potential use of B. thuringiensis and responsibility to supply quantities has brought new profits to North American industry.

The Canadian contributions to the forces which have shaped the development of B. thuringiensis are legendary. In addition to Drs. ANGUS and HEIMPEL, Drs. O.N. MORRIS and V. SMIRNOFF have been conspicuous in forest research. Drs. P. FAST and T. KRYWIENCZYK have provided leadership expanding our understanding of the biochemical genetics of B. thuringiensis and the immunological signifi-

cance of toxic crystal proteins, respectively. Developments for successful spruce budworm damage control have not been without criticism. S.W. FORSBERG, a microbiologist at the University of Guelph, published a large report in 1977 on the dangers of the use of B. thuringiensis, conclusions which are now shown to be without foundation.

In addition to field use of B. thuringiensis on cotton in Mexico, construction of a production facility has been completed which will facilitate the implementation of continued field investigations of all subspecies (or varieties) of B. thuringiensis. An additional consideration for national production is of importance to Mexico, which among other nations can have limited foreign exchange to invest in pesticides produced elsewhere. Further large area use, similar to those described by Dr. N. BECKER in this Symposium, will be important to the continued useful development of B. thuringiensis in North America.

The isolation by Drs. L.J. GOLDBERG and J. MARGALIT (1977) of a B.t. subspecies israelensis (H-serotype 14) active against mosquito larvae and the detection and isolation by Drs. A.M. HUGER and A. KRIEG, respectively, of subspecies tenebrionis (H-serotype 8a8b) effective against Coleoptera (KRIEG et al., 1983), provide acceleration for use of expanded volume of production of B. thuringiensis. In North America the vision of broadened spectrum of activity has stimulated research and development within and outside of industry. B. thuringiensis subspec. israelensis serotype H-14 has been considered in safety reviews for regulatory purposes to be a B. thuringiensis and not a new organism. It is produced in the United States where it is registered and used, as it is in many nations, for larval control of mosquitoes and black flies. The discovery by HUGER and KRIEG of B.t. subspecies tenebrionis has resulted in vigorous industrial activity to obtain the isolate, or a similar one, for development of a B. thuringiensis active for phytophagous Coleoptera, e.g. the corn rootworms (Diabrotica spp., Chrysomelidae).

In 1986, the United States Environmental Protection Agency confirmed that there were 14 microbial pesticides used in several hundred separate products which are currently registered in the U.S. for use in agriculture, forestry, mosquito control, and homes. The pesticides were not specified, however, B. thuringiensis in many products with different names account for at least 10 of

the fourteen microbial pesticides. Among the 10 registered products only 4 formulate B. thuringiensis produced in North America, the remainder are produced largely by European companies for formulation in the United States.

Since 1980, B. thuringiensis has yielded another asset for the scientific community, for invertebrate pathology, and particularly for insect pathology. The many activities include the movement of the genes which are responsible for delta-endotoxin production from B. thuringiensis to other bacteria, both intra- and intergeneric transfers. The movement can be facilitated by human intervention, or the transfers can under certain conditions occur "naturally" by a conjugative mechanism. The phenomenon introduces the means to fulfill the promise of genetically engineered microbial insecticides.

With respect to recombinant nucleic acid investigations as a model, the entomological community is gaining experience with B. thuringiensis to delight the pathologists, toxicologists, comparative physiologists, and of course the microbial geneticists. With new opportunities have come additional responsibilities. The US EPA is receptive to the claims that the delta-endotoxin produced in Escherichia coli or Pseudomonas fluorescens is indistinguishable from the toxin produced in the donor bacilli. It is argued that B. thuringiensis has been used successfully and safely for 20 years. Therefore, the host microorganism and the included toxin can be subject to only those regulations which regulate the donor B. thuringiensis. This is an argument that is apparently now used successfully, provided that the new host bacterium is without toxic effects on non-target organisms.

Examples of questions posed by US EPA review panels include those concerning plasmids which successfully facilitate the transfer of genes out of and into a known bacterium or other known hosts, can the gene(s) move into additional unknown hosts and become extensively distributed in the habitat? Would the result be an ever increasing titre of toxin in enlarging portions of ecosystems? Can soil and leaf microbiota in plant habitats, and in cadavers of intoxicated target insects contribute to the rise in the titre of toxin in the environment to an undesirable and persistent level? Will selection for resistance follow? Would the incorporation of genes into plants contribute similarly? What would be the relative contributions of annual and perennial plants with respect to permanent toxin titres?

Further, questions asked by the US EPA, in response to requests to conduct small field tests of the genetically engineered host include: Does the regulatory agency have enough information on the engineered organism to make a risk assessment for its use in small field trials? For example, what is the risk resulting from the increase in amount of the delta-endotoxin as the results of possible production indefinitely in new hosts for genes? Is the safety of non-target organisms and endangered species threatened. Genetic engineering of B. thuringiensis has brought entomologists to a point in history where we must speak of risk assessment again as we did for chemical pesticides.

A risk can be viewed initially as comprised of 2 parts: (1) a negative event (the negativity), and (2) the chance of its occurrence (the realization). The negative event must be (a) characterized, (b) its severity and distribution anticipated together with (c) timing or imminence of the event. The subject of risk cannot be considered as an academic exercise only, or left to the behavioral psychologist. Our awareness is increased by the edited volume on engineered organisms in the environment (HALVORSON et al., 1985).

Appearance is imminent for genetically manipulated organisms incorporating the B. thuringiensis delta-endotoxin both inter- and intra-generic combinations, with and without the intervention of humans.

In anticipation of the development of genetically engineered B. thuringiensis agents, the US EPA has set forth a regulatory policy to improve on the interim policy of October 1984. The latter addressed the field testing of genetically engineered and non-indigenous microbial insecticidal agents.

The 1984 policy required applications for Experimental Use Permits (EUP) for any small scale field investigations using genetically manipulated organisms; and for field investigations with microorganisms not indigenous to the test habitat. Small-scale field studies are (a) terrestrial field studies of 10 acres or less; and (b) aquatic field studies involving one surface acre or less of water. To June 1986, the EPA received 5 notifications of intention for genetically engineered microbial pesticides and 2 notifications for non-indigenous microbial pesticide agents. Three applications for EUP have subsequently been received for genetically engineered microbial pesticides field testing. The policy is to be modified beginning in September 1986 (Office of Science and Technology, 1986). The modifications to this policy include the adoption by the EPA of a 2 level review system. The 2 levels of review can be summarised as follows:

Level II (most restrictive regulation):

Microbial pesticides formed by deliberately combining genetic material from organisms of different Genera, and genetically engineered, or non-indigenous microbial pesticides derived from pathogenic organisms.

Level I (least restrictive regulation):

Other genetically engineered microorganisms resulting from intra-generic transfer, and most non-indigenous microbial pesticide agents.

The use of B. thuringiensis has introduced new elements into the educational opportunities for graduate students and particularly the current generation of entomologists who may find themselves illiterate in invertebrate pathology. Toxicologists are discussing the endo- and exotoxins of B. thuringiensis in courses of study, their structure, activity, and mode of action. The entomologists must take care that they do not find themselves outside of the arena of action. Drs. BERLINER, GOLDBERG and MARGALIT, and also HUGER and KRIEG have provided the entomological community in North America, and elsewhere, with the opportunity to close the 20th century with a command of pathobiology of insects from the molecular level to the ecosystem. Currently microbial geneticists outnumber entomologists manyfold in the research and discussion of the B. thuringiensis issues. At the minimum, entomologists will need to continue when the microbiologists lose interest. This will not be satisfying or productive.

Virtually ignored for the 30 year period (1928-1958) Bacillus thuringiensis has emerged as the precedent setting microorganism in biological control of insects in the 20th Century. The influence of the B. thuringiensis has exceeded the boundaries of microbiological practices, extending the useful activity and unique properties to the domains of protein chemistry, molecular genetics, industrial microbiology, to the bureaucratic structures of the Executive Branch of the United States government, and particularly to entomology. The species Bacillus thuringiensis can be a genetic tool of universal value similar in stature to Escherichia coli and Zea mays within this decade. It is serving now as a vehicle for a revolution in basic and applied science. In North America we are indebted to Dr. Ernst BERLINER.

Literature:

BERLINER, E., 1911. Zschr. ges. Getreidewesen (Berlin), 3, 63-70.

BURGES, H.D., DOUST, R.A., 1986. In: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (SAMPSON, R.A., VLAK, J.M., PETERS, D., edits.) Foundation of the fourth international colloquium of invertebrate pathology, Wageningen, The Netherlands, 1986, p. 514-517.

Department of Health Education and Welfare, 1969. Parts I, II. U.S. Government Printing Office. Washington D.C., 677 pp.

DUNN, P.E., 1986. Ann. Rev. Entomol. 31, 321-339.

ELLINGER, T. (edit.) 1928. In: Scientific Reports 1927-1928. Vol. I. International Livestock Exposition, Union Stockyards, Chicago.

ELLINGER, T. (edit.) 1929. In: Scientific Reports, Vol. II, International Livestock Exposition, Union Stockyards, Chicago.

ELLINGER, T. (edit.) 1930. In: Scientific Reports Vol. III. International Livestock Exposition, Union Stockyards, Chicago.

GOLDBERG, L.J., MARGALIT, J., 1977. Mosquito News, 37, 355-358.

HALVORSON, H.O., PRAMER, D., ROGUL, M. (edits.) 1985. Engineered Organisms in the Environment: Scientific issues. American Society for Microbiology, Washington D.C., 239 pp.

KRIEG, A., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., SCHNETTER, W., 1983. Zschr. angew. Entom., 96, 500-508.

Mc GAUGHY, W.H., 1985. Science 299, 193-195.

Office of Science and Technology Policy, Proposal for a coordinated framework for regulation of biotechnology. Federal Register, 51 (123), 23302-23393, 1986.

STEINHAUS, E.A., 1951. Hilgardia 20, 359-381.

J. WEISER

Laboratory of Insect Pathology, Institute of Entomology,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia

Impact of *Bacillus thuringiensis* on Applied Entomology
in Eastern Europe and in the Soviet Union

Bedeutung des *Bacillus thuringiensis* für die angewandte Entomologie
in Osteuropa und in der Sowjetunion.

Zusammenfassung

Die ersten Kontakte mit dem von BERLINER entdeckten *Bacillus thuringiensis* entwickelten sich in den dreißiger Jahren im Zuge eines Internationalen Maiszünsler-Programms, das insbesondere in Ungarn und Jugoslawien auch *B. thuringiensis* in die Bekämpfungsexperimente einbezog. Von hier aus gelangte damals ein Stamm auch nach Leningrad, wo er bei Versuchen zur Reduktion von Schadinsekten in Labor und Freiland benutzt wurde. Zu einer technischen Produktion von *B. thuringiensis*-Präparaten für Anwendungszwecke kam es dagegen erst 1958 in der Tschechoslowakei (Bathurin) und 1959 in der UdSSR (Entobakterin). Im Laufe der Zeit erhöhte sich die Anzahl der in der UdSSR produzierten Präparate auf fünf. Drei weitere Präparate wurden in der Tschechoslowakei und in Bulgarien hergestellt. Die zur Zeit jährlich behandelte Fläche in den sozialistischen Ländern Europas wird auf einige 100 000 ha geschätzt. Bekämpft werden vor allem Forstschädlinge, aber auch Schadinsekten in Obstanlagen, im Gemüsebau sowie in der Baumwolle.

Auf dem Gebiet der Grundlagenforschung konnte sich ein Forschungs-Team in der Tschechoslowakei die Priorität bei der Aufklärung der chemischen Struktur des β -Exotoxins und seiner Wirkungsweise sichern. Dieses thermostabile Exotoxin ist in den Präparaten Turingin und Bitoxibacillin (aus der UdSSR) enthalten, welche weniger selektiv wirken als das ältere Entobakterin.

Zur Zeit laufen an verschiedenen *B. thuringiensis*-Stämmen molekularbiologische Untersuchungen über das Kristalltoxin, außerdem Experimente zur genetischen Manipulation ausgehend von der Entdeckung, daß in bestimmten Plasmiden lokalisierte Gene das Kristallprotein codieren.

The development of Bacillus thuringiensis production and application in the European socialist countries in the fifties cannot be discussed without mentioning earlier experiences obtained in Yugoslavia and Hungary between 1928 and 1930. At that time a research program for natural antagonists of the European corn borer (Pyrausta = Ostrinia nubilalis) was organized by an International Group for Corn Borer Investigation. Many laboratories for plant protection in Europe participated in this program. Among the isolates used in field experiments in Yugoslavia and Hungary were B. thuringiensis, B. ephestiae, B. gelechiae and B. cazoubon, all crystalliferous strains of the B. thuringiensis group. Tests in field plots were performed in Zagreb (Kroatia) by VOUK and METALNIKOV and in Kesthely (Hungary) by HUSZ. In the volumes of scientific reports of the working group (HUSZ, 1928, 1929, 1930) there are no details on mass production of these bacteria. Probably they were manufactured by the Laboratoire Libec which produced later a preparation of B. thuringiensis, named Sporein. At that time one of the strains isolated by METALNIKOV & CHORINE (1928) and named B. galleriae was sent to POSPELOV in Leningrad, who used it for experiments to control caterpillars in the laboratory and in the field. Although not published, B. thuringiensis was also produced and tested in the laboratory of HUSZ at the Institute of Agricultural Research in Budapest. From this supply KLEMENT (1951, 1953) used B. thuringiensis for control of larvae of the fall webworm (Hyphantria cunea) in Hungary. In 1954 also our laboratory in Prague has got a vial of spore powder of HUSZ's B. thuringiensis-preparation.

In 1954 our Laboratory of Insect Pathology of Czechoslovak Academy of Sciences started the work with B. thuringiensis. In connection with this program VAŇKOVÁ used for her studies a new strain isolated from a mass outbreak of the Indian meal moth (Plodia interpunctella) on imported peanuts. This strain 058 (later identified as subspec. thuringiensis, but lacking production of β -exotoxin) was used 1958 as basic material for the technical production of Bathurin in Czechoslovakia. Based on laboratory experiences of VAŇKOVÁ the production was established in 10 000 l fermenters in the Research Institute of Antibiotics in Rožtoky. The fermentation process was running for about 72 hours and the resulting biomass was concentrated by centrifugation and finally by spray-drying. By this procedure a dry pure spore preparation with minimal loss of crystals was obtained without any inert substances which then were an

essential part of other preparations of B. thuringiensis elsewhere. The product was tested and used for control of insect pests in forests and orchards as well as in ornamentals and vegetable plantations. The price at that time was fixed at 40 Kčs per 1 kg. The product was relatively cheap but it realized no competition for DDT or BHC at that time when problems with resistance and environment pollution were not yet overt. In addition, the remains of the sporeformer in the fermentation unit represented a handicap for other fermentations in that factory. Therefore, further series of fermentation of B. thuringiensis were postponed and later suspended entirely. Nevertheless, Baturin was used for several years and remainders of the production are still active after 30 years and may compete favorably with new products of the same concentration of spores and crystals.

In the Soviet Union the Allunion Institut of Plant Protection organized the production of a B. thuringiensis preparation in a biotechnical unit which was later integrated in the Allunion Institut for Microbial Products for Plant Protection. The product was based on a strain of B. thuringiensis subspec. galleriae that had been isolated by ISAKOVA (1958) from dead caterpillars of the greater wax moth (Galleria mellonella). Difficulties arose from the lyso-genic status of that strain because phages hampered often its fermentation. Basic research concerning bacteriophages was undertaken very early by several investigators in the USSR (AFRIKIAN, 1960; KHACHATRYAN & RAUTENSHTEJN, 1963; SHVETSOVA, 1963). In spite of problems with phages the production was growing up to some 300 tons of dried biomass per year. After 1960 additional preparations of B. thuringiensis were produced in the Soviet Union (see Table 1), most of them based on local isolations.

In this connection it should be mentioned that in the Siberian taiga the Siberian silkworm (Dendrolimus sibiricus) is the most serious pest that had already destroyed many millions of ha of conifers in this century. Therefore, intensive research was done to develop effective control methods. Finally in 1954 TALALAEV from the Irkutsk State University isolated from dead larvae of D. sibiricus a crystalliferous pathogen which he named Bacillus dendrolimus (now recognized as B. thuringiensis subspec. dendrolimus). Later on GUKASYAN (1970) described two other crystalliferous bacilli, which he named Bacillus insectus (now identified as B. thuringiensis subspec. thuringiensis) and Bacillus tuviensis (meanwhile identified as B. thuringiensis subspec. dendro-

limus), which were also pathogenic for the Siberian silkworm. In the following years the Direction of Microbiological Industry in Moscow produced bio-preparations based on B. thuringiensis subspec. dendrolimus (Dendrobacillin) or the insectus-strain of B. thuringiensis subspec. thuringiensis (Insektin). Both preparations were used mainly in forest protection.

The First International Conference of Insect Pathology and Biological Control in Prague 1958 brought together most leading workers in these fields and many ideas were discussed about the use of B. thuringiensis for plant protection in agriculture and forestry. At that time one source of strains for studies in our laboratory in Prague was the collection of TOUMANOFF at the Institute Pasteur (Paris) and a culture collection of entomogenous bacteria founded by LYSENKO in 1958 with the main task to store such strains for exchange with other laboratories.

In the following years several experimental preparations of Bacillus thuringiensis were also produced in Yugoslavia, Poland, Romania, and Bulgaria. But only in Bulgaria this approach was continued and a local production of Dipel based on the American HD-1 strain of B. thuringiensis subspec. kurstaki (isolated by DULMAGE in 1970) was organized. The process of production was transferred from the Abbott Laboratories (USA). The Bulgarian Dipel is used mainly in programmes for control of lepidopterous pests in deciduous forests, especially against Lymantria dispar, Thaumetopoea pityocampa and several Tortricids. In Czechoslovakia the production of B. thuringiensis was started again in 1984 in a cooperative farm in Slušovice near Gottwaldov, which represents a specific form of "cottage industry". This producer was not connected with sophisticated systems of biotechnology and the cooperative had to organize all steps of production and maintaining of the material etc.. The new Bathurin 82 produced there is based on a strain of B. thuringiensis subspec. kurstaki. It was selected at the Laboratory of Insect Pathology in Prague from entomogenous material from the Balkans. A strain of this variety was chosen because all data on safety and use are referring to the subspec. kurstaki used for production in the USA and Western Europe.

In Table 1 a survey is given about B. thuringiensis production in the socialist countries. In all these countries preparations containing B. thuringiensis are registered among permitted insecticides.

Table 1: Some microbial insecticides based on Bacillus thuringiensis produced in European socialist countries

| Product | Variety | H-serotype | β -exotoxin | Country, producer |
|----------------|---------------|------------|-------------------|---------------------------|
| Entobakterin* | galleriae | 5a5b | - | USSR, Dir. microbiol. |
| Dendrobacillin | dendrolimus | 4a4b | - | industry, VPO Biopre- |
| Gomelin | dendrolimus | 4a4b | - | parat, Moscow |
| BIP | alesti | 3a | - | |
| Insektin*,** | thuringiensis | 1 | - | |
| Exotoxin*,** | thuringiensis | 1 | ++ | |
| Turingin | thuringiensis | 1 | ++ | |
| Bitoxibacillin | thuringiensis | 1 | + | |
| Baktokulicid | israelensis | 14 | - | |
| Thuringin** | thuringiensis | 1 | | Romania, Inst. Plant |
| | | | | Protection, Bucharest |
| Baktukal* | thuringiensis | 1 | | Yougoslavia, Serum-zavod, |
| | | | | Kalinovica, |
| Bathurin* | thuringiensis | 1 | - | ČSSR, Spolana, |
| | | | | Neratovice |
| Bathurin 82 | kurstaki | 3a3b | - | ČSSR, JZD Slušovice |
| Moskitur | israelensis | 14 | - | ČSSR, JZD Slušovice |
| Disparin*,** | thuringiensis | 1 | | Bulgaria |
| Dipel | kurstaki | 3a3b | - | Bulgaria, Zavod mikro- |
| | | | | biol. prom., Pescera |

* = not on sale now

** = experimental samples

Several B. thuringiensis products of the USSR, such as Entobakterin, Dendrobacillin or Gomelin, were used not only within the own territory but also in Bulgaria, Romania, Poland as well as in regions of South East Asia. Therefore, many isolates made later in these countries may be derived in part from microbial materials applied there before.

The target insects in Eastern Europe are often identical with pest insects elsewhere. Beside Thaumetopoea pityocampa in Yugoslavia and Bulgaria, Lymantria dispar is a very serious pest in the whole area of its appearance. Table 2 shows data from forests in Bulgaria treated with B. thuringiensis during the last years against both pest insects. In Bulgaria the method of application of B. thuringiensis on first instar larvae of L. dispar provides standard control of outbreaks (CANKOV & MIRCEV, 1985). - The largest areas treated with B. thuringiensis, mostly with Dendrobacillin or Insektin, are located in the Siberian taiga. For control of Dendrolimus sibiricus TALALAEV (1961) used several methods of applications techniques to distribute bacterial preparations in the dense forests including B. thuringiensis-laden signal rockets as carriers. Dusting in stripes was not very successful, because Bacillus thuringiensis was unable to induce an artificial epizootic and to contaminate the area between the treated stripes as KOMJAGIN et al. (1965) could demonstrate.

