



# NACHRICHTENBLATT FÜR DEN DEUTSCHEN PFLANZENSCHUTZDIENST

Herausgegeben von der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin durch  
die Institute der Biologischen Zentralanstalt in Aschersleben, Berlin-Kleinmachnow, Naumburg/Saale

## Biologische Arbeitsmethoden der Antibiotikaforschung

Von H. Köhler

Biologische Zentralanstalt der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