Dosages used in field application differ (a) with respect to the sensitivity of the population of the target insect and (b) with the quality (virulence) of the B. thuringiensis preparation. The most recent formulations are used in the established range of 0.5 to 1.5 kg/ha. It was shown that the effect of Bacillus thuringiensis is influenced by temperature. Therefore, a difference between the efficiency of microbial preparations in southern parts of a large territory and its northern belt is often striking. According to FEDORINCHIK (1963), temperatures below 15°C are inadequate for control of insect pests by B. thuringiensis. The main trouble with microbial control in Central Europe is the onset of spring rains in the middle of May which may spill down the bacteria from the treated trees and decrease the temperature and feeding requirement of insects. Nevertheless, treatments of orchards for control of Hyponomeuta spp., Aporia crataegi, Hyphantria cunea, Euproctis chrysorrhoea, Malacosoma neustria, or Operophtera brumata are without problems. The same is

Table 2: Biological control of Lymantria dispar and Thaumetopoea pityocampa by treatment with B. thuringiensis (Dipel) in forests of Bulgaria (after CANKOV and MIRČEV, 1985)

| Year | Infested areas of deciduous forest conifers | | | | | Microbial control | |
|------|---|----------------------------|----|--------------------------------|----|-------------------|----|
| | Total area (ha) | <u>L. dispar</u> area (ha) | % | <u>T. pityocampa</u> area (ha) | % | area (ha) | % |
| 1974 | 240 209 | 218 025 | 68 | 22 184 | 31 | 26 200 | 11 |
| 1975 | 205 119 | 183 276 | 71 | 21 843 | 39 | 3 413 | 2 |
| 1976 | 86 601 | 64 568 | 56 | 22 033 | 43 | 3 005 | 3 |
| 1977 | 66 096 | 44 023 | 53 | 22 073 | 53 | 1 305 | 2 |
| 1978 | 45 605 | 19 094 | 34 | 26 511 | 57 | 7 200 | 16 |
| 1979 | 48 808 | 18 519 | 5 | 30 289 | 62 | 8 526 | 17 |
| 1980 | 47 958 | 15 093 | 56 | 32 865 | 55 | 3 929 | 8 |
| 1981 | 58 014 | 24 118 | 46 | 33 896 | 56 | 11 057 | 19 |
| 1982 | 88 690 | 41 923 | 48 | 46 767 | 63 | 22 441 | 25 |
| 1983 | 229 592 | 175 377 | 47 | 54 215 | 65 | 59 345 | 26 |
| 1984 | 152 468 | 100 573 | 72 | 51 895 | 70 | 80 950 | 53 |

true with Pieris brassicae, Pieris rapae, and Plutella maculipennis in agriculture. In Table 3 examples are given for published successful control of insects pests in plant protection by use of B. thuringiensis.

Treatments with B. thuringiensis are usually efficient in controlling defoliation by drastic reduction of the population density of target insects, but they do not destroy insect populations totally. This mode of action is often desirable, because remaining target insects are necessary as hosts for specific antagonists like entomophages. In some cases, however, combinations of Bacillus thuringiensis and of chemical insecticides proved to effect higher mortalities. In this connection it is referred to early studies of several investigators in the USSR in the past and to recent tests by ŠVESTKA & VAŇKOVÁ (1978) who tested such combinations on Operophtera brumata, Orgyia antiqua and Zeiraphera diniana in areas of their outbreaks. But synergism of combinations of B. thuringiensis with chemical insecticides as demonstrated by FEDORINCHIK (1963) and by KUDLER & LYSENKO (1958) was not evident in every case.

With respect to possible risks for health no trouble was recorded with any preparation of B. thuringiensis in the socialist countries. For registration results of safety tests are necessary for each formulation. A review article concerning this subject will be published in the Bulletin of the IOBC-EPS by GULIJ et al. (1986).

During the early period of investigations studies were performed at the Department of Insect Pathology in Prague concerning the mode of insecticidal action of Bacillus thuringiensis and the participation of the crystal toxin in this process. VAŇKOVÁ (1962) evaluated in bioassays the sensitivity of some lepidopterous species against different strains of the bacillus and found - in accordance with other investigators - often a selective insecticidal spectrum of B.thuringiensis strains (Fig. 1). This fact enables us to use selective strains against given families of Lepidoptera such as Lymantriidae or Noctuidae.

Furthermore, basic research was concentrated on the chemical structure and the mode of action of the thermostable β -exotoxin (ŠEBESTA et al., 1969; FARKAŠ et al., 1969; comp. ŠEBESTA et al., 1981), which is produced mostly by strains of

Table 3: Examples of successful control of larvae of pest insects by use of Bacillus thuringiensis for plant protection in European socialist countries

| Target insect | Country |
|--|--|
| <i>Aporia crataegi</i> | Romania, USSR |
| <i>Archips crataegana</i> | ČSSR, USSR |
| <i>Archips rosana</i> | Poland, USSR |
| <i>Bupalus piniarius</i> | DDR |
| <i>Cacoecia</i> (= <i>Choristoneura</i>) <i>murinana</i> | ČSSR |
| <i>Dendrolimus sibiricus</i> | USSR |
| <i>Euproctis chrysorrhoea</i> | DDR, USSR |
| <i>Erranis aurantiaria</i> | Romania |
| <i>Hedya nubiferana</i> (= <i>Argyroploce variegana</i>) | USSR |
| <i>Hibernia</i> (= <i>Erannis</i>) <i>defoliaria</i> | ČSSR |
| <i>Hyphantria cunea</i> | Bulgaria, Hungaria, Yougoslavia, USSR |
| <i>Hyponomeuta</i> spp. | Bulgaria, DDR, Poland, USSR |
| <i>Itamne</i> (= <i>Thamnonoma</i>) <i>wauaria</i> | USSR |
| <i>Lymantria dispar</i> | Bulgaria, Yougoslavia, Romania, USSR |
| <i>Malacosoma neustria</i> | Romania, DDR, USSR |
| <i>Operophtera</i> (= <i>Cheimatobia</i>) <i>brumata</i> | ČSSR, Romania, USSR |
| <i>Orgyia antiqua</i> | ČSSR, Poland |
| <i>Panolis flammea</i> | Poland |
| <i>Pieris</i> spp. | ČSSR, Poland, USSR |
| <i>Plutella xylostella</i> (= <i>maculipennis</i>) | USSR |
| <i>Pyrausta</i> (= <i>Ostrinia</i>) <i>nubilalis</i> | Yougoslavia, USSR |
| <i>Spilopota ocellana</i> | USSR |
| <i>Stilpnotia</i> (= <i>Leucoma</i>) <i>salicis</i> | ČSSR, Hungaria |
| <i>Thaumetopoea pityocampa</i> | Bulgaria, Yougoslavia |
| <i>Tortrix viridana</i> | ČSSR, DDR, USSR |
| <i>Zeiraphera diniana</i> (= <i>griseana</i>) | ČSSR |

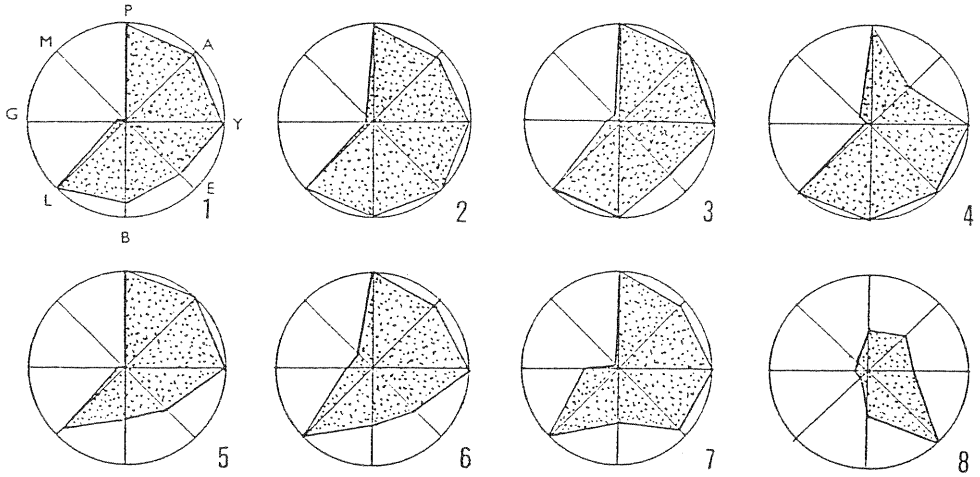


Fig.1: Host range of some field isolated strains (1...8) of *Bacillus thuringiensis* subspec. *kurstaki*. Circle limit = 100 % mortality with identical doses applied to larvae of *Pieris brassicae* (P), *Aporia crataegi* (A), *Yponomeuta malinellus* (Y), *Euproctis chrysorrhoea* (E), *Barathra* (= *Mamestra*) *brassicae* (B), *Lymantria dispar* (L), *Galleria mellonella* (G), *Musca domestica* (M)

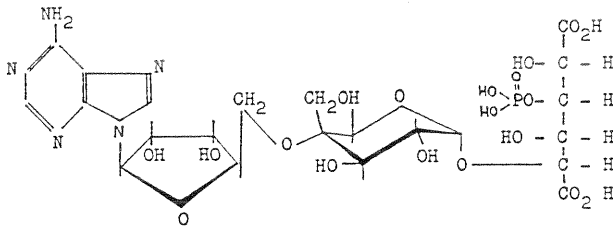


Fig. 2: Structure of Thuringiensin, the β -exotoxin of *B. thuringiensis*

B. thuringiensis subsp. thuringiensis. The β -exotoxin of the cazaubon-strain of this variety was analysed and shown to be a nucleotid called Thuringiensin. The identity of the established structure with the natural β -exotoxin was confirmed by synthesis (KALVODA et al., 1976, PRYSTAŠ et al., 1975, cited in: ŠEBESTA et al., 1981): Fig. 2. - The β -exotoxin is a specific inhibitor of DNA-dependent RNA-polymerase competing with ATP for the binding site of the enzyme. It preferably affects the nuclear polymerase which synthesizes ribosomal RNA. From this it is understandable that β -exotoxin has a very broad spectrum of activity.

Usually β -exotoxin is not present in such biopreparations of B. thuringiensis which are selectively effective against larvae of Lepidoptera (see Table 1). Only two products which are registered in the USSR contain β -exotoxin; they are named Turingin 1 and 2 (containing 2 and 10% β -exotoxin respectively) and Bitoxibacillin (with 0.6 to 0.8% β -exotoxin). These less selective preparations are now widely used in USSR instead of the older Entobakterin. The β -exotoxin containing products have a remarkable effect not only against several Noctuids in cotton but also against the Colorado beetle in potatoes and several species of red mites. In addition, β -exotoxin works also as a larvicide against flies as the housefly and blowflies. For a limited period of time also a preparation of exotoxin in freon was used as spray for control of warble flies and screw worms in wounds of animals. In spite of its good effect this preparation is no longer available.

A new area for vector control was started in 1977, when GOLDBERG & MARGALIT isolated in Israel the A 60 strain of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, which induced high mortality with mosquito larvae. The production of technical preparations in the USSR and ČSSR is based on a strain which was investigated in the Department of Insect Pathology in Prague. The product proposed by the Allunion Institut of Agricultural Microbiology in Leningrad is named Baktokulicid. A similar product, named Moskitur, is made in Czechoslovakia in the already mentioned Slušovice factory. Laboratory and field trials have confirmed the effectiveness of both preparations against mosquitoes and black flies.

Until 1977 the genetics of B. thuringiensis and its crystal toxin was not well

understood. Then studies in the USSR by GALUSHKA and AZIZBEKYAN (1977) and their collaborators suggested that plasmid DNA may be involved in the biosynthesis of the toxic protein responsible for the specific pathogenicity of crystalliferous strains. As from that time intensive genetic studies with the aim of genetic engineering have been started in East and West.

Thus products based on B. thuringiensis are now an integral part in control of noxious insects in plant protection as well as in public health.

Literatur:

AFRIKIAN, E.G., 1960. J. Insect. Path., 2, 299-304.

CANKOV, G., MIRČEV, P., 1985. In: Biologický a biotechnologický boj se škůdci lesa. Dům techniky ČSVTS, Č. Budějovice (edit.), Tábor 1985. p. 27-30.

FEDORINCHIK, N.S., 1963. (Microbial of orchard and vegetable pests). Microbiol. metod. borby s vred. nasekom. Kolos, Moskva 1963.

GALUSHKA, F.P., AZIZBEKYAN, R.R., 1977. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 236, 1233-1235.

GOLDBERG, L.J., MARGALIT, J., 1977. Mosquito news, 37, 355-358.

GUKASYAN, A.B. (Bacteriological Control Methods of the Sibirian Silkworm) Nauka, Moskva 1970. 128 pp.

HUSZ, B., 1928. Intern. Corn Borer Invest. Sci. Rep., 1, 191-193.

HUSZ, B., 1929. Intern. Corn Borer Invest. Sci. Rep., 2, 99-105.

HUSZ, B., 1930. Intern. Corn Borer Invest. Sci. Rep., 3, 91-93.

ISAKOVA, N.P., 1958. Dokl., Vses. Akad. Sci. selsk.-choz. Nauk Lenina, 3, 26-27.

KHACHATRYAN, L.S., RAUTENSHEJN, J.I., 1963. Mikrobiologiya, 32, 813-818.

KLEMENT, Z., 1951. M.G. Kisérl., Közp. Evkönyu (Budapest), 3, 118-127.

KLEMENT, Z., 1953. Ann. Inst. Plant Prot. Hung., 6, 177-182.

KOMJAGIN, A.J., POLTEV, V.J., LOBANOV, A.V., In: CHEREPANOV, A.J. (edit.): Issled., biol. metod. borby s vredit. selsk., lesn. choz. (Dokl. simp. 1964). Akad. Nauk SSSR Sibirsk Otd., Novosibirsk 1965 (2), 14-18.

KUDLER, J., LYSENKO, O., 1958. Transact. 1st Int. Conf. Insect Pathol., Praha 1958, 73-79.

METALNIKOV, S., CHORINE, V., (1929). Intern. Corn Borer Invest. Sci. Rep.,1, 41-69.

VANĀKOVÁ, J., 1962/64. Coll. Internat. Pathol. Insect. Paris 1962. Entomophaga Mém. hors. Série 2, 271-291 (1964).

ŠEBESTA, K., FARKAŠ, J., HORSKA, K., VANĀKOVÁ, J., 1981. In: H.D. BURGESS (edit.) Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, London p. 249-281.

SHVETZOVA, O.I., 1963. (Bacteriophages of entomopathogenic sporeformers). Microbiol. metod. borby s. vred. nasekom. Kolos, Moskva 1963.

ŠVESTKA, M., VANĀKOVÁ, J., 1978. Anz. Schädlingkunde.,51, 5-9.

TALALAEV, E.V., 1954. Dokl., Vses. Akad. Sci. selsk.-choz. Nauk Lenina, Leningrad 1954, p. 70.

TALALAEV, E.V., 1961. Zashch. Rast. (Moskva), 6, 20-22.

G.A. LANGENBRUCH

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

Verfahren zur praktischen Anwendung von
Bacillus thuringiensis im Pflanzenschutz

Methods of practical application of
Bacillus thuringiensis in plant protection.

Summary

Plant protection which is harmless to the environment needs selective control methods. For this purpose, B. thuringiensis-preparations free of exotoxins are a useful tool. Such products are available in many countries of Western Europe. For example, in the Federal Republic of Germany 4 preparations of B. thuringiensis are registered (Thuricide HP, Neudorffs Raupenspritzmittel, Dipel and Cohrs Raupenvernichter Dipel) and, therefore, can be used against more than 20 lepidopteran pests. Although these target-insects are controlled every year on an area of more than 100,000 ha, the use of B. thuringiensis is rather low. For example, in 1984 a total amount of only 1,150 kg was applied, especially on trees in communities, in home gardens and vineyards. In horticulture, agriculture and forestry only about 100 kg were used. The reasons for the limited importance of B. thuringiensis in Germany even after 20 years of commercialization are: (1) Occasionally lower or delayed effect, (2) sometimes need of special experiences, (3) competition with other control methods including biological ones (e.g. the use of Trichogramma), (4) prohibition for use in water catchment areas and (5) especially the higher price of B. thuringiensis-preparations compared to synthetic insecticides. - First of all, the

ecological and toxicological advantages of B. thuringiensis are not yet duely appreciated. According to its remarkable selectivity honey bees and other pollinators as well as entomophages are by no means endangered. Of course, B. thuringiensis preparations are safe for farmers and consumers. - Concerning the application and efficacy of B. thuringiensis, the peroral mode of action and, in particular, its limitation by low temperatures has to be considered. With respect to this and to the specific biology of the pest insect, attention is drawn to examples and trials disclosing ways to enhance the efficacy of such preparations, thus lowering their costs. Special or cheaper application techniques may favour this development. - In the future, new strains with increased virulence or even new pathotypes may enlarge the prospects for field use. Furthermore, improved fermentation and formulation techniques may favour the development of cheaper products. With respect to increasing environmental problems, more attention should be paid to the use of these selective bio-insecticides.

Ernst BERLINER berichtete 1911 über den Erreger der Schlaffsucht, den er Bacillus thuringiensis nannte. In den seither vergangenen 75 Jahren und besonders in der letzten Zeit sind viele hundert verschiedene Stämme dieses Krankheitserregers isoliert worden, die vor allem auf Grund serologischer Eigenschaften in mehr als 25 Subspecies eingruppiert wurden.

Nach ihrem Wirkungsspektrum können B. thuringiensis-Stämme gegenwärtig in drei Pathotypen eingeteilt werden:

Pathotyp A (wirksam gegen Lepidopteren) mit den Subspecies thuringiensis, aizawai, dendrolimus, entomocidus, galleriae, kurstaki, sotto und vielen anderen;

Pathotyp B (wirksam gegen Dipteren, speziell Nematoceren) mit der Subspecies israelensis und anderen;

Pathotyp C (wirksam gegen Coleopteren, speziell Chrysomeliden) mit der Subspecies tenebrionis.

Mein Vortrag beschränkt sich im wesentlichen auf die Anwendung von Pathotyp A im Pflanzenschutz. Von den ihm zugehörigen Stämmen spielt gegenwärtig der HD-1-Stamm der Subspecies kurstaki die größte Rolle. Auf ihm basieren die derzeit wichtigsten kommerziellen Präparate. Doch sind auch Stämme anderer Subspecies in manchen Präparaten enthalten. Letztlich ist nicht die Subspecies, sondern der betreffende Stamm für die Wirksamkeit gegen Insekten entscheidend. Innerhalb einer Subspecies können neben Stämmen von hoher Effizienz auch solche von geringer Wirkung und sogar wirkungslose Isolate vorkommen.

Für die selektive Wirkung von B.thuringiensis auf Insekten ist der Sporen-Endotoxin-Komplex verantwortlich, der durch Reinigung der Biomasse sporulierter Kulturen erhalten wird. Exotoxin (genauer das β -Exotoxin) wird nur von bestimmten Stämmen gebildet und kommt nur in nicht genügend gereinigten Präparaten vor.

In vielen Ländern wird Wert auf exotoxinfreie B. thuringiensis-Präparate gelegt, da nur diese eine spezifische Wirkung gegenüber Lepidopteren aufweisen. Dagegen enthalten einige russische Präparate noch das breitwirksame β -Exotoxin ebenso wie das Muscabac aus Finnland, das dort gegen Fliegenmaden in Exkrementen eingesetzt wird. Bestimmte amerikanische Versuchsmuster, die ausschließlich auf β -Exotoxin basieren, werden gegenwärtig zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers erprobt. Das β -Exotoxin dieser Präparate wird von Stämmen der Subspecies thuringiensis produziert.

Exotoxinfreie B. thuringiensis-Präparate, die als aktive Bestandteile nur Sporen und Endotoxinkristalle enthalten, sind in der Anwendung gekennzeichnet durch folgende Charakteristika:

- 1) Selektive, gruppenspezifische Wirkung
- 2) Ausschließlich perorale Wirksamkeit
- 3) Langsamere und teilweise auch schwächere Wirkung als synthetische chemische Insektizide
- 4) Partielle Strahlen-Empfindlichkeit z.B. gegen UV
- 5) Begrenzte Lagerfähigkeit.

Hinzu kommen noch als Limitationen:

- 6) In der Bundesrepublik Deutschland hygienische Auflagen bedingt durch den Gehalt an lebenden Sporen, und
- 7) ein relativ hoher Preis.

Das sind die Ausgangsbedingungen für jeden praktischen Einsatz der verfügbaren B. thuringiensis-Präparate gegen Lepidopteren vor allem in der Bundesrepublik Deutschland.

1) Die selektive, gruppenspezifische Wirkung ist der entscheidende Vorteil der B. thuringiensis-Präparate. Moderner Pflanzenschutz sollte umweltfreundlicher Pflanzenschutz sein. Umweltfreundlicher Pflanzenschutz setzt spezifisch wirkende selektive Bekämpfungsverfahren voraus.

Damit ist es in der Insektenbekämpfung im allgemeinen noch schlecht bestellt. Zwar machen die Insektizide nur einen relativ geringen Anteil am Pflanzenschutz in Deutschland aus, doch können gerade diese Präparate unsere Fauna recht drastisch reduzieren.

Beispielhaft soll die Bienengefährlichkeit einen Hinweis auf die Breitwirksamkeit der Pflanzenschutzmittel geben: Von den rund 1400 geprüften Pflanzenbehandlungsmitteln, die auf Grund ihrer Einsatzbedingungen Bienen gefährden könnten, sind 22% Insektizide und Akarizide, 18% Fungizide und 55% Herbizide. Während von den Fungiziden und Herbiziden nur jeweils 3% als bienengefährlich eingestuft wurden, sind es bei den Insektiziden und Akariziden 65% aller geprüften Präparate. Im Hinblick auf einen umweltfreundlichen Pflanzenschutz sind also gerade bei den Insektiziden erhebliche Anstrengungen erforderlich.

Die in der Bundesrepublik Deutschland im Handel befindlichen B. thuringiensis-Präparate "Thuricide HP" und "Neudorffs Raupenspritzmittel" sowie "Dipel" und "Cohrs Raupenvernichter Dipel" (Zulassung nur im Forst) sind die selektivsten Insektizide neben einem Häutungshemmer und einer Pflanzenseife. Das beweisen u.a. die Untersuchungen der IOBC-Arbeitsgruppe zur Prüfung der Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Nutzarthropoden: Dipel war unschädlich für 7 von 8 geprüften Nützlingen, u.a. auch für die empfindlichen Trichogramma-Schlupfwespen. Lediglich bei Syrphiden war eine geringe Beeinträchtigung festzustellen (HASSAN, 1984), die aber noch näher untersucht werden sollte.

Hohe Spezifität bedeutet logischerweise auch, daß Wirbeltiere und Mensch nicht beeinträchtigt werden. So tragen die B. thuringiensis-Präparate kein Gefahren-

symbol und erfordern keine Wartezeit.

Ein in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenes, aber nicht vertriebenes Kombinationspräparat von B. thuringiensis und Pyrethrum wirkt dagegen nicht selektiv. Es soll hier nicht weiter berücksichtigt werden.

Nach unserer Einschätzung unterscheiden sich die vier genannten B. thuringiensis-Präparate Thuricide HP, Neudorffs Raupenspritzmittel, Dipel und Cohrs Raupenvernichter Dipel nicht wesentlich in Wirksamkeit und Spezifität, auch wenn in der Zulassung gewisse Besonderheiten ausgewiesen sind. Alle vier Produkte werden in den USA hergestellt und basieren auf dem HD-1-Stamm; sie enthalten 50 bzw. 25×10^9 Sporen und Toxinkristalle pro g.

Die mit der Zulassung ausgewiesenen bekämpfbaren Arten zeigen die Tabellen 1 und 2, wobei hinzuzufügen ist, daß die dort genannte Kohleule relativ unempfindlich ist. Die Aufwandmengen liegen zwischen 300 g/ha gegen Kohlweißlinge und 2 kg/ha gegen den Maiszünsler.

Als potentiell empfindlich gegenüber B. thuringiensis sind weit mehr schädliche Lepidopteren-Arten in Deutschland einzustufen. Bei einigen von ihnen wären aber zur praktischen Bekämpfung zu hohe Aufwandmengen erforderlich (Tab. 3). Andere spielen eine so untergeordnete Rolle, daß bisher keine gezielten Prüfungen durchgeführt wurden. Einige Arten sind auch keine Schädlinge aus dem Bereich des Pflanzenschutzes. Schließlich sind auch Vorratsschädlinge aufgeführt, auf die noch eingegangen wird. Hierzu vgl. Tab. 4. (s.a. KRIEG & LANGENBRUCH, 1981).

Insgesamt können die in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen B. thuringiensis-Präparate gegen etwa 25 Schadlepidopteren eingesetzt werden. Diese 25 Arten werden jährlich auf einer Fläche von weit über 100 000 ha bekämpft, allerdings nicht mit B. thuringiensis. Dessen Einsatz lag im Jahr 1984 nur bei 1 150 kg, also ungefähr einer Tonne, das sind nur etwa 2% der potentiellen Einsatzmenge. Ich werde später auf diesen Sachverhalt noch zurückkommen.

Tab. 1: Schmetterlingsarten, deren schädliche Larven in Forst, Obstbau oder Ziergehölzen laut Zulassungen mit einem Bacillus thuringiensis-Präparat bekämpft werden können.

| | |
|------------------------|---------------------|
| Aporia crataegi | Lymantria dispar |
| Bupalus piniarius | Lymantria monacha |
| Dendrolimus pini | Malacosoma neustria |
| Erannis defoliaria | Operophtera brumata |
| Euproctis chrysorrhoea | Spilonota ocellana |
| Hedya nubiferana | Thaumetopoea spp. |
| Hyponomeuta spp. | Tortrix viridana |

Tab. 2: Schmetterlingsarten, deren schädliche Larven in Weinbau, Gemüsebau und Ackerbau laut Zulassungen mit einem Bacillus thuringiensis-Präparat bekämpft werden können.

| | |
|-----------------------|---------------------|
| Eupoecilia ambiguella | Pieris spp. |
| Lobesia botrana | Plutella xylostella |
| Mamestra brassicae | Ostrinia nubilalis |

Tab. 3: Potentiell empfindliche Schmetterlingsarten, die aber bei wirtschaftlich vertretbarem Aufwand nicht mit Bacillus thuringiensis bekämpft werden können.

| | |
|-------------------------|-------------------------|
| Adoxophyes orana | Cydia pomonella |
| Agrotis segetum | Panolis flammea |
| Autographa gamma | Polia oleracea |
| Cacoecimorpha pronubana | Sparganothis pilleriana |
| Choristoneura murinana | |

Tab. 4: Mit Bacillus thuringiensis bekämpfbare Schmetterlingsraupen, für die aber aus verschiedenen Gründen keine Zulassung vorliegt.

| | | | |
|-----------------------|-----|-----------------------|-----|
| Archips rosanus | 0 | Leucoma salicis | 0 |
| Clepsia spectrana | 0 | Orgyia antiqua | 0 |
| Ephestia spp. | V | Plodia interpunctella | V |
| Evergestis forficalis | 0 | Tineola biselliella | #PS |
| Galleria mellonella | #PS | | |

#PS nicht zum Pflanzenschutz zählend

V Vorratsschädling

0 nicht geprüft, da selten (allein) auftretend

2) Ausschließlich perorale Wirksamkeit

Von den rund 300 in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen Insektiziden und Akariziden besitzen nur die B. thuringiensis-Präparate eine ausschließlich perorale Wirkung. Die Toxinkristalle müssen von den zu bekämpfenden Raupen gefressen werden. Die Aufnahme von lebenden Sporen hat bei vielen Arten einen wirkungssteigernden und -beschleunigenden Effekt. Eine perorale Aufnahme setzt eine hinreichende Kontamination des Fraßorts und geeignete Witterungsbedingungen voraus. Das ist bei der Auswahl des Bekämpfungstermins und der Bekämpfungstechnik zu beachten.

Die Bedeutung eines günstigen Bekämpfungstermins wurde bereits 1967 von FRANZ et al. bei einer Großaktion gegen den Eichenwickler (Tortrix viridana) im Forst bei Hanau erörtert. Eine Mindestentfaltung der jungen Eichenblätter (sog. Mausohr-Stadium) und 1 bis 2 warme Tage nach der B. thuringiensis-Ausbringung erwiesen sich als optimal.

Auch zur Frostspanner-Bekämpfung (z.B. Operophtera brumata) ist eine B. thuringiensis-Spritzung erst dann sinnvoll, wenn sich die Blattknospen im Frühjahr geöffnet haben und genügend kontaminierbare Blätter vorhanden sind. Zwar nimmt die Empfindlichkeit der Raupen im allgemeinen mit zunehmender Körpergröße ab, doch sind ältere, meist offen fressende Frostspannerlarven besser zu bekämpfen als Erststadien in den noch unvollständig geöffneten Knospen.

Ähnliches ist bei der Apfelbaumgespinstmotte (Hyponomeuta malinellus) zu beobachten, wenn häufige Niederschläge die Wirkungsdauer des Sprühbelags beeinträchtigen: In einem Versuch zur Ermittlung des günstigsten Behandlungstermins im Jahr 1984 betrug die Entlaubung 40%, wenn zur Zeit der ersten Gespinstbildung gesprüht wurde. Eine Woche später, als 70% der Jungraupen aus den Blattminen ausgewandert waren und Gespinste gebildet hatten, konnte durch Sprühen mit B. thuringiensis die Entlaubung auf 31% begrenzt werden, eine weitere Woche später (100% Gespinste) auf 26% und noch eine Woche später auf 24%. Eine vorzeitige Bekämpfung, solange sich noch Räupchen in den Blattminen aufhalten, vermindert hier also die Wirkung.

Die Kontamination des Fraßorts läßt sich oft durch eine gezielte Ausbringungsart verstärken. Die heute weithin üblichen Applikationsmethoden Spritzen und Sprühen sind in diesem Punkt noch durchaus verbesserungsfähig.

Als Beispiel diene der Maiszünsler (Ostrinia nubilalis), dessen Bekämpfung bis zur Anwendung des Eiparasiten Trichogramma der bedeutendste Anwendungsbereich von B. thuringiensis in Deutschland war. Wenn der Maiszünsler mit einem Stelzenschlepper mit üblichem Spritzgestänge bekämpft wird, gelangen auf die Unterseite der unteren Blätter nur etwa 1% des insgesamt an der Pflanze angelagerten Präparates (LANGENBRUCH, 1979). Gerade hier schlüpfen aber viele der empfindlichen Junglarven, die sich auch oft in diesem Bereich hinter den Blattscheiden aufhalten. Durch einen Spezial-Spritzbalken mit zusätzlichen, tief hängenden und seitlich spritzenden Düsen, läßt sich daher der Präparateaufwand zur Maiszünslerbekämpfung auf die Hälfte reduzieren.

In Frankreich haben sich B. thuringiensis-Granulate zur Maiszünslerbekämpfung bewährt, die sich in Wirtel und Blattachseln ablagern, dort ein Reservoir bilden und von den Raupen aufgenommen werden (STENGEL & ATAK, 1971). Wir stellten aber bei Versuchen mit Luft- und Bodenapplikation fest, daß Granulate unter unseren Klimabedingungen den Spritzpulvern nicht wesentlich überlegen sind (LANGENBRUCH, 1981).

Minierende Raupen sind naturgemäß durch ein peroral wirkendes, nicht systemisches Präparat nur vor dem Einbohren zu erfassen. Ein extremes Beispiel dafür ist die Amerikanische Thuja-Miniermotte (Argyresthia thuiella), die seit einigen Jahren auch in unserem Raum auftritt: Die Larven schlüpfen über einen

Zeitraum von 4 Wochen, bohren sich rasch in die Schuppenblätter ein und sind dann unerreichbar. In einem Freilandversuch waren zu ihrer Bekämpfung mit B. thuringiensis mindestens 5 Spritzungen erforderlich (Wirkungsgrad: 75%), während eine einzige Spritzung mit Diflubenzuron zum gleichen Erfolg führte (LANGENBRUCH, 1984). Hier - wie auch bei Fruchteminierern wie z.B. dem Apfelwickler (Cydia pomonella) - stößt der praktische Einsatz von B. thuringiensis an eine wirtschaftliche Grenze.

Eine völlig andere Möglichkeit, Raupen zur Aufnahme der tödlichen B. thuringiensis-Dosis zu bringen, bietet die Verwendung von Ködern. Wir haben diese Methode bei der Bekämpfung von Erdräupen (Agrotis segetum) verfolgt. Auf Tischbeeten lassen sich bei künstlichem Befall mit Larven des dritten Stadiums durch einen Köder aus Weizenkleie, Zucker, Wasser und 2% B. thuringiensis-Spritzpulver Wirkungsgrade bis zu 80% erzielen. Unter natürlichen Befallsbedingungen ist das allerdings nicht zu erwarten, da die empfindlichen Junglarven auch bei diesem Schädling über mehrere Wochen auftreten, sich die benutzten Köder aber nur kurze Zeit halten. Es wären also mehrere Ausbringungen erforderlich, die aber unter den gegenwärtigen Bedingungen mit den üblichen Parathion-Ködern nicht konkurrieren können.

3) Perorale Wirksamkeit bedeutet auch langsamere Wirkung, da nach der Applikation zunächst eine Pflanzenoberfläche bestimmter Größe gefressen werden muß, damit die tödliche Dosis durch die Larve aufgenommen wird.

Nehmen wir hier einmal als Beispiel den Stamm BI 256-82 vom Pathotyp C des B. thuringiensis und dessen Wirkung auf Kartoffelkäferlarven. Nach RIETHMÜLLER (1986) beträgt für Larven des 1. Stadiums die LD_{90} ca 50 000 Sporenäquivalente. Wenn wir bei der Kartoffelpflanze einen Blattflächenindex von 2 annehmen, so kommt auf jeden m^2 Anbaufläche eine Pflanzenoberfläche von etwa $4 m^2$. Werden nun im Freilandversuch 3×10^{10} Sporenäquivalente/ m^2 Anbaufläche ausgebracht, so gelangen im günstigsten Fall - abgesehen von Abtrift usw. - 75×10^8 Sporenäquivalente / m^2 Pflanzenoberfläche, also 75×10^2 Sporenäquivalente auf einen mm^2 . Damit also 90% Mortalität erreicht werden, muß jede Larve etwa $3,3 mm^2$ Blattober- plus -unterseite fressen. Das aber erfordert Zeit, vor allem bei kühler Witterung. Wenn unter ungünstigen Witterungsbedingungen der Spritzbelag in dieser Zeit zum Teil abgewaschen

wird, ist die Wirkung entsprechend vermindert, im Unterschied zu Kontaktgiften, von denen das Insekt bei oder nach der Applikation direkt getroffen relativ schnell abstirbt.

In vielen Fällen könnte man die Wirkung beschleunigen und verstärken durch den Einsatz einer höheren Dosis, doch scheitert dies derzeit noch an dem hohen Preis der Präparate. So müssen wir feststellen, daß gegenwärtig B. thuringiensis-Produkte eine geringere Wirkungssicherheit und zum Teil auch einen geringeren Wirkungsgrad aufweisen können als chemische Vergleichsmittel.

4) Die in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen B. thuringiensis-Präparate enthalten neben den Toxinkristallen die lebenden Sporen, die oft die Wirksamkeit verstärken. Diese Sporen sind UV-empfindlich. Sie werden durch den UV-Anteil des Sonnenlichtes u.U. bereits in 50 Minuten zu 90% abgetötet (KRIEG et al., 1980). Somit ist es auch von daher empfehlenswert, die Blattunterseiten und die inneren Teile eines Pflanzenbestandes gut zu benetzen. Auch die Suche nach geeigneten bzw. verbesserten UV-Schutzmitteln muß weitergehen.

5) B. thuringiensis-Präparate haben zwar eine jahrelange, aber doch begrenzte Lagerfähigkeit. Das gilt vor allem für Flüssigformulierungen. Uns wurde aber auch einmal eine Packung Spritzpulver geliefert, deren Inhalt bereits völlig unwirksam war. Die Produzenten sollten deshalb unbedingt ein Verfalls-Datum für das Präparat auf der Packung angeben. Auch sollte in der Gebrauchsanweisung darauf hingewiesen werden, daß alle B. thuringiensis-Produkte vor Wärme geschützt gelagert werden müssen, und außerdem Spritzpulver trocken zu lagern sind. Überlagerte oder unzureichend aufbewahrte oder abgefüllte Produkte führen zwangsläufig zu Fehlschlägen, die dem Ansehen der B. thuringiensis-Präparate und darüber hinaus der biologischen Schädlingsbekämpfung allgemein schwer schaden. Ganze Einsatzgebiete können auf diese Weise verloren gehen.

6) Die Sporen von B. thuringiensis keimen im Verlauf der Anwendung weder auf den behandelten Pflanzen noch im Boden oder im Wasser aus. Nur auf geeigneten

Nährmedien kann es zu einer Keimung und Vermehrung kommen. Dabei können Stoffwechselprodukte entstehen, die nicht selektiv wirken. Diese Überlegungen veranlaßten in Deutschland das Bundesgesundheitsamt zu hygienischen Auflagen: die Ausbringung von B. thuringiensis-Präparaten ist in den Wasserschutz-zonen 1 und 2 untersagt. Wir haben damit gegenwärtig in bestimmten Wasserschutz-gebieten in der Zone 2 den kuriosen Fall, daß der Landwirt zwar den hygienisch nicht unbedenklichen Stallmist streuen und sogar Jauche ausbringen darf, die Spritzung des B. thuringiensis aber verboten ist. Mit Recht wird nach der Logik solcher Regelungen gefragt (KRIEG, 1978, 1983).

Ebenfalls wegen der Befürchtung, daß lebende Sporen von B. thuringiensis die mikrobiologische Qualität von Getreide und Getreideprodukten reduzieren können, ist in Deutschland die Anwendung von B. thuringiensis im Vorratsschutz derzeit nicht erlaubt. Es liegen aber inzwischen die Ergebnisse von Bekämpfungsversuchen - nach einem Vorschlag von BERLINER - vor. Dabei bewährte sich eine Methode, bei der eine Pulverformulierung in die oberen 5 cm einer Getreideschüttung eingeharkt wurde (RASSMANN, 1986). Um bei solchen Verfahren zur Mehlmotenbekämpfung auf lebende Sporen zu verzichten, wurden versuchsweise B. thuringiensis-Präparate mit Gamma-Strahlen behandelt. Im Biotest mit der Mehlmotte (Ephestia kühniella) ergab sich dann, daß ein sporeninaktiviertes B. thuringiensis-Präparat in einer Konzentration von 0,09% erst 3 - 7 Tage später eine gleichhohe Mortalität bewirkte wie das Produkt mit lebenden Sporen. In einer schwächeren Konzentration (0,03%) lag das teilinaktivierte Präparat selbst nach 16 bzw. 21 Tagen in seiner Wirkung mehr als 50% niedriger als das unbestrahlte Ausgangsprodukt. Um mit einem Gamma-bestrahlten Präparat einen ausreichenden Bekämpfungserfolg zu erzielen, ist deshalb eine entsprechende Dosis-Steigerung erforderlich. Ein B. thuringiensis-Einsatz im Vorratsschutz ist also derzeit in der Bundesrepublik noch nicht möglich.

Gute Erfolge gegen die Speichermotte (Ephestia elutella) waren indessen durch die Verwendung von B. thuringiensis subsp. kurstaki in einer großen kommerziellen Mehlkäfer-Zucht (Tenebrio molitor) zu erzielen. Bei einem Aufwand von 150 g Spritzpulver auf 100 kg Kleie, wobei das Mittel in einer dünnen Schicht auf die Zuchtschalen gestreut wurde, konnte die schädliche Mottenpopulation entscheidend reduziert werden. Auf diese Weise wurde ein großer wirtschaftlicher Schaden in der Mehlkäfer-Zucht mit biologischen Mitteln beseitigt.

Auch zur Bekämpfung von Wachsmotten in Bienenwaben hat sich B. thuringiensis bewährt. Während synthetische chemische Insektizide für einen solchen Einsatz wegen der Breite ihres Wirkungsspektrums nicht infrage kommen, kann B. thuringiensis hier problemlos eingesetzt werden, weil er die Honigbiene (Apis mellifera) und ihre Brut unangegriffen läßt. Zu diesem Zweck wurde ein spezielles kommerzielles Präparat entwickelt.

7) Nun kommen wir zu einem Punkt, der nicht als Ergebnis wissenschaftlicher Forschungsarbeit, sondern eher als Anreiz zu weiteren Untersuchungen und vor allem Kalkulationen anzuführen ist: B. thuringiensis-Präparate sind in der Bundesrepublik Deutschland, aber auch in anderen Teilen der Welt viel zu teuer!

Von der Landes-Lehr- und Versuchsanstalt für Landwirtschaft, Wein- und Gartenbau in Oppenheim wurden auch in diesem Jahr die Präparatekosten für 100 l Spritzflüssigkeit im Weinbau gegenübergestellt: Sie betragen bei Einsatz von Parathion DM 0,96, bei der Verwendung von Orthen DM 6,28 und bei B. thuringiensis DM 13,29. An anderer Stelle wurden daraus wirtschaftspolitische Folgerungen abgeleitet. Hier soll betont werden, wie wichtig es ist, die Produktion und Formulierung effektiver Stämme zu verbilligen. Die praktische Nutzung von B. thuringiensis im Pflanzenschutz steht und fällt mit einem vernünftigen, konkurrenzfähigen Preis wirksamer Präparate.

Nun setzen sich die Kosten eines Pflanzenschutzmittel-Einsatzes zusammen aus den Präparatekosten und den Ausbringungskosten, d.h. den Kosten für das Gerät, die Arbeitszeit und - bei Spritzmitteln - für das Wasser. Wir haben deshalb versucht, die Anwendung von B. thuringiensis durch Verminderung der Ausbringungskosten zu verbilligen.

Ein billiges Ausbringungsverfahren ist das Nebeln, weil dabei feintropfig und relativ hoch konzentriert gearbeitet werden kann. Nebeln ist aber heute im Freiland verpönt, weil dadurch möglicherweise eine erhebliche Abtrift verursacht wird. Abtrift ist bei synthetischen Pflanzenschutzmitteln bekanntlich unerwünscht, weil dadurch Mensch und Umwelt über das unvermeidbare Maß hinaus belastet werden. Diese Belastung bzw. Gefährdung ist aber direkt von der

Breitwirksamkeit eines Präparats abhängig. Bei einem selektiv wirkenden Produkt wie B. thuringiensis ist die Abtrift unbedenklich.

Bei einer breitwirksamen Chemikalie (Abb. 1), die meist billig ist, benötigen wir eine saubere Anwendungstechnik, die u.U. teuer ist. Dazu gehört auch der Anwenderschutz, die Einhaltung einer Wartezeit, die Vermeidung von Abtrift, nach Möglichkeit auch eine gleichmäßige Verteilung des Präparats und eine Einengung des Tropfenspektrums. Trotzdem werden nicht nur die Zielorganismen, sondern darüber hinaus auch größere Teile der Umwelt beeinträchtigt.

Anders ist dies bei einem selektiven Präparat, das dafür aber oft teurer ist (Abb. 2). Hier reicht durchaus eine geeignete, auch einfache und billige Anwendungstechnik aus, und es werden fast ausschließlich die Zielorganismen getroffen. Allerdings darf die dabei entstehende Abtrift nicht zu unwirtschaftlich hohem Präparateverlust führen, sonst ist das Verfahren für teure Produkte ungeeignet.

Aus diesen Überlegungen heraus haben wir Schwingbrenner-Nebelgeräte nach zahlreichen Gewächshausversuchen auch im Freiland zur Bekämpfung der Apfelbaumgespinstmotte (Hyponomeuta malinellus) mit B. thuringiensis getestet. Wir vernebelten eine 1%ige wässrige Suspension eines B. thuringiensis-Spritzpulvers im Vergleich zu einem 0,3%igen Sprühen mit einem Rückensprühgerät. Als Maßstab für den Bekämpfungserfolg ermittelten wir die Zunahme der Gespinste nach der Applikation (Tab. 5).

Tab. 5: Vergleich zweier Ausbringungsverfahren von Bacillus thuringiensis zur Bekämpfung der Apfelbaumgespinstmotte.

| Behandlung | Zunahme der Gespinstmotte (in %) | |
|----------------|----------------------------------|------|
| | 1982 | 1983 |
| Sprühen (0,3%) | 10 | 95 |
| Nebeln (1,0%) | 46 | 60 |
| Unbehandelt | 470 | 392 |

Pflanzenschutzmittel - Pflanzenschutztechnik -
Umwelt

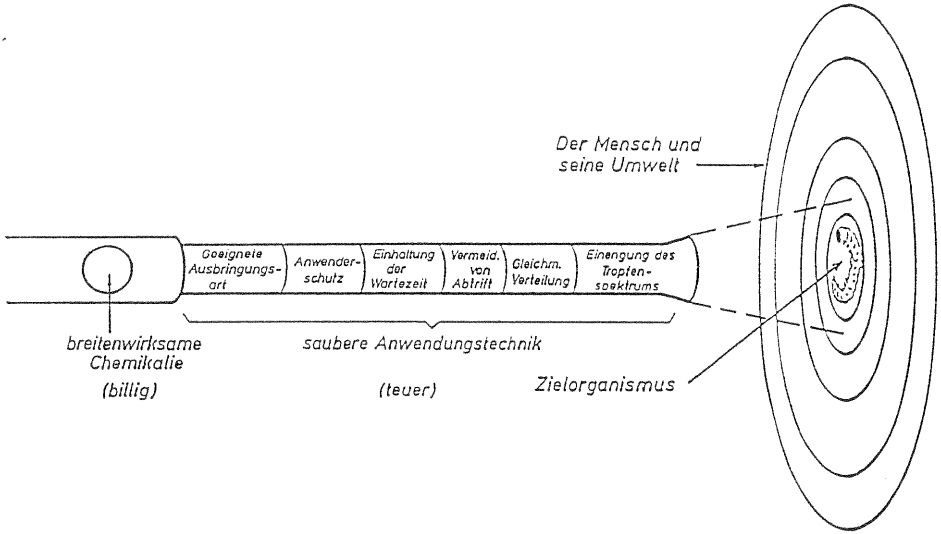


Abbildung 1: Möglichkeiten der Anwendungstechnik zur Verminderung der Umweltbelastung durch breitwirksame Pflanzenschutzmittel.

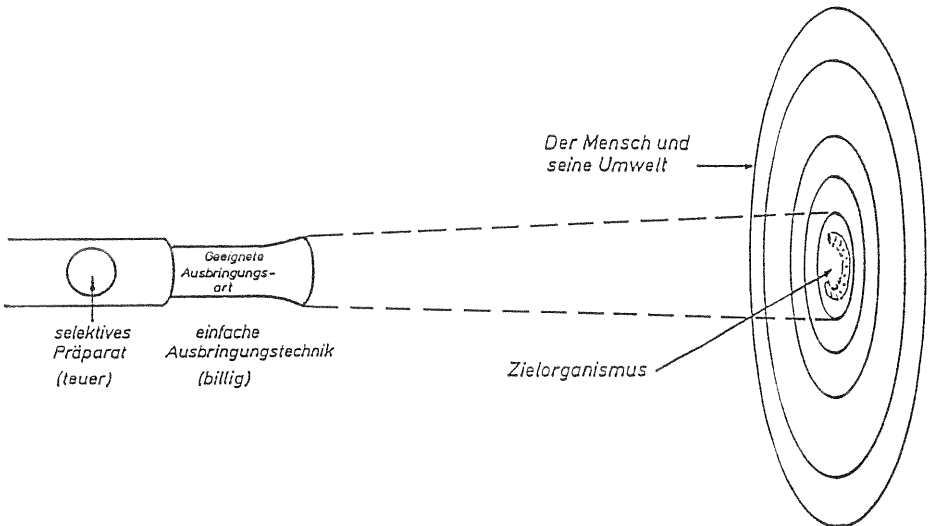


Abbildung 2: Selektive Pflanzenschutzmittel beeinträchtigen die Umwelt auch bei einfacher Ausbringungstechnik nicht.

Bei einem ersten Versuch (1982) beobachteten wir nach dem Nebeln eine etwas stärkere Gespinstzunahme als nach dem Sprühen, doch hatten beide Verfahren eine beachtliche Wirkung im Vergleich zu Unbehandelt. Im zweiten Versuch (1984) nahmen die Gespinste nach dem Sprühen stärker zu als nach dem Nebeln. Auch hier war in beiden Fällen ein deutlicher Bekämpfungserfolg zu beobachten. Je nach Witterung ist also das eine oder andere Verfahren überlegen, das bedeutet, daß mit beiden Methoden eine Bekämpfung möglich ist. Inzwischen ist ein Nebelgerät zur Ausbringung eines B. thuringiensis-Präparats im Forst amtlich anerkannt. Durch eine einfache, aber geeignete Ausbringungsmethode kann so der B. thuringiensis-Einsatz verbilligt werden, doch sind die Einsparungen begrenzt.

Wenn ich eine Absatzmenge von 1 Tonne pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland nannte, so entfallen davon etwa ein Drittel auf Anwendungen im öffentlichen Grün der Kommunen, ein weiteres Drittel auf den Kleingartenbereich, ein Viertel auf den Weinbau, und nur der Rest von weniger als 10% wird in Landwirtschaft, Gartenbau und Forst eingesetzt. Das dürften vor allem alternativ arbeitende Betriebe sein. Der durchschnittliche, konventionell oder auch integriert arbeitende Praktiker verwendet diese Produkte leider bisher fast nicht.

Ein hauptsächlicher Grund dafür dürfte in dem hohen Preis der Präparate liegen. Außerdem haben wegen fehlender - oder trotz bekannter - Schadschwellenwerte für viele Praktiker Wirkungsgrad und Wirkungssicherheit eines Pflanzenschutzmittels einen höheren Stellenwert als umweltschonende Selektivität, wenn diese nicht unmittelbar betriebswirtschaftlich zu Buche schlägt. Darüber hinaus erfordert der wirkungsvolle Einsatz von B. thuringiensis Vorkenntnisse, die - wie z.B. die Ermittlung der Schädlingsart und des günstigsten Einsatztermins - leider noch nicht Allgemeingut, aber Voraussetzung für jeden gezielten Pflanzenschutz sind.

Zukunftsperspektiven

Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln wird oft durch das Auftreten von Resistenzen begrenzt. Inzwischen ist B. thuringiensis in Deutschland seit 20 Jahren im Handel, ohne daß entsprechende Empfindlichkeitsrückgänge bekannt

wurden.

Schon vor 10 Jahren haben wir versucht, bei der Kohlmotte (Plutella xylostella) im Labor durch hohen Selektionsdruck mit dem HD-1-Stamm eine Resistenz zu induzieren. Das ist uns im Verlauf von über 30 Generationen nicht gelungen (LANGENBRUCH & KRIEG, 1976). Dieses Ergebnis bestätigten Befunde von DEVRIENDT & MARTOURET (1976) am gleichen Wirt. Inzwischen wird aber aus Süostasien von Resistenzen bei Plutella xylostella berichtet, und wir haben von dort einen Stamm erhalten, der tatsächlich erheblich unempfindlicher auf B. thuringiensis reagiert als unser Laborstamm. Weitere Untersuchungen sind angelaufen. Dabei ist vor allem auch zu klären, ob es sich hierbei um einen Resistenzerwerb oder um natürlicherweise unempfindlichere Populationen handelt.

In den USA fand McGAUGHEY (1985) nicht nur natürliche Empfindlichkeitsunterschiede bei verschiedenen Populationen von Plodia interpunctella, sondern auch eine Beziehung zu vorausgegangenem B. thuringiensis-Einsatz. Im Labor konnte er dann durch gezielte Selektion die Empfindlichkeit bei diesem Vorratschädling ganz wesentlich reduzieren. Eine Resistenzentwicklung unter B. thuringiensis-Einfluß kann also nicht ausgeschlossen werden, doch sehen wir unter den bisherigen Einsatzbedingungen in Deutschland und Westeuropa hierfür keinerlei Anhaltspunkte bzw. Gefahren.

Mit zunehmendem Umweltbewußtsein in der breiten Öffentlichkeit wird die Bedeutung selektiver Pflanzenschutzmittel zunehmen. Die Entwicklung spezifisch wirkender, synthetischer Pflanzenschutzmittel ist aber teuer und wird u.a. durch umfangreichere Prüfungen vor einer Zulassung bei relativ kleinem Einsatzbereich immer weniger lohnend sein. Dadurch können biologische Verfahren und damit auch B. thuringiensis-Präparate künftig wesentlich an Bedeutung gewinnen, wenn sie zu einem vernünftigen Preis angeboten werden. In Kanada wurden 1983 auf 3% der insgesamt mit Insektiziden behandelten Waldflächen B. thuringiensis-Präparate eingesetzt, 1986 aber bereits auf 72% , d.h. 2 Millionen Hektar. Die B. thuringiensis-Ausbringung auf der ganzen Welt wird gegenwärtig auf 3000 bis 4000 Tonnen pro Jahr geschätzt (BURGES & DAoust, 1986), davon werden über 60% in Nordamerika eingesetzt, gefolgt von Südostasien, Südamerika und Afrika. Europa und Australien stehen an letzter Stelle.

In den nächsten Jahren ist auch mit der kommerziellen Produktion und amtlichen

Zulassung weiterer selektiv wirkender Insektenpathogene und mit der Praxisreife weiterer anderer biologischer Verfahren zu rechnen. Durch eine Kombination selektiver Bekämpfungsmethoden werden deren Einsatzmöglichkeiten erweitert. Zum einen können dann auch Schadgesellschaften ohne Beeinträchtigung der Nützlingsfauna bekämpft werden (Beispiel: Kohleule - Kohlweißlinge - Blattläuse am Kohl; LANGENBRUCH et al., 1986), zum anderen können bei Kombination selektiver Präparate auch solche Schädlinge erfaßt werden, die gegenüber einem einzelnen Agens recht widerstandsfähig sind. Bei einer derartigen Kombination sind sogar synergistische Effekte möglich, wodurch die erforderlichen Dosen erheblich gesenkt werden könnten (Beispiel: Bekämpfung der Nonne (Lymantria monacha) durch Kombination von Kernpolyederviren mit B. thuringiensis in relativ niedriger Dosis; HUBER et al., 1979).

In Einzelfällen kann allerdings auch der B. thuringiensis durch andere selektive Bekämpfungsverfahren Konkurrenz erhalten. So wird heute bereits durch den umfangreichen Einsatz von Trichogramma-Schlupfwespen in der Bundesrepublik der B. thuringiensis kaum noch gegen den Maiszünsler verwendet.

Auch 75 Jahre nach seiner Entdeckung sind die mit dem B. thuringiensis gegebenen Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung noch keineswegs erschöpft. Abgesehen von den mit der Gentechnik eröffneten neuen Wegen, haben das u.a. die zahlreichen in den letzten Jahren entdeckten Stämme mit neuem Wirtsbereich gezeigt, mit denen ganz neue Einsatzgebiete erschlossen wurden. So dürfte es auch nur eine Frage der Zeit sein, bis gegenüber Noctuiden effektivere Stämme verfügbar sind. Ein z.Z. im Feldversuch stehendes Präparat erscheint in dieser Hinsicht recht erfolgversprechend.

Ich möchte meinen Vortrag mit 5 Forderungen schließen, die mir für den künftigen praktischen Einsatz des B. thuringiensis wichtig erscheinen.:

- 1) Intensives Screening mit dem Ziel, neue Stämme mit selektiver Wirkung gegen weitere Schädlingsgruppen zu finden
- 2) Verbesserte und billigere Produktionsverfahren
- 3) Verbesserte Formulierungen mit Fraßstimulantien, UV-Schutzmitteln und höherer Regenbeständigkeit
- 4) Wirtschaftspolitische Maßnahmen zur Förderung umweltfreundlicher Pflanzenschutzmittel
- 5) Beseitigung nicht gerechtfertigter hygienischer Auflagen.

Literatur:

BERLINER, E., 1911. Ztschr. ges. Getreidewesen, 3 (3), 63-70.

BURGES, H.D., DAOUST, R.A., 1986. In: SAMSON, R.A., VLAK, J.M., PETERS, D. (Eds.): Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Foundation 4th Internat. Coll. Invertebr. Path., Wageningen. p. 514-517.

DEVRIENDT, M., MARTOURET, D., 1976. Entomophaga, 21, 189-199.

FRANZ, J.M., KRIEG, A., REISCH, J., 1967. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 19, 36-44.

HASSAN, S.A., 1984. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 36, 6-8.

HERFS, W., 1978. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 30, 173-174.

HUBER, J., KRIEG, A., HUGER, A.M., ALTENKIRCH, W., 1979. Jahresbericht der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 1979, p. 87.

KRIEG, A., 1978. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 30, 177-181.

KRIEG, A., 1983. Anz. Schädlingskde. Pflanzensch. Umweltschutz, 56, 41-52.

KRIEG, A., GRÖNER, A., HUBER, J., MATTER, M., 1980. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 32, 100-105.

KRIEG, A., LANGENBRUCH, G.A., 1981. In: BURGES, H.D., (Ed.): Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London, p. 837-896.

LANGENBRUCH, G.A., 1979. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig), 31, 185-189.

LANGENBRUCH, G.A., 1981. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 46/2, 429-436.

LANGENBRUCH, G.A., 1984. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd., 36, 161-164.

LANGENBRUCH, G.A., KRIEG, A., 1976. Jahresbericht der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 1976, p. 81.

LANGENBRUCH, G.A., HOMMES, M., GRÖNER, A., 1986. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 93, 72-86.

McGAUGHEY, W.H., 1985. Science, 229, 193-195.

RASSMANN, W., 1986. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd., 38, 61-63.

RIETHMÜLLER, U., 1986. Optimierung der Biotestverfahren mit *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* gegen den Kartoffelkäfer. Diplomarbeit, TH Darmstadt, 72 pp.

STENGEL, M., ATAK, E.D., 1971. Rev. Zool. Agric. Pathol. Veget., 70, 67-74.

N. BECKER

Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Stechmückenplage e.V.,
Ludwigshafen/Rhein

Bacillus thuringiensis subspec. israelensis - eine mikrobielle Alternative
in der Bekämpfung von Stechmücken und Kriebelmücken

Bacillus thuringiensis subspec. israelensis - a microbial alternative
in control of mosquitoes and black flies

Summary

Mosquitoes and black flies are the vectors of most important diseases of man like malaria, yellow and dengue fever, encephalitis and filariasis. These pest insects are also the reason for lowering the quality of human life by annoyance e.g. in the Upper Rhine Valley. Chemical insecticides like DDT are mainly used against vector insects. The environmental consequences regarding the use of nonselective and persistent insecticides as well as the development of insect resistance by target species have brought about intensified efforts to develop efficient biological control agents for the suppression of bloodsucking insects.

In 1976 Bacillus thuringiensis subspec. israelensis (B.t.i.) was isolated by GOLDBERG and MARGALIT (1977) as a highly selective microbial insecticide against mosquitoes and black fly larvae whereas it is harmless to predators of culicids and simuliids and other non-target organisms. The high efficacy and the outstanding environmental compatibility of B.t.i. are the reasons why commercial B.t.i.-products have been used by the "Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Stechmückenplage" (KABS) in routine treatments against mosquitoes in the Upper Rhine Valley. Since 1982 more than 16 000 hectares of breeding sites were successfully treated with 8 tons of BACTIMOS WP, 8000 litres of flowable concentrates e.g. TEKNAR HP-D and 114 tons of B.t.i.-sand-granules, whereby the mosquito population was reduced by more than 90 %. The largest single programme that routinely uses B.t.i. is the Onchocerciasis Control Programme (OCP) in West Africa. It was urgently necessary to use B.t.i. because of the black fly resistance to TEMEPHOS. Thousands of Riverkilometers as breeding sites of e.g. Simulium damnosum are weekly treated successfully with TEKNAR flowable concentrate using an amount of about 300 000 liters every year. Now Onchocerciasis is no more an important insect borne disease in the control area.

B.t.i. offers us high efficacy against target organisms and safety for all other organisms and it will become even more important with the increasing environmental problems and the resistance of vectors against chemicals.

EINLEITUNG

Die Stechmücken (Culicinae) gehören weltweit zu den häufigsten Überträgern (Vektoren) gefährlicher Krankheiten wie Malaria, Gelb- und Denguefieber, Encephalitis oder Filariosen. Nach den Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) treten weltweit jährlich etwa 90 Mill. Malariafälle auf (GRATZ, 1985). In den meisten Städten Südost-Asiens sowie im westpazifischen Raum leiden Hunderttausende an Dengue- oder hämorrhagischem Dengue-Fieber (Vektor: meist Aedes aegypti).

Mehr als 80 Mill. Menschen in den Entwicklungsländern Südost-Asiens und Afrikas sind mit Fadenwürmern (Wuchereria bancrofti und Brugia malayi) infiziert, die lebensgefährliche Filariosen hervorrufen (Vector: z.B. Culex quinquefasciatus).

In weiten Teilen des tropischen Afrikas und auch in Zentral- und Südamerika übertragen die in Fließgewässern brütenden Kriebelmücken (z.B. Simulium damnosum) die Knäufelfilarie (Onchocerca volvulus) - ein Fadenwurm, der die gefährliche Flußblindheit (Onchozerkose) hervorrufft. Man schätzt, daß etwa 30 Mill. Menschen weltweit an Onchozerkose leiden.

Stechmücken, insbesondere die Aedes-Arten, können aber auch durch ihr massenhaftes Auftreten entlang großer Flußsysteme (z.B. am Oberrhein) plageerregend sein und die Lebensqualität der Menschen erheblich schmälern. Ähnliches trifft für die Kriebelmücke zu, die in Mitteleuropa im Bereich von kleineren Flüssen besonders in Norddeutschland (Jülich/Rur), in der DDR (Aller-Leine) sowie der Schweiz (Umgebung von Zürich) Menschen und vor allem Weidetiere durch ihr massenhaftes Auftreten peinigt. Gelegentlich können sogar Weidetiere wie Kühe infolge der zahlreichen Stiche sterben.

Seit mehr als 40 Jahren ermöglichen chemische Insektizide eine relativ einfache und ökonomische Bekämpfung fast aller Krankheitsüberträger. Nach Berechnungen der WHO wurden in den besonders betroffenen Entwicklungsländern Anfang der 80er Jahre jährlich mehr als 50 000 t chemischer Insektizide ausgebracht. DDT ist auch heute noch das bei weitem gebräuchlichste Insektizid (etwa 50 % des Gesamtverbrauchs aller Insektizide in den Tropen).

Zunächst glaubte man allein mit chemischen Insektiziden Krankheiten wie die Malaria oder Flußblindheit nahezu ausmerzen zu können, doch bald wurden viele Krankheitsüberträger (z.B. wichtige Vektoren der Malaria wie Anopheles albimanus oder An. stephensi) in zunehmendem Maße resistent gegen Insektizide. Neue Insektizide mußten für sehr viel Geld entwickelt werden, wobei auch hier eine bald auftretende Resistenz nicht auszuschließen war.

Neben der Resistenz waren auftretende Umweltprobleme mit den herkömmlichen Insektiziden wie Anreicherung in der Nahrungskette und unselektive Wirkung (z.B. Abtöten von Freißfeinden der Mückenlarven) wesentliche Gründe dafür, daß man nach umweltverträglichen biologischen Methoden zur Insektenbekämpfung suchte.

Bacillus thuringiensis subsp. israelensis

Im August 1976 fand Dr. MARGALIT auf der Suche nach Krankheitserregern bei Stechmücken in einem Tümpel in der Negev-Wüste tote und moribunde Larven von Culex pipiens. Im Labor stellte sich heraus, daß die Ursache für das Zusammenbrechen der Culex-Population ein sporen- und kristallbildender Bazillus war (GOLDBERG UND MARGALIT, 1977), der nahe mit dem erstmals 1911 von Dr. BERLINER in toten Mehlmotten-Raupen isolierten Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis verwandt ist. Man nannte den neuen Bazillus Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (B.t.i.); entsprechend seinem Geißel-Antigen gehört er zum Serotyp H-14 (deBARJAC, 1981).

Während der Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis schmetterlingsspezifisch ist und dem Pathotyp A zugerechnet wird, erwies sich B.t.i. als mückenspezifisch. Er wurde dem neuen Pathotyp B zugeordnet, weil er ganz gezielt nur filtrierende Larven der Stechmücken (mehr als 3.000 Spezies) sowie der Kriebelmücken (ca. 1 000 Spezies) abtötet. Nur bei vielfacher Überdosierung können noch wenige andere Mücken wie z.B. einzelne Zuckmücken-Arten (Chironominae) getroffen werden, während alle anderen Organismen und natürlich auch Menschen nicht geschädigt werden.

Die gezielte Wirksamkeit von B.t.i. beruht auf den im Zuge der Sporulation gebildeten Proteinkristallen, die das Protoxin -auch Delta-Endotoxin genannt- enthalten. Erst im alkalischen Darmmilieu wird das Protoxin unter der Einwirkung von Proteasen in das hochwirksame Toxin umgewandelt, das die Mitteldarm-Epithelzellen der Mückenlarven zerstört. Durch die Schädigung dieser Zellen gehen die osmotischen Eigenschaften der Plasmamembran verloren; die Zellen schwellen an und platzen. Der Darminhalt kann nun durch die entstandenen Löcher in das Hämocoel eindringen und sich mit Hämolymphe vermischen, woran die Larve je nach der Menge des aufgenommenen Protoxins nach wenigen Minuten bis Stunden stirbt.

Nach umfangreichen Safety-Tests und Untersuchungen zur Umweltverträglichkeit von B.t.i. wurden die ersten kleineren Freilandversuche Ende der 70er und großflächige Applikationen Anfang der 80er Jahre nicht nur im Oberrheingebiet, sondern auch in anderen Teilen der Welt, z.B. in den USA und Frankreich,

unternommen. Seit 1981 ist B.t.i. bereits in den USA als Bekämpfungsmittel behördlich zugelassen und wird nicht nur von mehreren großen Firmen in Europa und USA, sondern auch in China und der Sowjetunion im Tonnenmaßstab erfolgreich produziert und angewendet. Schätzungen gehen davon aus, daß zur Zeit jährlich ca. 200 t formulierte B.t.i.-Produkte weltweit gegen Stechmücken und bisher insgesamt ca. 2 000 t gegen Kriebelmücken - vorwiegend in West Afrika - eingesetzt wurden.

Mit B.t.i. hat man erstmals ein mikrobiologisches Insektizid zur Verfügung, mit dem effektiv und umweltschonend Mücken bekämpft werden können und das zudem leicht zu produzieren und lagerbar ist. Heute steht fest, daß es außer dem Pathotyp A (schmetterlingsspezifisch) und Pathotyp B (mückenspezifisch) noch andere Pathotypen von B.t. gibt, mit denen unterschiedliche Gruppen von Insekten biologisch bekämpft werden können (KRIEG et al. 1983; KRIEG, A., 1986).

Zwei Beispiele sollen den erfolgreichen Einsatz von B.t.i.-Produkten belegen: a) die Bekämpfung der Stechmücken am Oberrhein sowie b) die Bekämpfung der Kriebelmücken in Westafrika, wodurch der dort grassierenden Flußblindheit Einhalt geboten wird.

DIE BIOLOGISCHE STECHMÜCKENBEKÄMPFUNG - EIN MODELL AM OBERRHEIN

Früher wurde die Lebensqualität der Menschen in weiten Teilen des Oberrheingebietes ganz erheblich in den Sommermonaten durch massenhaft auftretende Stechmücken geschmälert. Nachdem im Jahre 1975 die Stechmückenplage besonders groß war, gründete man im Frühjahr 1976 die "Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Stechmückenplage" (KABS), um die Stechmückenbelästigung mit umweltschonenden Methoden auf ein erträgliches Maß zu reduzieren. Heute gehören der KABS zwischen Ludwigshafen/Mannheim und dem Landkreis Rastatt mehr als 60 Städte und Gemeinden auf beiden Seiten des Rheines an.

Bekämpfungsstrategie: Die Bekämpfungsaktivitäten der KABS zielen auf die im Wasser lebenden Entwicklungsstadien der Stechmücken ab, weil sie im Gegensatz zu den sich weitflächig verteilenden Fluginsekten in den Brutgewässern konzentriert vorkommen und weil gerade gegen Stechmückenlarven neu entwickelte biologische Methoden, wie z.B. die B.t.i.-Methode, eingesetzt werden können.

Die Grundvoraussetzungen für diese Bekämpfungsstrategie sind:

- a) eine vollständige kartographische Erfassung der Stechmückenbrutstätten unter Berücksichtigung ökologischer Zusammenhänge sowie
- b) eine genaue Kenntnis der Biologie und Ökologie der vorhandenen Stechmückenarten.

Die im Oberrheingebiet vorkommenden Stechmücken und ihre Lebensweise

Von den in Deutschland vorkommenden 44 Stechmückenarten treten mindestens 26 Arten im Oberrheingebiet auf. Im Bereich der Rheinebene sind insbesondere 2 Stechmückengruppen plageerregend (BECKER et al. 1985):

a) Die Aedes-Mücken (Überschwemmungsmücken)

Bei den Überschwemmungsmücken sind in Mitteleuropa besonders die Aedes-Arten plageerregend, deren Brutplätze temporäre Gewässer im Überschwemmungsbereich von Flüssen sind, z.B. Tümpel, die bei Hochwasser des Rheins entstehen und meist nach zwei bis drei Wochen wieder trockenfallen. Die häufigsten Arten sind Aedes vexans (die Wiesenmücke), die meist mehr als 90 % der Stechmückenfauna in den Sommermonaten ausmacht, sowie Aedes sticticus (die Auwaldmücke). Beide zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Massenvermehrung während hochwasserreicher Sommermonate, einen starken Wandertrieb (Wanderung bis mindestens 15 km) sowie eine ausgeprägte Stechlust aus, weshalb sie im Oberrheingebiet mit Abstand die größten Plageerreger sind.

Es saugen nur die Stechmückenweibchen Blut, das für die Entwicklung der Eier notwendig ist, während die Männchen sich meist von Pflanzensäften ernähren. Die weiblichen Mücken legen ca. 5 Tage nach der Blutmahlzeit ihre Eier einzeln auf feuchtem Boden ab - an Stellen, die nach einem Hochwasser bei zurückgehendem Wasserstand langsam wieder trockenfallen (z.B. feuchte Wiesen, Schilfgebiete, feuchte Ränder von Tümpeln oder häufig überschwemmte Pappelkulturen).

Sobald die Eiablagegebiete bei steigendem Wasserstand während der Sommermonate überschwemmt werden, schlüpfen die Larven aus und entwickeln sich bei hochsommerlichen Temperaturen in ein bis zwei Wochen über 4 Larven- und 1 Puppenstadium bis hin zum Fluginsekt. In den Brutgewässern können sich häufig mehrere Millionen Stechmückenlarven pro Hektar Wasserfläche entwickeln und dies entsprechend der Häufigkeit der Hochwasser mehrmals in einem Sommer.

In den Herbstmonaten sterben die Fluginsekten dieser Aedes-Stechmücken nach und nach ab; nur die Eier überdauern den Winter. Bei ausbleibendem Hochwasser können die Eier mehrere Jahre (mindestens 3 Jahre) lebensfähig überdauern.

In sumpfigen Waldgebieten, z.B. in Erlenbruchwäldern, können sich im Frühjahr andere Aedes-Mücken wie Aedes cantans, Ae. communis oder Ae. punctor entwickeln. Die Waldmückenweibchen sind meist von Mai bis Juli in den Waldbereichen lästig.

b) Die Hausmücke (Culex pipiens)

Im Bereich menschlicher Siedlungen sind vorwiegend die Hausmücken (Culex pipiens) lästig, wenn sie während der Nachtruhe am schlafenden Menschen ihre Blutmahlzeit vollziehen. Zwei bis drei Tage danach legen sie ihre Eier in Form eines "Eischiffchens" an der Wasseroberfläche ab. Ihre bevorzugten Brutplätze sind: Klein- und Kleinstgewässer wie Regentonnen, Jauche- und Abwassergruben, Sickerschächte, Kanalisationen, Gullys, Gartenteiche mit faulem Pflanzenmaterial (ohne Fische und andere Freßfeinde oder wassergefüllte Altreifen. Wenige Tage nach der Eiablage schlüpfen die Larven. Die 4 Larvenstadien und das Puppenstadium werden bei sommerlichen Temperaturen in ca. 2 Wochen durchlaufen.

Nach der Paarung der geschlüpften Fluginsekten dringen die weiblichen Hausmücken erneut in Gebäude ein. Dieser Kreislauf wird mehrere Male während eines Sommers wiederholt. Im Spätherbst suchen die weiblichen Mücken ihre Winterquartiere, z.B. unbeheizte Keller, auf.

Die Bekämpfung der Aedes-Arten (Überschwemmungsmücken)

Eine "integrierte Bekämpfung", bei der unterschiedliche, kompatible Methoden eingesetzt werden, reduziert zum einen die Resistenzgefahr, zum andern können auch gezieltere Bekämpfungsmaßnahmen durchgeführt werden. Dabei gilt es, aus den verfügbaren Methoden jeweils diejenige auszuwählen, die in einer gegebenen Situation nicht nur hinreichend wirksam, sondern auch umweltverträglich ist.

Im Bereich der Aktionsgemeinschaft werden nach sorgfältiger Prüfung auf Umweltverträglichkeit folgende Methoden in einem "integrierten Bekämpfungsprogramm" angewendet:

1. Mikrobiologische Methoden: Seit 5 Jahren werden vorwiegend bei der Routinebekämpfung Produkte auf der Basis von B.t.i. eingesetzt.
2. Wasserbauliche und flankierende Maßnahmen: Die natürlichen Freßfeinde der Stechmücken zu schonen und zu fördern, ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Stechmückenbekämpfung.
3. Die Oberflächenfilm-Methode: In den Jahren 1976 bis 1981 wurde vorwiegend die Oberflächenfilm-Methode eingesetzt. Eine Mischung aus Sojalezithin und dünnflüssigem Paraffinöl - das sogenannte Liparol - tötet als dünner Oberflächenfilm rein physikalisch Stechmückenpuppen und teilweise auch Larven des 4. Stadiums durch Ersticken ab.

Obwohl der Oberflächenfilm relativ selektiv wirkt, zeigt er vor allem bei Überdosierung unerwünschte Nebeneffekte auf diejenigen Wasserinsekten, die an der Wasseroberfläche atmen oder leben. Wegen dieser Nachteile begannen wir 1978, mit B.t.i. zu experimentieren. Eine Reihe von Labor- und Freilandtests sowie ein Großversuch 1982 (SCHNETTER et al., 1983) bewiesen die hohe Selektivität von B.t.i.-Produkten. Die ersten Freilandversuche zeigten weiterhin, daß verschiedene Faktoren die Wirksamkeit von B.t.i. beeinflussen können:

1. Da sich das B.t.i.-Toxin im gesamten Wasserkörper verteilt, benötigt man in tieferen Wasserkörpern eine höhere Dosis, um eine letale Konzentration zu erreichen.
2. Die Larven werden mit zunehmender Entwicklung unempfindlicher gegen B.t.i. So reagieren Larven des 1. Stadiums von Aedes-vexans etwa 10mal empfindlicher als frühe Larven des 4. Stadiums. Junge Viertlarven sind immerhin noch doppelt so empfindlich wie späte Viertlarven. Es empfiehlt sich daher, möglichst bald nach Auftreten der Stechmückenbrut mit der B.t.i.-Bekämpfung zu beginnen.

3. Der Ernährungszustand der Larven und die Menge der zur Verfügung stehenden Nahrung sowie die Freßrate in Abhängigkeit von der Wassertemperatur beeinflussen die B.t.i.-Wirkung. In sehr nährstoffreichem Wasser muß etwa 2mal soviel B.t.i. appliziert werden wie in nährstoffarmem Wasser.
4. Oftmals können mehr als 1000 Larven/Liter Wasser gezählt werden. In diesem Falle kann die Menge des Toxins, die von einer Larve aufgenommen wird, nicht ausreichend sein.

Nach den guten Ergebnissen des Großversuchs 1982 werden seit 1983 von der KABS kommerzielle B.t.i.-Produkte wie z.B. Puder- und Flüssigformulierungen getestet und in großem Maßstab routinemäßig eingesetzt (Abb. 1 und 2).

| PRODUKT | DOSIS | HABITAT Oberfläche/Tiefe | SPEZIES | ZAHL DER LARVEN/10 SCHÖPFPROBEN VOR DER BEHANDLUNG | vor und nach der Behandlung | |
|------------------------------|-----------|---|--|---|-----------------------------|--------------|
| | | | | | 1 | 2 (Tage) |
| BACTIMOS WP (6000 ITU/mg) | 0,1 kg/ha | Erlenbruchwald 19,5 m ² /0,15 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 109 | 22 (79,8) | 0 (100) |
| TEKNAR WP (5800 ITU/mg) | 0,1 kg/ha | Erlenbruchwald 18,2 m ² /0,15 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 57 | 43 (24,6) | 5 (91,2) |
| VECTOBAC WP (3600 ITU/mg) | 0,1 kg/ha | Erlenbruchwald 16 m ² /0,1 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 131 | 119 (9,2) | 67 (48,9) |
| BACTIMOS WP | 0,2 kg/ha | Erlenbruchwald 18 m ² /0,1 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 62 | 3 (95,2) | 0 (100) |
| TEKNAR WP | 0,2 kg/ha | Erlenbruchwald 19,5 m ² /0,15 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 81 | 38 (53,1) | 3 (96,3) |
| VECTOBAC WP | 0,2 kg/ha | Erlenbruchwald 24 m ² /0,15 m | Ae. cantans (L ₃ /L ₄) | 106 | 76 (28,3) | 1 (99,1) |
| TEKNAR WP | 0,1 kg/ha | Rheinauen 120 m ² /0,2 m | Ae. vexans (L ₂ - L ₄) | 130 | 95 (26,9) | 34 (73,9) |
| TEKNAR WP | 0,2 kg/ha | Rheinauen 120 m ² /0,2 m | Ae. vexans (L ₁ - L ₄) | 260 | 2 (99,2) | 0 (100) |
| BACTIMOS WP | 0,2 kg/ha | Rheinauen 80 m ² /0,2 m | Ae. vexans (L ₁ - L ₃) | 759 | 14 (98,2) | 2 (99,7) |

() = Sterberate in % L₁ · L₄ = Larvenstadien

Abb. 1: Wirksamkeit verschiedener Puder-Formulierungen von B.t.i. gegen Larven von Aedes vexans und Aedes cantans.

| PRODUKT | DOSIS | HABITAT Oberfläche/Tiefe | SPEZIES | ZAHL DER LARVEN/10 SCHÖPFPROBEN VOR DER BEHANDLUNG | vor und nach der Behandlung | | | |
|--------------------------------|--------|--|--|---|-----------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 (Tage) |
| TEKNAR 402 SC (1500 ITU/mg) | 1 l/ha | Rheinauen 225 m ² /0,2 m | Ae. vexans (L ₁ -L ₄) | 386 | 7 (98,2) | 1 (99,7) | 0 (100) | 0 (100) |
| TEKNAR 402 SC (1500 ITU/mg) | 1 l/ha | Erlenbruchwald 6,5 m ² /0,2 m | Ae. cantans (L ₂ -L ₃) | 100 | 62 (38) | 31 (69) | 8 (92) | 0 (100) |
| TEKNAR HP-D (3000 ITU/mg) | 1 l/ha | Erlenbruchwald 6,5 m ² /0,2 m | Ae. cantans (L ₂ -L ₃) | 186 | 2 (98,9) | 0 (100) | 0 (100) | 0 (100) |
| TEKNAR HP-D (3000 ITU/mg) | 1 l/ha | Erlenbruchwald 12 m ² /0,3 m | Ae. cantans (L ₃) | 312 | 53 (83,1) | 16 (94,9) | 6 (98,1) | 1 (99,7) |
| VECTOBAC · AS (600 ITU/mg) | 1 l/ha | Erlenbruchwald 11,2 m ² /0,3 m | Ae. cantans (L ₃) | 328 | 241 (26,5) | 51 (84,5) | 44 (85,6) | 5 (98,5) |

() = Sterberate in % L₁ · L₄ = Larvenstadien

Abb. 2: Wirksamkeit verschiedener Flüssig-Formulierungen von B.t.i. gegen Larven von Aedes vexans und Aedes cantans.

Eine Applikationsrate von 200 g der Puder-Formulierungen ergab in den Freilandtests eine 100 %ige oder nahezu 100 %ige Mortalitätsrate. Bei den Flüssigkonzentraten zeigte besonders die neue Formulierung TEKNAR HP-D, ein Produkt auf der Basis einer asporogenen Mutante von B.t.i., bei einer Dosis von 1 Liter/ha ausgezeichnete Ergebnisse. Als Ergebnis dieser Tests werden für die Routinebekämpfung mit der 5-Liter-Rückenspritze folgende Dosierungen empfohlen:

Gegen Erst- und Zweitlarven werden 250 g und gegen die unempfindlicheren Dritt- und Viertlarven oder bei tieferem Wasserkörper werden 500 g BACTIMOS-Puder in 10 Liter gefiltertem Tümpelwasser suspendiert und auf einem Hektar Wasserfläche ausgebracht.

Bei der Verwendung der Flüssigformulierung wird ein Liter TEKNAR HP-D in 9 Liter gefiltertem Tümpelwasser suspendiert und auf einem Hektar Wasserfläche ausgebracht.

Eine nahezu vollständige Umstellung der Bekämpfung auf die mikrobiologische B.t.i.-Methode ist nur dann möglich, wenn ein geeignetes B.t.i.-Granulat für eine Anwendung mit dem Hubschrauber bei Unbegebarkeit des Geländes zur Verfügung steht. Daher wurden verschiedene B.t.i.-Granulate auf der Basis von Maiskolbenbruch sowie ein B.t.i.-Bims-Granulat (eine technische Formulierung auf der Basis einer asporogenen Mutante von der BASF) getestet (Abb. 3).

| PRODUKT | DOSIS | HABITAT Oberfläche/Tiefe | SPEZIES | ZAHL DER LARVEN/10 SCHOPFPROBEN vor und nach der Behandlung | | | |
|----------------------------|----------|---|---|---|-------------|--------------|-------------|
| | | | | VOR DER BEHANDLUNG | 1 | 2 | 3 (Tage) |
| TEKNAR G (260 ITU/mg) | 8 kg/ha | Erlenbruchwald 135 m ² /0,1 m | Ae.cantans Cu.morsitans (L ₁ -L ₃) | 130 | 109 (16) | 48 (63) | 29 (78) |
| TEKNAR G (260 ITU/mg) | 12 kg/ha | Erlenbruchwald 5 m ² /0,1 m | Ae.cantans Cu.morsitans (L ₁ -L ₃) | 912 | 54 (94) | 14 (98.5) | 0 (100) |
| TEKNAR G (260 ITU/mg) | 15 kg/ha | Erlenbruchwald 8,8 m ² /0,2 m | Ae.cantans (L ₂ -L ₄) | 224 | 96 (57) | 25 (89) | 8 (96) |
| TEKNAR G (260 ITU/mg) | 12 kg/ha | Rheingauen* 7000 m ² /0,2 m | Ae.vexans (L ₂ -L ₄) | 510 | 41 (92) | 24 (95) | - |
| BACTIMOS G (175 ITU/mg) | 12 kg/ha | Erlenbruchwald 100 m ² /0,5 m | Ae.cantans (L ₁ -L ₄) | 224 | 220 (2) | 182 (19) | 61 (73) |
| BACTIMOS G (175 ITU/mg) | 15 kg/ha | Erlenbruchwald 8,8 m ² /0,2 m | Ae.cantans (L ₂ -L ₄) | 163 | 125 (24) | 25 (85) | 29 (82) |
| VECTOBAC G (300 ITU/mg) | 8 kg/ha | Erlenbruchwald 40 m ² /0,1 m | Ae.cantans (L ₁ -L ₄) | 85 | - | 29 (66) | 7 (92) |
| VECTOBAC G (300 ITU/mg) | 12 kg/ha | Erlenbruchwald 180 m ² /0,8 m | Ae.cantans (L ₁ -L ₄) | 461 | 147 (68) | 17 (96) | 14 (97) |
| BTI- Bims - G | 8 kg/ha | Erlenbruchwald 54 m ² /0,1 m | Ae.cantans Cu.morsitans (L ₂ -L ₄) | 100 | 5 (95) | 0 (100) | 0 (100) |
| BTI- Bims - G | 12 kg/ha | Erlenbruchwald 100 m ² /0,5 m | Ae.cantans Cu.morsitans (L ₂ -L ₄) | 564 | 30 (95) | 0 (100) | 1 (99.8) |

() = Sterberate in %

* Applikation mit dem Hubschrauber

L₁ - L₄ = Larvenstadien

Abb. 3: Wirksamkeit verschiedener B.t.i.-Granulate gegen Stechmückenlarven im Oberrheingebiet.

Bei einer Aufwandmenge von 12 - 15 kg/ha kommerziellem Granulat wurde in der Regel eine nahezu 100 %ige Mortalitätsrate nach 2 Tagen erreicht. Als besonders aktiv zeigte sich die technische Granulatformulierung der BASF, die bereits bei einer Aufwandmenge von 8 kg/ha 100 % Mortalität ergab. Dieses vielversprechende Granulat zeigt vor allem aufgrund seines günstigen spezifischen Gewichtes gute Schwimmeigenschaften.

Da kein kommerzielles B.t.i.-Granulat in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde von den Mitarbeitern der KABS im Jahre 1982 ein Granulat auf der Basis von Quarzsand (Korngröße: 0,9 - 2 mm), Sonnenblumenöl und B.t.i.-Puder entwickelt.

Für die Routinebekämpfung mit dem Hubschrauber - ausgerüstet mit einem Simplex-Streugerät - werden 50 kg Quarzsand, 1,4 Liter Pflanzenöl und 1,8 kg B.t.i.-Puder in einer Betonmischmaschine gemischt. Diese Mischung reicht für die Behandlung von 3 ha Wasserfläche aus, wenn Erst- bis Drittlarven auftreten; bei Viertlarven muß die Dosis verdoppelt werden.

Inaktivierung der Bacillus-Sporen: Damit die Gewässer nicht mit lebenden Bazillussporen befrachtet werden und um hygienische Bedenken restlos auszuräumen, werden alle B.t.i.-Präparate einer Gamma-Bestrahlung mit einer Co-60-Quelle ausgesetzt (Wasserschutzgebietsauflage des Bundesgesundheitsamtes).

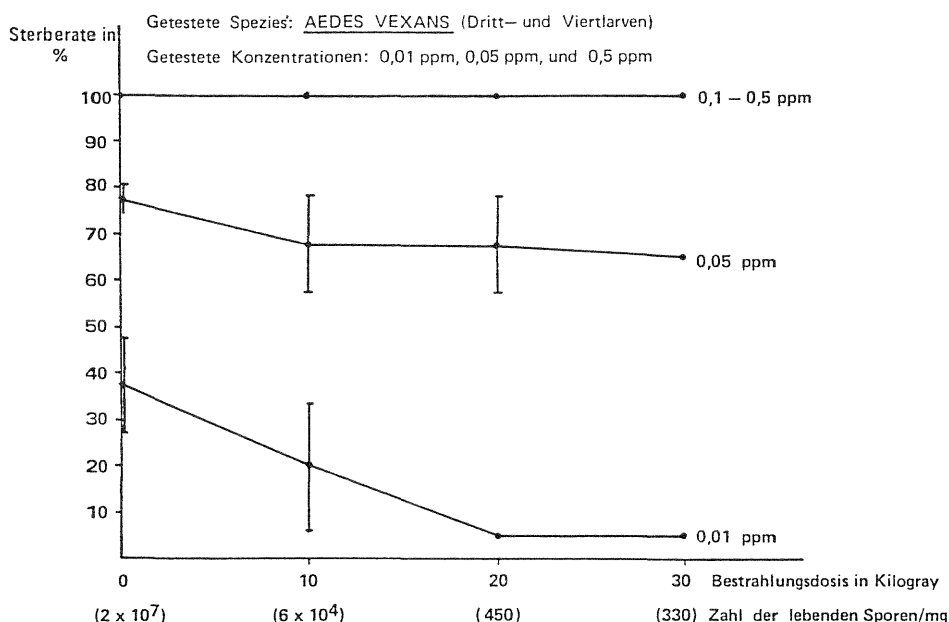


Abb. 4: Einfluß der Gammabestrahlung (Co 60) auf die Wirksamkeit von B.t.i.-Puder (Bactimos WP).

In Labortests wurde B.t.i.-Puder, das verschiedenen Bestrahlungsdosen ausgesetzt war und dessen Sporenzahl um nahezu 100 % reduziert wurde, auf seinen Aktivitätsverlust getestet. Die Ergebnisse beweisen, daß die Aktivität des B.t.i.-Puders durch die Gamma-Bestrahlung zwar geringfügig reduziert wird, daß aber bei einer Aufwandsmenge von 0,1 ppm selbst bei einer Bestrahlungsdosis von 30 Kilogray noch eine Mortalitätsrate von 100 % erreicht wird (Abb. 4).

Für die Routineeinsätze wird das B.t.i.-Material einer Gammabestrahlung mit 28 Kilogray unterzogen.

Eine Möglichkeit, hygienische Bedenken auch ohne Sporeninaktivierung auszuräumen, besteht darin, daß geeignete sporenlöse (asporogene) B.t.i.-Mutanten Verwendung finden.

Bekämpfungsumfang: Die Abb. 5 gibt einen Überblick über die behandelten Flächen sowie den Mittelverbrauch in den Jahren 1980 bis 1986. Insgesamt wurden in den vergangenen 5 Jahren ca. 16 000 ha erfolgreich mit B.t.i. behandelt. Dabei wurden ca. 8 000 kg BACTIMOS-Puder und 8 000 Liter B.t.i.-Flüssigkonzentrat verbraucht. In den Jahren 1983 bis 1986 wurden mit dem Hubschrauber ca. 114 Tonnen B.t.i.-Sand-Granulat auf einer Fläche von ca. 5 000 ha während einer Flugzeit von ca. 450 Stunden appliziert.

| BEKÄMPFUNGSJAHR | 1980 | 1981 | 1982 | 1983 | 1984 | 1985 | 1986 | GESAMTFLÄCHE (ha) |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| <u>BEHANDELTE FLÄCHE (ha)</u> | | | | | | | | |
| mit LIPAROL | 1 800 | 2 500 | 1 100 | 650 | 15 | 40 | 100 | 6 205 |
| mit LIPAROL-GRANULAT | 1 800 | 400 | 600 | 60 | - | 5 | 6 | 2 871 |
| mit BTI - GRANULAT | - | - | - | 1 200 | 1 030 | 800 | 2 300 | 5 330 |
| mit BTI - PUDER/KONZENTRAT | - | 140 | 1 400 | 2 100 | 2 250 | 3 000 | 2 140 | 11 030 |
| GESAMTFLÄCHE | 3 600 | 3 040 | 3 100 | 4 010 | 3 295 | 3 845 | 4 546 | 25 436 |
| <u>VERBRAUCH</u> | | | | | | | | |
| LIPAROL (Liter) | 13 500 | 19 000 | 8 000 | 4 000 | 130 | 450 | 900 | 45 980 ltr. |
| LIPAROL - GRANULAT (kg) | 90 000 | 20 500 | 29 000 | 3 000 | - | 250 | 300 | 143 050 kg |
| BTI - SAND - GRANULAT (kg) | - | - | - | 21 000 | 20 500 | 27 000 | 46 000 | 114 500 kg |
| BTI - PUDER (kg) | - | - | - | 1 520* | 1 800* | 2 400* | 2 600* | 8 320 kg |
| BTI - FLÜSSIGKONZENTRAT (ltr) | - | 300 | 4 100 | 2 600 | 100 | 200 | 620 | 7 920 ltr. |
| BTI - BRIKETS (Stückzahl) | - | - | - | - | - | 20 000 | 34 000 | 54 000 Stück |

* = BTI - Pudermenge, die für die BTI-SAND-GRANULAT-Herstellung und bei der Zuluß-Bekämpfung verbraucht wurde.

Abb. 5: Übersicht über die behandelte Fläche und den Mittelverbrauch.

Nur noch in Ausnahmefällen, wenn beispielsweise bereits Stechmückenpuppen auftreten, gegen die B.t.i. nicht wirken kann, wird Liparol als "Feuerwehrmittel" im Rahmen des integrierten Bekämpfungsprogramms eingesetzt.

Neben den ökologischen erbrachte die B.t.i.-Methode besonders auch ökonomische Vorteile. Während die Behandlung einer Hektars Wasserfläche mit Liparol (flüssig) 63,-- DM und mit Liparol-Granulat immerhin 160,-- DM kostet, belaufen sich die Kosten für den B.t.i.-Bekämpfungsstoff bei der Anwendung von Puder nur auf 31,-- DM, bei B.t.i.-Sand-Granulat auf 38,-- DM. Insgesamt konnten die Kosten für die Bekämpfung durch den Einsatz von B.t.i.-Präparaten um mehr als 50 % gesenkt werden. Mit einem Kostenaufwand von ca. 700 000,--DM kann heute die KABS mehr als 2 Millionen Menschen in ihrem Einzugsgebiet vor einer Stechmückenplage bewahren.

Ein weiterer entscheidender Vorteil der B.t.i.-Methode ist, daß eine Bekämpfung in allen Larvenstadien möglich ist, während Liparol im wesentlichen nur Puppen und teilweise Viertlarven abtötet. Dadurch steht für die Bekämpfung insgesamt mehr Zeit zur Verfügung.

Bekämpfungserfolg: Zum einen wird durch Schöpfproben vor der Behandlung sowie 24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung die Dichte des Stechmückenbesatzes bzw. die Mortalitätsrate festgestellt. Zum anderen werden nach Abschluß der Bekämpfungsmaßnahmen Stechaktivitätsmessungen vorgenommen.

Werden Stechaktivitätsmessungen in von der Struktur her ähnlichen Gebieten, während vergleichbarer klimatischer Bedingungen und nahezu gleichzeitig, jedoch in behandelten und in unbehandelten Gebieten vorgenommen, so kann der Vergleich der Meßergebnisse eine Aussage über den Bekämpfungserfolg zulassen.

Diese Messungen haben ergeben, daß in den letzten Jahren von den Mitarbeitern der KABS vor allem durch den B.t.i.-Einsatz mehr als 90 % der Stechmückenpopulation abgetötet wurden (z.B. Messung am 18.06.85: unbehandeltes Gebiet im Auwald bei Lampertheim - 350 Anflüge/2 Min.; behandeltes Gebiet im Auwald bei Ketsch - 2 Anflüge/2 Min.).

Dadurch wurde verhindert, daß die Stechmücken aufgrund ihrer Massenentwicklung aus den Auwäldern in die umliegenden Gemeinden einwanderten und dort wie in früheren Jahren zur Plage wurden.

Obwohl die immer nur saisonal auftretenden Stechmücken erfolgreich bekämpft werden, wird die Nahrungsgrundlage von Vögeln (z.B. den Schwalben- oder Schnäpperarten) nicht beeinträchtigt, da die stechmückenähnlichen, aber nicht stechenden Zuckmücken, die ihre Massenbrutplätze in verschlammten permanenten oder semipermanenten Gewässern - also außerhalb der Stechmückenbrutgewässer - haben, nicht von den Stechmückenbekämpfungsmaßnahmen betroffen werden. Sie stehen nach wie vor als Larven und Puppen vielen Fischen und als Fluginsekten den insektenvertilgenden Vögeln zur Verfügung - übrigens auch dann, wenn die Stechmücken aus klimatischen Gründen, z.B. beim Ausbleiben des Hochwassers, nicht zur Entwicklung kommen.

Die Bekämpfung der Hausmücken (Culex pipiens)

Die Bekämpfung der Hausmücken muß ebenfalls an den Brutplätzen ansetzen, wo die Brut konzentriert vorkommt. Die Bekämpfung der Hausmücken fällt in den Zuständigkeitsbereich jedes einzelnen Hausbesitzers, der auf seinem Anwesen dafür Sorge zu tragen hat, daß alle unnötigen Wasserbehälter beseitigt oder so abgedeckt werden, daß die Stechmückenweibchen ihre Eier nicht mehr auf die Wasseroberfläche ablegen können.

Auch bei der Behandlung der Hausmückenbrutstätten empfiehlt sich die Anwendung von B.t.i. Mit einer schwimmfähigen B.t.i.-Formulierung, den sogenannten B.t.i.-Briketts, kann bei einer Aufwandmenge von einem Brikett/0,2 m² - das entspricht etwa der Wasseroberfläche eines normalen Regenfasses - eine mehrwöchige Wirkung erzielt werden.

In den Jahren 1985 und 1986 wurden in den Mitgliedsgemeinden der KABS ca. 55 000 B.t.i.-Briketts kostenlos an die Hausbesitzer verteilt und mit großem Erfolg eingesetzt.

DAS ONCHOZERKOSE-BEKÄMPFUNGSPROGRAMM (OCP) IN WESTAFRIKA

Im Jahre 1974 startete die WHO im Ober-Volta-Becken in Westafrika ein Programm zur Bekämpfung der Onchozerkose, dem die Staaten Elfenbeinküste, Ober-Volta, Mali, Ghana, Togo, Benin und Niger angehören. Dort zeigt die Onchozerkose weltweit wohl die tiefgreifendsten sozialen und ökonomischen Auswirkungen, da in der Flußlandschaft des Ober-Volta-Beckens mindestens eine Million Menschen an dieser Krankheit leiden und mehr als 100 000 Menschen daran erblindet sind (KNUTTI, 1983).

Die Onchozerkose: Die 60 - 70 cm langen, weiblichen Würmer von Onchocerca volvulus siedeln sich nach der Infektion im Unterhautbindegewebe an, wo es häufig zu einer Knotenbildung kommt. Nach der Begattung der weiblichen Würmer durch die 2 - 4 cm langen männlichen Würmer gebärt ein einzelner weiblicher Wurm während seines Lebens - das ca. 15 Jahre währen kann - mehrere Millionen kleine Larven, die sogenannten Mikrofilarien. Die Mikrofilarien wandern aus den Knoten in das Unterhautbindegewebe, u.a. auch in die Augen, wo sie zu Hornhauttrübungen, Irisentzündungen und letztlich zur Erblindung führen können. Beim Blutsaugen an einem infizierten Menschen nehmen die Kriebelmückenweibchen Mikrofilarien auf, die sich in den Mücken zu infektiösen Wurmlarven entwickeln. Beim erneuten Blutsaugen der Mücken, z.B. an einem gesunden Menschen, dringen die Wurmlarven in das Hautgewebe ein und führen so zu einer neuen Infektion.

Nach der Blutmahlzeit bilden die Kriebelmückenweibchen die Eier aus und legen sie an Fließgewässern ab. Die geschlüpften Larven filtern mit einer Mundbürste kleine Schwebstoffe aus dem vorbeifließenden Wasser aus und entwickeln sich in dem Fließgewässer über 7 Larvenstadien (Dauer etwa 9 Tage in den Tropen) und ein Puppenstadium bis zum Fluginsekt.

Bekämpfung: Bei der Bekämpfung der Onchozerkose kann nur eine Bekämpfung der Kriebelmücken im Larvenstadium auf Dauer erfolgreich sein, da sich die Fluginsekten sehr weitflächig verteilen und eine umfassende medikamentöse Behandlung der Knäueifilarie nicht möglich ist. Nachdem von 1950 - 1970 vorwiegend mit DDT - mit all den bekannten Nachteilen - bekämpft wurde, setzt man seit 1974 im OCP-Programm das Organophosphat "Temephos" ein. Wöchentlich wird mit 9 Hubschraubern und 2 Flugzeugen auf einer Fläche von 764 000 km² eine Flußstrecke von insgesamt 18 500 km während der Regenzeit und 10 000 km während der Trockenzeit behandelt, indem im Abstand von einigen Kilometern das Insektizid in die Flüsse mit Brutstätten der Kriebelmücken gespritzt wird. Bereits nach kurzer Zeit wurden die Kriebelmückenlarven in etwa einem Viertel des Bekämpfungsgebietes resistent gegen Temephos. Nach der Durchführung von Pilotversuchen mit B.t.i. in den Jahren 1980/81 wird seit 1982 TEKNAR im Routineverfahren in den Gebieten mit Resistenz eingesetzt. In den zurückliegenden Jahren wurden jährlich bis zu 300 000 l TEKNAR mit großem Erfolg appliziert. Besonders der Einsatz von TEKNAR HP-D im Jahre 1986 zeigte wegen der verbesserten Aktivität (statt 1500 ITU jetzt 3000 ITU) ausgezeichnete Ergebnisse. Zum einen kann mit weniger Bekämpfungsmittel die erforderliche Konzentration in Abhängigkeit von der Wasserführung eingestellt werden, zum anderen sinkt wegen der verbesserten Formulierung der B.t.i.-Wirkstoff aufgrund seiner besseren Schwebfähigkeit weniger schnell ab und steht so über eine längere Flußstrecke den Kriebelmückenlarven zur Verfügung. Während bei TEKNAR 402 SC bereits nach 5 km die Wirkung stark nachließ, wirkt TEKNAR HP-D auf einer Flußstrecke von ca. 15 km. Mittelverbesserungen hinsichtlich Aktivität und Formulierung werden die Anwendung von B.t.i.-Präparaten in Zukunft noch effektiver und damit ökonomischer gestalten.

Bekämpfungserfolg:

Neuere Untersuchungen beweisen, daß nach der Einführung des Onchozerkose-Bekämpfungsprogramms kaum noch Neuinfektionen aufgetreten sind. Von 6 000 untersuchten Kindern, die nach 1974 geboren wurden, war nur ein Kind an Onchozerkose erkrankt (GUILLET, persönliche Mitteilung). Dieser große Erfolg ist erst durch den Einsatz von B.t.i. ermöglicht worden.

Schlußbemerkungen:

Dank B.t.i. ist am Oberrhein nicht nur eine erfolgreiche biologische Stechmückenbekämpfung möglich, sondern auch ein ökologisch vertretbarer Kompromiß zwischen den Belangen des Menschen und eines zeitgemäßen Umweltschutzes. Gleiches gilt für die Bekämpfung der Kriebelmückenlarven im Raum Düren/Jülich (Rur), wo in mehreren Fließgewässern wie Rur, Mühlenteiche, Inde und Ellebach etwa 1 000 l TEKNAR HP-D erfolgreich eingesetzt wurden (GRUNEWALD, RUTSCHKE und DESCHLE, persönliche Mitteilung). Ohne Beeinträchtigung des Ökosystems wurde so verhindert, daß, wie z.B. 1979, mehr als 50 Rinder starben und hunderte von Personen wegen starker Schwellungen nach Kriebelmückenstichen ambulant behandelt werden mußten.

Die Notwendigkeit der B.t.i.-Anwendung in den Subtropen und Tropen gegen Stech- und Kriebelmücken als Überträger gefährlicher Infektionskrankheiten wird in dem Maße zunehmen, wie sich Resistenz gegen herkömmliche Bekämpfungsmittel ausbilden wird.

Literatur:

- BARJAC de, H., 1981. Identification of H-serotypes of Bacillus thuringiensis, pp. 35-43. In: H. D. BURGESS (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980. Academic Press, London.
- BECKER, N., LUDWIG, H.W., SCHNETTER W., WEISSER, C., 1985. Praktische Schädlingsbek., 37 (5), 1 - 6.
- GOLDBERG, L.H., MARGALIT, J., 1977. Mosq. News 37: 355 - 358.
- GRATZ, N.R., 1985. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1 (3), 273 - 278.
- KNUTTI, H.J., 1983. Sandoz-Bulletin 65.
- KRIEG, A., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., SCHNETTER, W., 1983. Zschr. angew. Entom., 96, 500 - 508.
- KRIEG, A., 1986. Acta phytomedica, 10, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin und Hamburg.
- LACEY, L.A., UNDEEN, A.H., 1986. Ann. Rev. Entomol. 31, 265 - 296.
- SCHNETTER, W., ENGLER-FRITZ, S., ALY, C., BECKER, N., 1983. Mittlg. dtsh. Ges. allg. angew. Entom., 3, 17 - 26.

A.M. HUGER, A. KRIEG, G.A. LANGENBRUCH, W. SCHNETTER

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

Discovery of a new strain of *Bacillus thuringiensis*,
effective against Coleoptera

Entdeckung eines neuen Stammes von *Bacillus thuringiensis*,
der gegen Käfer wirksam ist

Zusammenfassung

Im Rahmen unserer laufenden diagnostischen Untersuchungen konnte aus einer Puppe des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) erstmals ein Stamm von *Bacillus thuringiensis* isoliert werden, der im Gegensatz zu den bisher bekannten *B. thuringiensis*-Stämmen nicht gegen Lepidopteren (Pathotyp A) oder Dipteren (Pathotyp B), sondern gegen Coleopteren (neuer Pathotyp C), vor allem gegen Chrysomeliden wirksam ist. Das neue *B. thuringiensis*-Isolat BI 256-82 zählt zum H-Serotyp 8a8b; es wurde als *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* beschrieben. Charakteristisch für dieses Isolat sind die bisher einmaligen plattenförmigen parasporalen Proteinkristalle (Delta-Endotoxin) mit einem MG von 68 000 (SDS-PAGE). Sie lösen sich sowohl in Alkali (pH >10) als auch in gesättigten Salzlösungen (z.B. NaBr, pH 7). Das so gelöste Kristallprotein ist in toxischer Form rekristallisierbar. Die Kristalle weisen im Dünnschnitt eine

Gitterkonstante von 7 nm auf. Ihre Synthese im Sporangium erfolgt außerhalb des Exosporiums. Nicht selten werden zwei Kristalle pro Sporangium gebildet. Von besonderem praktischem Interesse ist die Wirksamkeit von B.t. subsp. tenebrionis gegen Larven des Kartoffelkäfers (Leptinotarsa decemlineata), deren Mitteldarmepithel nach peroraler Aufnahme von Sporen und Kristallen durch Toxineinwirkung zerstört wird. Im standardisierten Biotest liegt die LD₅₀ der L₁-Stadien bei 11 000 Sporenäquivalenten. Ältere Larven sind weniger empfindlich. So beträgt die LC₅₀ bei L₁ 3×10^6 und bei L₃ 9×10^7 Sporenäquivalente/ml. In Feldversuchen ergaben wiederholte Behandlungen der Versuchsflächen mit 3×10^{10} Sporenäquivalenten/qm gute Bekämpfungserfolge gegen Junglarven. Kartoffelkäfer stellen auf Pflanzen, die mit B.t. subsp. tenebrionis kontaminiert sind, Fraß und Eiablage ein. Dieser Effekt ist auf unbehandeltem Blattmaterial reversibel.

Der kürzlich in den USA als B.t. var. san diego beschriebene käferwirksame B. thuringiensis-Stamm weist die für unseren B.t. subsp. tenebrionis charakteristischen und varietätsspezifischen Eigenschaften auf.

Introduction

During the last decades insect pathology has developed as a distinct discipline of entomology and, moreover, has become an element in the science of pathology. The rapid development of this new scientific branch is vitally connected with the steadily increasing attention paid to diagnosis of insect diseases. Edward A. STEINHAUS, one of the most distinguished promoters of

modern insect pathology, underlined that diagnosis is a central pillar of insect pathology (STEINHAUS, 1964). Increasing knowledge in that discipline, in turn, was an indispensable prerequisite for the remarkable progress achieved so far in microbial control of harmful insects, in agriculture, forestry, and recently also with insects of public health importance. Undoubtedly, in this connection the accomplishments in diagnosis, basic research, and practical exploitation of members of the Bacillus thuringiensis (B. t.) group deserve primary attention. Initially (BERLINER, 1911) and for many years only strains of B. thuringiensis were isolated that are effective against Lepidoptera (Pathotype A). World-wide diagnostic efforts to find B. thuringiensis strains with toxic activity against insects of other taxonomic groups were successful in the seventies when the prototype of B. thuringiensis sub-spec. israelensis was detected (GOLDBERG and MARGALIT, 1977). This B. thuringiensis strain is highly toxic to larvae of nematoceros dipterans, such as mosquitoes and blackflies, but not to lepidopteran species (Pathotype B). Within the frame of the diagnostic research established in our Institute in Darmstadt a further breakthrough was achieved when the first coleopteran-specific strain of B. thuringiensis was isolated in 1982 (KRIEG et al., 1983). This new B. thuringiensis strain (BI 256-82) was detected in an accession of 15 dead pupae of the yellow mealworm Tenebrio molitor. These pupae had been sent to us to clarify whether they were infected by an iridescent virus. According to our diagnosis, none of these pupae was infected by this virus, yet one specimen harbored bacterial sporangia in which, in addition to the spore, there occurred parasporal crystals of an unusual morphology. No doubt, these findings justified detailed diagnostic studies with this bacterial organism in the very sense of STEINHAUS (1964). He emphasized that diagnostics is not only the taxonomic identification of a disease agent, 'rather it represents a basic approach to our understanding of disease'. With

this in mind, we have conducted studies on morphological, biochemical, and serological properties of our new B. thuringiensis isolate. Further investigations were pursued on its host range, pathology and histopathology, as well as on its utility in biological pest control. Our studies resulted in the description of Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis representing a new B. thuringiensis pathotype (pathotype C) (KRIEG et al., 1983). The results of investigations are reported here.

Morphological and structural characteristics of the pathogen

In the vegetative phase the rod-shaped cells of B. thuringiensis subsp. tenebrionis usually are motile. Their average size ranges between 4...6 μm in length and 1...1.3 μm in diameter. As is typical for members of the B. thuringiensis group, a proteinaceous parasporal crystal is produced concomitant with sporulation (Figs. 1 and 2). This crystal, however, displays a strikingly novel morphology. In contrast to the bipyramidal crystals of lepidopteran-pathogenic B. thuringiensis strains, and to the multiple globular crystals of the dipteran-specific B. thuringiensis subsp. israelensis, the parasporal crystals of B. t. subsp. tenebrionis appear as flat plates with quadrangular, rectangular or rhomboidal outline (Figs. 1B and 2). In general, their axes measure from 0.8...1.5 μm in length and from 0.7...1 μm in width. As seen in electron microscopy of thin cross sections, the thickness of the plates ranges from 0.15...0.25 μm , and their margins usually are pointed or roof-shaped (Figs. 2 and 3). Not infrequently, sporangia harbor two crystals of similar size either in parallel or serial locations (Figs. 3A and B). Thin sections of crystals further displayed their paracrystalline nature with a periodicity of the parallel lattice structures of 7 nm (Fig. 3C). As seen from

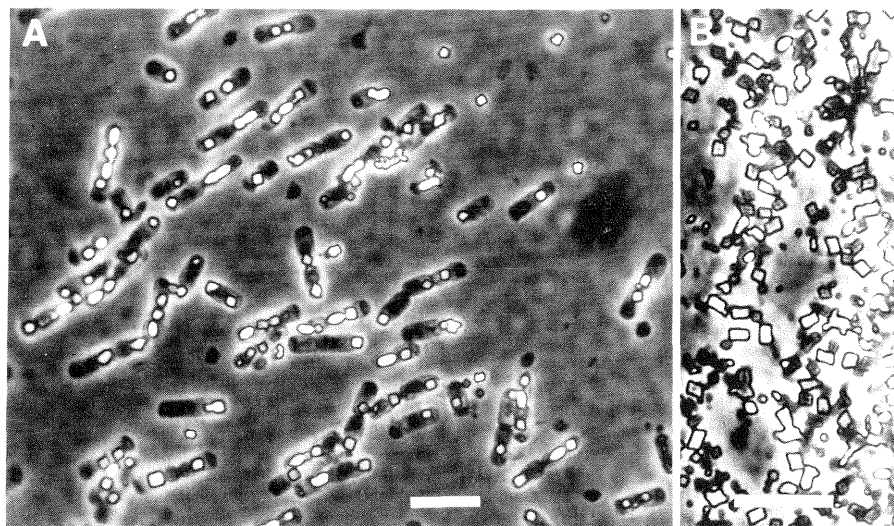


Fig. 1: Phase contrast light micrographs showing (A) sporangia with spores and parasporal crystals of Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis, and (B) a preparation of the flat, plate-shaped parasporal crystals. Bars in A and B = 8 μ m.

electron micrographs, parasporal crystal development is initiated during forespore formation. By the time the exosporium appears the crystals generally have reached their full size (Fig. 2A). They are located outside the exosporium (Fig. 2).

Serological and biochemical properties

Our coleopteran-specific strain of B.t. subsp. tenebrionis can be characterized by serological and biochemical features. According to deBARJAC (pers. comm.) it belongs to the H-serotype 8a8b, which also includes lepidopteran-specific B. thuringiensis strains (e.g. G 2 and Morrison) of pathotype A as well as the mosquito-specific strain PG 14 of pathotype B. Thus, with B. t. subsp. tenebrionis as representative for pathotype C, the B.thuringiensis strains of the H-serotype 8a8b can be assigned to three different pathotypes. In our comparative studies serological cross-reactions were not observed between the crystal antigens of B.t. subsp. tenebrionis and other B. thurin-

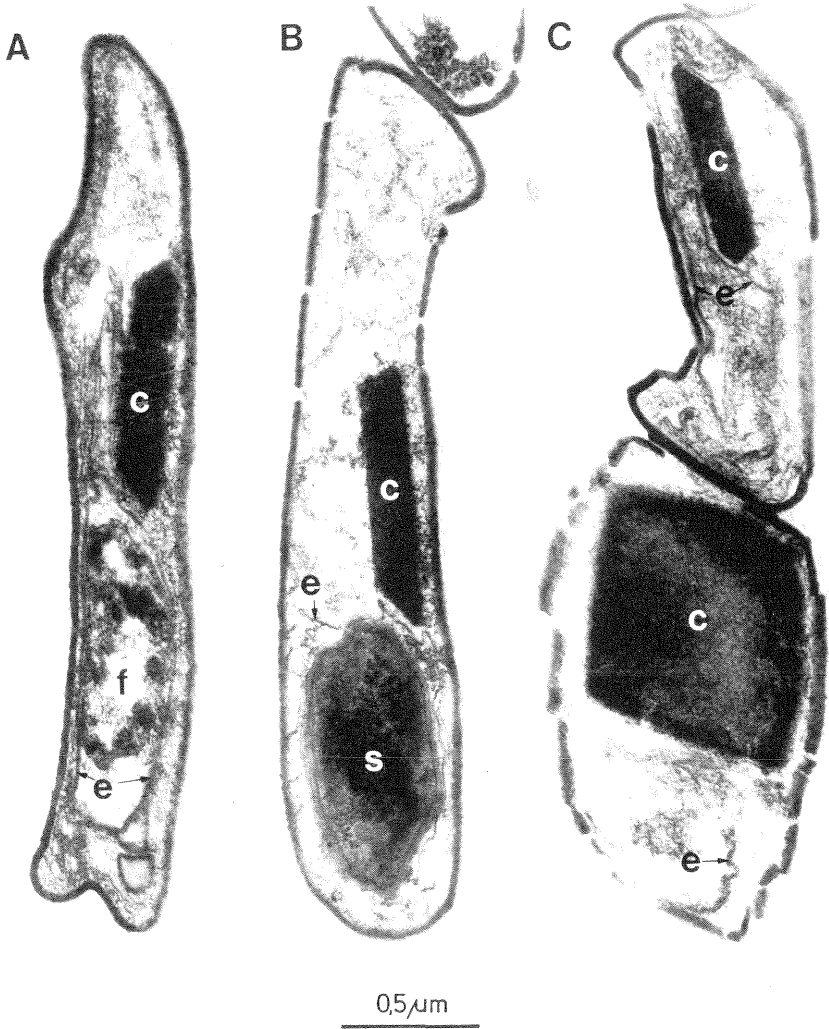


Fig. 2: Electron micrographs displaying thin sections of sporangia of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. (A) Longitudinal section of sporulating cell with forespore (f) and plate-shaped parasporal crystal (c) in cross section. (B) Longitudinal section of sporangium with mature spore (s) and plate-shaped parasporal crystal (c) in cross section. (C) Two sporangia with plate-shaped parasporal crystal (c) in cross (upper cell) and plane (lower cell) section; e = exosporium.

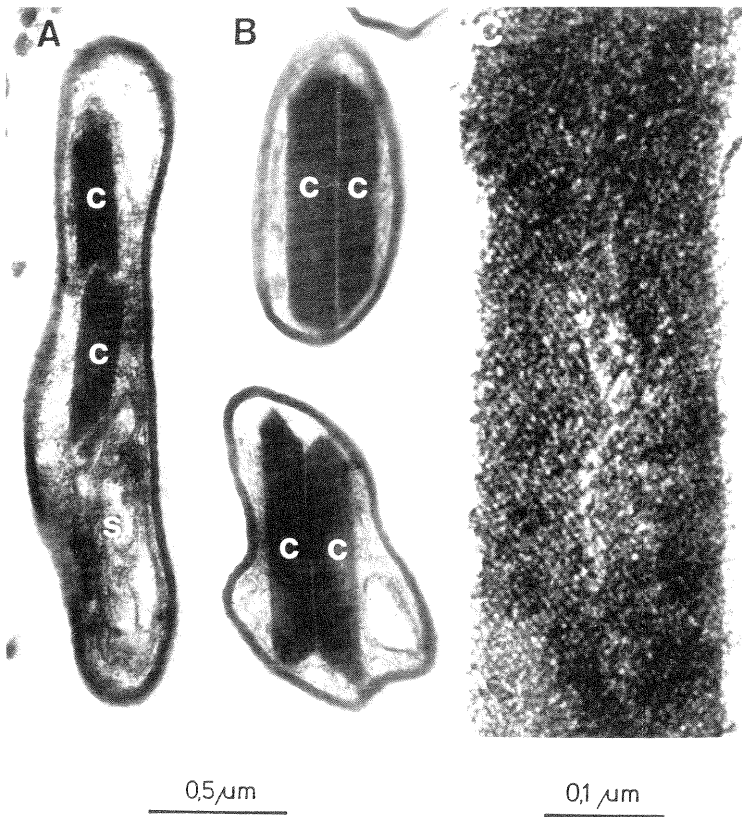


Fig. 3: (A) and (B): Electron micrographs of thin sections of sporangia of Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis; each sporangium harbors two parasporal crystals (c) either in serial (A) or parallel (B) locations. (C) Part of a cross section of a parasporal crystal in high magnification showing the parallel lattice lines of the paracrystalline protein.

giensis pathotypes. Further, KRIEG et al. (1986) found that B.t. subsp. tenebrionis as well as the B. thuringiensis strains G 2, Morrison, and B.t. subsp. tolworthi belong to O-serotype IX.

In biochemical studies with strains of H-serotype 8a8b only B.t. subsp. tenebrionis produced acid from mannose. In view of the envisaged practical use of this strain in biological control it is important to note that it does not produce B-exotoxin (KRIEG et al., 1983; 1986).

The unique parasporal crystals of B.t. subspec. tenebrionis are soluble in alkaline (pH 10 to 12.5) as well as in sodium dodecyl sulfate (SDS). Studies by BERNHARD (1986) revealed their solubility also in saturated aqueous salt-solutions, such as NaBr, KBr, and NaJ, at pH 7. Unlike the protein crystals of other B. thuringiensis strains, those of B.t. subspec. tenebrionis are solubilized in the absence of reducing agents. This suggests that their subunits are not linked by disulfide bridges. Again in contrast to other B. thuringiensis strains, the dissolved crystal protein can be recrystallized by dialysis against distilled water or, in the case of alkaline solutions, by lowering of the pH. By using SDS-PAGE, BERNHARD (1986) further found that the proteinaceous parasporal crystals are composed of subunits of MW 68,000. Also in this respect they clearly differ from the crystals of B. thuringiensis pathotypes A and B analyzed in the same study and by earlier workers (details in KRIEG, 1986). Yet all B. thuringiensis strains examined by BERNHARD (1986) exhibited a similar amino acid composition of their crystal proteins.

Host range and bioassay

Screening tests to evaluate the spectrum of insecticidal activity of B.t. subspec. tenebrionis were conducted using insects from different taxonomic groups. Surprisingly, only species of the order Coleoptera and especially the family Chrysomelidae proved to be susceptible to this B. thuringiensis strain, whereas lepidopteran and dipteran species were unaffected (Table 1).

In view of the general economic importance of the Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata) a standardized bioassay has been developed with larvae of this pest. The LD₅₀ of first instar larvae amounts to about 11,000 spore equivalents (RIETHMÜLLER, 1986). With increasing age, larvae become less sensitive to B.t. subspec. tenebrionis. Thus, when foliage is offered that has been contaminated by dipping into a B.thuringiensis suspension, the LC₅₀ of first instar larvae comes to 3×10^6 spore equivalents/ml, but the LC₅₀ of 3rd instar larvae amounts to 9×10^7 spore equivalents/ml.

Similar to the action of lepidopteran-specific B. thuringiensis strains, susceptible coleopteran larvae also stop feeding upon ingestion of spores and crystals within one day and finally die. It is interesting to note that adults

| Order | Family | Species | Activity |
|-------------|---------------|----------------------------------|----------|
| Coleoptera | Chrysomelidae | <u>Leptinotarsa decemlineata</u> | ++++ |
| | | <u>Agelastica alni</u> | +++ |
| | | <u>Pyrrhalta viburni</u> | +++ |
| | | <u>Plagiodera versicolor</u> | +++ |
| | | <u>Chrysomela herbacea</u> | ++ |
| | | <u>Gastrophysa viridula</u> | ++ |
| | | <u>Crioceris asparagi</u> | + |
| | | <u>Lilioceris lili</u> | + |
| | Coccinellidae | <u>Epilachna varivestis</u> | + |
| | Tenebrionidae | <u>Tenebrio molitor</u> | + |
| Lepidoptera | Phycitidae | <u>Ephestia kühniella</u> | - |
| | Plutellidae | <u>Plutella xylostella</u> | - |
| Diptera | Culicidae | <u>Aedes aegypti</u> | - |

Table 1. Insects tested for their susceptibility to Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis. Insecticidal activity was classified from weak (+) to strong (++++); (-) = no activity.

of the Colorado potato beetle stop feeding and egg-laying when they are exposed to contaminated leaves. If they are again offered untreated leaves, they usually resume their normal life functions. Cessation of feeding also occurred with treated adults of a curculionid, the black wine weevil (Otiorhynchus sulcatus), with subsequent low mortality.

As mentioned above, BERNHARD (1986) has shown that it is easy to recrystallize dissolved parasporal crystal protein. Bioassays in our Institute with crystals generated this way exhibited dose-dependent toxicity against larvae of the Colorado potato beetle (L. decemlineata) but not against larvae of the diamondback moth (Plutella xylostella).

Histopathology

Light microscope serial sections revealed that upon ingestion of the spore-crystal complex of B.t. subsp. tenebrionis drastic cytotoxic effects appear in the midgut tissues of susceptible coleopteran larvae. A sequence of similar cytopathological events was observed both in larvae of the blue alder leaf beetle (Agelastica alni) and the Colorado potato beetle (L. decemlineata). Destruction of the microvilli (Fig. 4A) is followed by swelling and progressive vacuolization of the columnar epithelial cells. The midgut epithelial layer loses its integrity as more and more cells detach from one another and from the basement membrane (Fig. 4B). Midgut paralysis is evident from circular muscle relaxation. Extensive bacterial growth resulting from germinated spores was observed in the midgut lumen of many larvae (Fig. 4B). The bacteria invade the disintegrated midgut epithelium and finally penetrate into the hemocoel, thus causing lethal septicemia. Yet death of larvae may also result without apparent bacteremia. Repeatedly, sporangia with spores and crystals were found in larval cadavers.

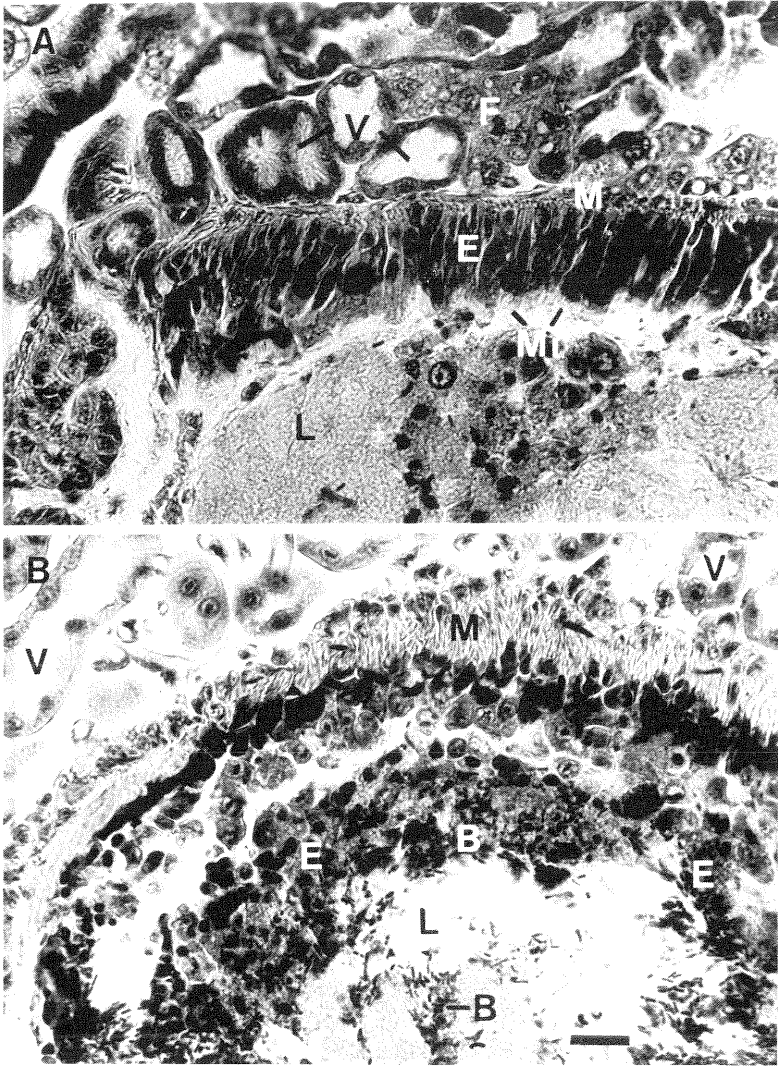


Fig. 4: Light micrographs of paraffin sections made from late first instar larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). The larvae had ingested potato leaves contaminated with a spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. (A) Destruction of the microvilli (Mi) in the initial phase of affection of the midgut epithelium (E) that still displays an intact layer of columnar cells; M = normal midgut muscularis. (B) Massive disintegration of the midgut epithelium (E) and detachment of affected columnar cells from the basement membrane. Midgut paralysis is evident from circular muscle relaxation (M). Vigorous proliferation of vegetative rods of *B.t.* subsp. *tenebrionis* (B) in the midgut lumen (L) and in the disintegrating epithelium (E). V = Vasa malpighi; F = Fat body. Stain: Hematoxylin Heidenhain-erythrosin. Bar = 20µm.

Field trials

To study the toxic activity of B. thuringiensis subsp. tenebrionis against the Colorado potato beetle under practical conditions, some field trials were carried out near Darmstadt in 1984 and 1985 (LANGENBRUCH et al, 1985). Different doses of unformulated spore-crystal preparations were applied with a knapsack sprayer to potato plots of 20 m² in 3 repetitions. A wetting agent was added.

From trials where plants were sprayed in the usual way it can be concluded that treatments with 3×10^{10} spore equivalents/m² lead to satisfactory control of young larval stages. Because of continuous infestation of the trial plots by beetles from the untreated area, and in order to protect the plants also from attack by the second pest generation, up to six applications were carried out in 1984.

In another trial comparative treatments with a special nozzle boom were included to improve spray coverage at the underside of leaves and throughout the plants. Besides the common vertical nozzle, this special nozzle boom was provided with two additional nozzles spraying the plants from both sides. With this modified application technique, the activity of treatments with 3×10^{10} spore equivalents/m² was extended from 5 to > 12 days. When a high dose ($2,5 \times 10^{11}$ spore equivalents/m²) was applied, even after 19 days the number of infested plants was still reduced by 80% as compared to the untreated control. In comparative treatments with the normal nozzle, infestations had decreased only by 45%. This increased efficacy obtained in B.t. applications with a special nozzle boom was certainly due to various factors such as improved spray coverage, better protection of B.t. from inactivation by UV radiation, and reduced loss caused by rain.

Subsequent to these field trials with unformulated spore-crystal preparations, trials with formulated preparations are under way to render this biocontrol measure more economical. In fact, preliminary results suggest that adequately formulated preparations are more effective.

The San Diego strain

Some years after we had detected the first coleopteran-specific strain B.t. subspec. tenebrionis, HERRNSTADT et al. (1986) from Mycogen Corporation, San Diego, California, USA, reported the isolation of a B. thuringiensis strain that also has toxic activity only against coleopteran insects, and not against lepidopteran or dipteran species. The authors did not refer to its derivation or source of isolation. Without mentioning any plausible scientific criteria that would justify the description of a new B. thuringiensis variety, they designated the strain B.t. var. san diego. Yet from the available information published we cannot recognize any substantial difference between the Mycogen B. thuringiensis strain and our B.t. subspec. tenebrionis. Both strains produce the characteristic plate-shaped parasporal crystals, and, in addition, have the same general pattern of activity. Also the toxic crystal protein of the Mycogen B. thuringiensis strain did not cross react immunologically with antiserum from lepidopteran-specific B. thuringiensis strains. Moreover, the Mycogen strain shares its H-serotype 8a8b with B.t. subspec. tenebrionis. Thus, the disclosed properties being essential for the taxonomic assignment of the coleopteran-specific Mycogen B. thuringiensis strain are identical with those of our B.t. subspec. tenebrionis.

Concluding remarks

With the detection of B. t. subspec. tenebrionis, a B. thuringiensis strain is available with completely novel morphological, biochemical, and toxicological properties of its parasporal crystals. In fact, it is the first B. thuringiensis strain that has insecticidal activity against a number of insects of the order Coleoptera, including the economically important Colorado potato beetle. Basic and practical investigations aimed at developing commercial biopreparations for control of susceptible coleopteran pests are being carried out at this time. In addition, studies are under way to explore the transfer of recombinant DNA coding for the coleopteran-specific crystal toxin.

Finally, the isolation of B.t. subspec. tenebrionis again shows that the natural reservoir of hitherto unknown pathogens is far from being exploited. The more we strengthen our diagnostic efforts, the greater is the chance to increase the potential in microbial pest control.

Literature

- BERLINER, E., 1911. Ztschr. ges. Getreidewesen (Berlin), 3, 63-70.
- BERNHARD, K., 1986. FEMS Microbiology Letters, 33, 261-265.
- GOLDBERG, L.J., MARGALIT, J.A., 1977. Mosquito News, 37, 355-358.
- HERRNSTADT, C., SOARES, G.G., WILCOX, E.R., EDWARDS, D.L., 1986. Bio/Technology, 4, 305-308.
- KRIEG, A., 1986. Acta phytomedica, 10, Parey, Berlin and Hamburg, 191 pp.
- KRIEG, A., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., SCHNETTER, W., 1983. Ztschr. angew. Entom., 96, 500-508.
- KRIEG, A., SCHNETTER, W., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A., 1986. Systematic and applied Microbiolgy. In press.
- LANGENBRUCH, G.A., KRIEG, A., HUGER, A.M., SCHNETTER, W., 1985. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 50/2a, 441-449.
- RIETHMÜLLER, U., 1986. Diploma thesis. Technical University, Darmstadt.
- STEINHAUS, E.A., 1964. Entomophaga, Colloqu. Internat. Pathol. Insectes, Paris 1962, Mémoire hors série No. 2, pp. 7-21.

P. LÜTHY

Mikrobiologisches Institut, Eidgenössisch Technische Hochschule
Zürich, Schweiz

Genetics and aspects of genetic manipulation of
Bacillus thuringiensis

Genetik des *Bacillus thuringiensis* und Möglichkeiten
der genetischen Manipulation

Zusammenfassung:

Genetische Untersuchungen an Bacillus thuringiensis haben zu Beginn dieses Jahrzehnts intensiv eingesetzt. B. thuringiensis-Stämme enthalten in der Regel zahlreiche Plasmide, deren Anzahl und Größe aber nur beschränkt mit der jeweiligen Subspecies übereinstimmen. Oft scheinen Neugruppierungen und Austausch von Plasmiden vorzukommen. Die Gene, welche für das Delta-Endotoxin (= Protoxin) kodieren (= Kristallproteingene), liegen mit wenigen Ausnahmen auf großen Plasmiden. In den Chromosomen kommen diese Gene selten vor.

Delta-Endotoxingene sind inzwischen in Escherichia coli und in Bacillus subtilis kloniert worden. Nukleotidsequenzen einiger Kristallproteingene und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind bekannt und erlauben einen Vergleich. Der durch proteolytische Aktivierung abgespaltene C-terminale Teil des Protoxins ist bei allen beschriebenen Sequenzen praktisch identisch. Homologie zeigt aber auch der N-terminale Teil des Polypeptids, von dem während der Aktivierung nur wenige Aminosäuren abgespalten werden. Eine hypervariable Region, die für die spezifische Aktivität massgebend sein könnte, liegt im C-terminalen Bereich des aktiven Toxinmoleküls.

Die Möglichkeit der Manipulation der Delta-Endotoxingene versucht man heute praktisch zu nutzen. Die Klonierung der Gene in Pflanzen und in solchen Mikroorganismen, die im Bereich der Nahrungsquellen von Schadinsekten vorkommen, strebt dahin das insektizide Polypeptid des B. thuringiensis direkt und kontinuierlich am Einsatzort zu produzieren.

1. Introduction

Genetic investigations belong to the most recent segments added to the long chain of research and development of Bacillus thuringiensis. Interest in the genetics of B. thuringiensis, primarily in the delta-endotoxin, started at the beginning of this decade. The progress was fast. The methodology and techniques acquired with Escherichia coli and Bacillus subtilis could be adopted for B. thuringiensis. In addition, enough information on the delta-endotoxin was already available when genetic studies were initiated. The protoxin, the polypeptide subunit of the crystal has a molecular weight in the range of 130 kDa. The active moiety is generated by limited proteolysis, reducing the protoxin to about half of its size. The activated toxin is very stable against further proteolysis. Crystal, protoxin, and toxin can be obtained in pure form which facilitates the production of polyclonal and monoclonal antibodies. Immunological assay systems are essential for genetic studies. Finally, insects which are very sensitive to the toxin are easily available for activity tests with genetically altered delta-endotoxins.

We may assume that the mode of action of the delta-endotoxins, including the one produced by the subspecies israelensis, is based on a uniform principle. Differences within the polypeptides and insect specific factors determine the insecticidal potency of the delta-endotoxins.

The literature on the genetics of B. thuringiensis has increased at such a rate which necessitates a limitation of the citation of references.

The majority of genetic investigations have been carried out with strains belonging to the subspecies kurstaki which is predominantly used for commercial production. Research groups in France have studied in great detail a strain berliner 1715 belonging to the subsp. thuringiensis. Research in the USSR includes strains of the subsp. galleriae.

2. Plasmids of Bacillus thuringiensis

Some recent reviews on the genetics and molecular biology of B. thuringiensis cover also the extrachromosomal elements (Lereclus, 1984; Carlton and Gonzalez, 1985; Aronson et al., 1986). B. thuringiensis strains can be extraordinarily rich in plasmids with sizes ranging from just over 1 Mdal to 150 Mdal. Strains harboring up to 12 plasmids have been reported. The selection of the appropriate method, especially for cell lysis, is important for the detection of the complete array of the plasmids (Fischer, 1983).

It is not known whether the abundance of extrachromosomal elements is a specific attribute of B. thuringiensis. Yoshimura et al. (1983) did not detect plasmids in four strains of the closely related species Bacillus cereus whereas the three B. thuringiensis strains contained numerous plasmids. Iizuka and Faust (1981) found a maximum of five plasmids in their B. cereus strains, a number which is still low compared to some B. thuringiensis isolates.

Several authors (e.g. Jarrett, 1983; Lereclus, 1984) have investigated whether the plasmid pattern correlated within strains of the same subspecies. Similarities existed, but diversities dominated. Therefore, number and size distribution of plasmids are not suitable characteristics to support existing classification systems. Carlton and Gonzalez (1985) concluded that the number and size of plasmids within B. thuringiensis are subject to continuous changes and rearrangements caused by events such as deletions, insertions and curing of whole plasmids, recombination with the chromosome as well as inter-cellular exchange of plasmids.

DNA homologies between plasmids of 11 B. thuringiensis strains were studied by Lereclus et al. (1982). Again, the diversity of the plasmid patterns between strains and subspecies was great. The authors used probes prepared from three strains of different subspecies. The number of plasmids

which showed homologies was considerable but did not follow any firm pattern in relation to the strains from which the probes were prepared.

3. Plasmids and the delta-endotoxin genes

The loss of crystal formation in B. thuringiensis cells is a frequent event which has been mentioned in many literature reports. This instability in conjunction with the fact that crystal deficient strains did not revert to delta-endotoxin producers, was a strong indication that the genes coding for crystal protein resided in plasmids. Zakharyan et al. (1976) presented the first evidence that plasmids were involved in the biogenesis of delta-endotoxin. Gonzalez et al. (1981) isolated acrySTALLIFEROUS mutants where the loss of delta-endotoxin production was correlated with the absence of specific plasmids. Final proof for the occurrence of delta-endotoxin genes on plasmids was presented by Schnepf and Whiteley (1981) who cloned a plasmid-born crystal protein gene in E. coli.

The distribution of delta-endotoxin genes within B. thuringiensis strains is as diverse as that of the plasmids. Kronstad et al. (1983) traced delta-endotoxin genes in 22 strains belonging to 14 subspecies. About one third of the strains contained a single plasmid which hybridized with the probe constructed from a cloned crystal protein gene. Other strains showed hybridization with more than one plasmid. For example, three delta-endotoxin genes can be present in HD-1 strains of the subspecies kurstaki. Multiple regions of homology on the same extrachromosomal element do also occur. Strains which did not produce the insecticidal metabolite contained no hybridizing DNA.

The occurrence of crystal protein genes is not restricted to plasmids. Klier et al. (1982), working with strain berliner 1715 (subsp. thuringiensis) identified a crystal protein gene on a plasmid as well as on the chromosome. In a strain of

B. thuringiensis subsp. dendrolimus the gene was only present in the chromosome.

Crystal protein genes are usually located on plasmids exceeding 30 Mdal (Kronstad et al., 1983). This is also true for B. thuringiensis subsp. israelensis where the loss of a 72 Mdal plasmid could be correlated with the failure to produce delta-endotoxin (Ward and Ellar, 1983).

Inverted repeat sequences which flank the B. thuringiensis crystal protein genes, have been detected and analysed by Kronstad and Whiteley (1984). It is very likely that these inverted repeats are responsible for the observed extensive recombination of crystal protein genes among plasmids and for the integration into the chromosome.

4. DNA transfer systems of Bacillus thuringiensis

Plasmids can be transmitted between B. thuringiensis strains by a conjugation-like process which requires close cell-to-cell contact (Gonzalez and Carlton, 1982). Following growth of donor and recipient strains in the same culture over 5 to 10 generations, up to 80% of the recipient cells had acquired one or more donor plasmids. Small and large plasmids were transmitted at the same frequencies. Carlton and Gonzalez (1985) have reviewed conjugation experiments which allowed size determination of plasmids containing crystal protein genes. Klier et al. (1983) succeeded in transmitting a recombinant plasmid with the delta-endotoxin gene from B. subtilis into an acrySTALLIFEROUS B. thuringiensis strain by the conjugation-like method. The same technique was applied for the introduction of a plasmid with a kurstaki gene into a strain of the subsp. israelensis. The recipient cells produced two parasporal bodies, one active against dipterous larvae and the other toxic against lepidopterous insects. Fischer et al. (1984) used the conjugation-like system to transfer plasmid pCl94 from one B. thuringiensis strain

to another, and between B. thuringiensis and B. subtilis in both directions. Conjugation experiments were also performed by Lereclus et al. (1983) with a plasmid pAM β 1 originating from Streptococcus faecalis.

Attempts to transform B. thuringiensis have yielded disappointing results. The transfer frequencies were 10^{-6} and lower (Miteva et al., 1981; Fischer et al., 1984). The latter authors were able to transform only five out of eleven B. thuringiensis strains with pC194, a Staphylococcus aureus plasmid, at frequencies between 10^{-6} to 10^{-8} whereas a B. subtilis strain, included in this study, was transformed at a rate 10^{-2} .

Transduction in B. thuringiensis has been reviewed by Carlton and Gonzalez (1985), and by Aronson et al. (1986). Several phage systems have been described for general transduction, suitable for the mapping of gene loci in B. thuringiensis (Lecadet et al. 1980; Aleshkin et al., 1980).

5. The delta-endotoxin genes

The first successful cloning and expression of a crystal protein gene in E. coli by Schnepf and Whiteley (1981) opened the door for structural and regulatory analysis. The cloned gene originated from a kurstaki HD-1-Dipel strain. Two other reports on cloning of the delta-endotoxin gene followed shortly after. Klier et al. (1982) cloned the gene from strain berliner 1715 in E. coli and B. subtilis. Held et al. (1982) used a kurstaki HD-1 strain and E. coli. In the meantime, cloning of delta-endotoxin genes has become a routine procedure.

Among the crystal protein genes which have been totally or partially sequenced we find three isolates from the subspecies kurstaki. Schnepf et al. (1985), and Thorne et al. (1986) determined the sequences of two genes of HD-1 strains. Adang et al. (1985) used a kurstaki HD-73 strain as starting point. Shibano et al. (1985) analysed a gene of a sotto strain whereas Chestukhina et al. (1986) published a part of a sequence from a crystal protein gene of an alesti strain.

The amino acid sequences deduced from the DNA code allow some interesting conclusions. The length of the structural genes correspond well with the obtained molecular weights for the protoxins. The approximately 1170 amino acids of the kurstaki crystal protein genes have a molecular weight of about 130 kDa. The C-terminal half is removed by limited proteolysis during the activation process, reducing the polypeptide to a stable moiety of 55 kDa to 70 kDa depending on the strain and on the activating proteases. Nagamatsu et al. (1984) determined that only 28 amino acids are removed from the N-terminus during activation. The C-terminal part contains practically all the lysine and cysteine residues (Shibano et al., 1985). The cysteine residues form the disulfide bridges which link the dimeric subunits and which account for the highly stable crystalline structure.

Basically, the crystal protein gene can be divided into conserved, variable and hypervariable regions. Great homology is found among the first 280 N-terminal amino acids and also among approximately 400 amino acids at the C-terminal end of the so far known sequences. Regions with some variability follow on both sides of the conserved sections. The last block of about 250 amino acids which links the variable regions, is hypervariable (Chestukhina et al., 1986). The hypervariability of this section is especially obvious between the gene HD-1-Dipel (Schnepf et al., 1985) and gene HD-73 (Adang et al, 1985) where practically no homologies exist. Chestukhina et al. (1986) found within the hypervariable region of their alesti gene blocks of amino acids which corresponded either with the HD-1-Dipel gene or with the HD-73 sequence.

Since the hypervariable region is located on the active moiety it may be assumed that differences in the specific bioactivity originate from here. This is most likely very interesting for recombinations that could result in increased potency or in altered activity spectra. Thus, the conserved

region of the toxin could be responsible for the general mode of action whereas the hypervariable part determines the specificity.

The present knowledge about the regulation of delta-endotoxin production has been comprehensively reviewed by Aronson et al. (1986). Promoter regions of several delta-endotoxin genes have been sequenced whereby identity existed among the genes isolated from plasmids. Homology continued for several hundred nucleotides 5' to the transcriptional start point. Three promoters were identified. One was recognized by E. coli, the other two by B. thuringiensis. Transcripts of the early sporulation phase mapped with the downstream promoter while transcripts of the upstream promoter appeared in the middle of the sporulation process. The promoter regions seem to be unique and they might require special forms of RNA polymerase which seem to be closely connected with the sporulation process. Aronson et al. (1986) assume that regulation involves not only gene dosage, unique promoter sequences and sigma units, but also other plasmid encoded factors. These might be located on plasmids which do not contain the protoxin gene. Evidence for this is presented for example by plasmid transfer experiments into B. cereus. Although the transcient cells contained the crystal protein gene, expression was low and never reached the level of the parent B. thuringiensis strain.

Thorne et al. (1986) cloned a delta-endotoxin gene from a large plasmid of B. thuringiensis subsp. israelensis in E. coli and B. subtilis. Expression of mosquitocidal activity was obtained in both bacteria. A gene with two open reading frames, separated by 64 bases was identified. The first open reading frame was coding for a protein of about 72 kDa, proposed to be the mosquitocidal delta-endotoxin. Some homologies with a kurstaki crystal protein gene were found in the control

regions as well as within the deduced amino acid sequences of the 72 kDa protein. Some resemblance was also detected when the hydropathy patterns were compared. These results seem to indicate a distant evolutionary relationship between the lepidopterous and dipterous active delta-endotoxins.

6. Prospects for the improvement of *Bacillus thuringiensis* insecticides by genetic engineering

The handling of delta-endotoxin genes as separate units, detached from the sporulation process of the parental strains, has opened new avenues for the application and development of this insecticide. At present, intensive investigations follow several directions, but it is too early to predict the ones which will be successful.

The most interesting part of the delta-endotoxin seems to be the carboxyl terminal region of the active toxin which shows high variability. Recombinations could lead to toxins with increased potencies or with altered insect spectra. The available gene pool is large, including subspecies active against Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. The C-terminal half of the protoxin is not essential for insecticidal activity. A gene construct coding only for a 55 to 70 kDa insecticidal polypeptide could be of interest.

B. thuringiensis is still the most productive host organism for the delta-endotoxin. Expression in other hosts is low, very likely because some factors required for optimum regulation do not function well or are even missing in the cloned genes.

Recent developments by industrial companies lead away from the classical insecticide approach where the insect populations are only treated when necessary. The delta-endotoxin gene has been cloned into cells of tobacco. The offsprings seem to express the delta-endotoxin gene at such a

level where toxicity to Manduca sexta larvae could be demonstrated. Attempts are also made to clone the insecticidal principle of B. thuringiensis subsp. israelensis in Cyanobacteria of the genus Anabaena, blue-green algae which are often present in the feeding zones of mosquito larvae.

Another company has cloned a kurstaki crystal protein gene in a strain of Pseudomonas fluorescens which is known to be associated with the rhizosphere of corn plants. The insecticide should be brought by this way to an otherwise non-accessible niche in order to protect the plants against the attack by the black cutworm (Agrotis ipsilon)

We have to be aware that the continuous presence of delta-endotoxin within or near plants favors resistance. Up to date, resistance has been reported in a single case against Plodia interpunctella (indian meal moth) as a result of longtime exposure to B. thuringiensis in grain bins. (McGaughey, 1985). The above discussed trends bear similar risks.

Production of delta-endotoxin in other microbial hosts could increase field stability of the insecticidal principle. Naked crystals deposited on leaf surfaces can lose activity quite rapidly, depending on the plant species and on environmental conditions. Crystal protein applied within a microorganism could provide increased stability and longer persistence. It is, however, important that the cell wall of the organisms harboring the delta-endotoxin is digested easily by the gut juice of the target larvae in order to liberate the insecticidal polypeptides.

7. Safety

The possible risks by the deliberate release of genetically engineered microorganisms into the environment are presently discussed by governmental agencies and working groups on safety and regulations in biotechnology. Microorganisms containing recombinant DNA designed for the release into the

environment have to be absolutely safe since control is lost at the moment of application.

The use of well investigated and non-pathogenic organisms which already occur in the environment should be without risk. The genes which are cloned and recombined must be known in detail. It is important that no contaminating DNA is co-transferred. The present knowledge about genes and their function excludes that recombination of safe DNA bears unpredictable risks. Nevertheless, stringent safety testing under laboratory and green-house conditions is required before permission for field assays should be granted.

Literature

- Adang, J.A., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F., and Thompson, D.V. (1985). Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36, 289-300.
- Aleshkin, G.I., Burtseva, L.T., and Skavronskaya, A.G. (1979). Generalized transduction in Bacillus thuringiensis. Genetika 15, 1186-1190.
- Aronson, A.I., Beckman, W., and Dunn, P. (1986). Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50, 1-24.
- Carlton, B.C., and Gonzalez, Jr. J.M. (1985). The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. In "The Molecular Biology of the Bacilli", D. Dubnau (ed.), vol.2, p. 211-248. Academic Press, Inc., New York.
- Chestukhina, G.G., Tyurin, S.A., Osterman, A.L., Khodova, O.P., and Stepanov, V.M. (1986). Amino acid sequences from the N-terminal domain of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin. FEBS Lett. 198, 283-286.
- Fischer, H.M. (1983). Plasmide und Plasmidübertragung bei Bacillus thuringiensis. Diss. ETH Nr. 7375, Zürich, Switzerland.
- Fischer, H.M., Lüthy, P., and Schweizer, S. (1984). Introduction of plasmid pC194 into Bacillus thuringiensis by protoplast transformation and plasmid transfer. Arch. Microbiol. 139, 213-217.

- Gonzalez, J.M., Jr., and Carlton, B.C. (1982). Plasmid transfer in Bacillus thuringiensis. In "Genetic Exchange: a Celebration and a New Generation", U.N. Streips, W.R. Guild, S.H. Goodal, and G.A. Wilson (eds.), p.85-95. Marcel Dekker, New York.
- Gonzalez, J.M. Jr., Dulmage, H.T., and Carlton, B.C. (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in Bacillus thuringiensis. Plasmid 5, 351-365.
- Held, G.A., Bulla, L.A. Jr., Ferrari, E., Hoch, J.A., Aronson, A.I., and Minnich, S.A. (1982). Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6065-6069.
- Iizuka, T., and Faust, R.M. (1981). Detection and characterization of naturally occurring plasmids in Bacillus cereus isolates by agarose gel electrophoresis. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 60, 263-274.
- Jarrett, P. (1983). Comparison of plasmids from twelve isolates of Bacillus thuringiensis H-serotype 7. FEMS Microbiol. Lett. 16, 55-60.
- Klier, A., Fargette, F., Ribier, J., and Rapaport, G. (1982) Cloning and expression of the crystal protein genes from Bacillus thuringiensis strain berliner 1715. EMBO J. 1, 791-799.
- Klier, A., Bourguoin, C., and Rapaport, G. (1983). Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes. Mol. Gen. Genet. 191, 257-262.
- Kronstad, J.W., and Whiteley, H.R. (1984). Inverted repeat sequences flank a Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. Bacteriol. 160, 95-102.
- Kronstad, J.W., Schnepf, H.E., and Whiteley, H.R. (1983) Diversity of location for Bacillus thuringiensis crystal protein genes. J. Bacteriol. 134, 419-428.
- Lecadet, M.M., Blondel, M.-O., and Ribier, J. (1980). Generalized transduction in Bacillus thuringiensis var. berliner 1715 using bacteriophage CP-54Ber. J. Gen. Microbiol. 121, 203-212.
- Lereclus, D. (1984). Récents développements de la recherche sur la génétique de Bacillus thuringiensis Berliner. Revue d'Agronomie 4, 269-278.
- Lereclus, D., Lecadet, M.M., Ribier, J., and Dedonder, R. (1982). Molecular relationships among plasmids of Bacillus thuringiensis: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. 186, 391-398.

- Lereclus, D., Menou, G., and Lecadet, M.M. (1983). Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after mating involving the Streptococcus faecalis pAM81. Mol. Gen. Genet. 191, 307-313.
- McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide Bacillus thuringiensis. Science 229, 193-195.
- Miteva, V.I., Shivarova, N.I., and Grigorova, R.T. (1981). Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid DNA. FEMS Microbiol. Lett. 12, 253-256.
- Nagamatsu, Y., Itai, Y., Hatanaka, C., Funatsu, G., and Hayashi, K. (1984). A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of Bacillus thuringiensis. Agric. Biol. Chem. 48, 611-619.
- Schnepf, H.E., and Whiteley, H.R. (1981). Cloning and expression of the Bacillus thuringiensis crystal protein gene in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 2893-2897.
- Schnepf, H.E., Wong, H.C., and Whiteley, H.R. (1985). The amino acid sequences of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260, 6264-6272.
- Shibano, Y., Yamagata, A., Nakamura, N., Iizuka, T., Sugisaki, H., and Takanami, M. (1985). Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the Bacillus thuringiensis crystal protein. Gene 34, 243-251.
- Thorne, I., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A.M., and Pollock, T.J. (1986). Structural similarities between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of Bacillus thuringiensis subsp. "kurstaki" and "israelensis". J. Bacteriol. 166, 801-811.
- Ward, E.S., and Ellar, D.J. (1983). Assignment of the δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis var. israelensis to a specific plasmid by curing analysis. FEBS Lett. 158, 45-49.
- Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, R., and Oshima, Y. (1983). Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in Bacillus spp. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1733-1740.
- Zakharyan, R.A., Agabalyan, A.S., Chil-Akopya, L.A., Gasparyan, N.S., Bakunts, K.A., Tatevosyan, P.E., and Afrikyan, E.K. (1976). Possible role of extrachromosomal DNA in the formation of the entomocidal endotoxin of Bacillus thuringiensis. Doklady Akademii Nauk Armenian USSR 63, 42-47.

S c h l u ß w o r t

Meine Damen und Herren,

Mit dem Ende des letzten Vortrags ist auch das Ende unseres Symposiums zur Erinnerung an die Erstisolierung und Erstbeschreibung von Bacillus thuringiensis vor 75 Jahren gekommen. Wir haben von den inzwischen gemachten Fortschritten gehört, aber auch von dem wechselnden Interesse in Wissenschaft und Praxis. Immerhin wird der B. thuringiensis von allen Insektenpathogenen weltweit am meisten in der biologischen Bekämpfung von Insekten angewandt. Nach der Entdeckung von neuen Pathotypen in jüngster Zeit ist zu erwarten, daß in der Zukunft auch noch weitere gefunden werden, wodurch sich der Anwendungsbereich von B. thuringiensis noch ausdehnen ließe. Und schließlich bleiben uns auch Hoffnungen auf gentechnischem Gebiet, wie sie im letzten Vortrag in Aussicht gestellt wurden.

In der Annahme, daß die verschiedenen Vorträge in deutsch oder englisch jedem Teilnehmer etwas Interessantes und Wissenswertes vermitteln konnten, darf ich den Rednern für ihre Mühen danken und dem Auditorium für das rege Interesse an dem Symposium. Vor allem bedanke ich mich bei den Initiatoren des Symposiums, Herrn Dr. Krieg und Herrn Dr. Huger, für ihre Mühen bei der Vorbereitung und Durchführung dieser Veranstaltung, zu der sich viele bedeutende B. thuringiensis-Spezialisten eingefunden haben.

Wie wir heute während des Symposiums erfuhren, war Dr. Ernst Berliner für längere Zeit in und um Darmstadt tätig. Hier wurden dann 1953 durch die Gründung des BBA-Institutes für biologische Schädlingsbekämpfung die Forschungsarbeiten an B. thuringiensis wieder aufgenommen und sowohl grundlagen- als auch praxisbezogen bis heute fortgesetzt. Vor allem Herr Dr. Krieg hat den größten Teil seines Forscherlebens in Darmstadt diesem besonderen Bacillus gewidmet. Daß B. thuringiensis in den 75 Jahren nach seiner Erstbeschreibung auch kosmopolitisches Eigentum der Wissenschaft sowie des biologischen Pflanzen- und Gesundheitsschutzes geworden ist, beweist die internationale Beteiligung an diesem Symposium.

Zum Schluß bedanke ich mich besonders bei der Technischen Hochschule Darmstadt, vertreten durch Herrn Dekan Prof. Dr. Kutzner, Fachbereich Biologie, für die freundliche Überlassung dieses Hörsaals für unsere Veranstaltung.

Prof. Dr. F. Klingauf
Leiter des Instituts für biologische Schädlingsbekämpfung
der Biologischen Bundesanstalt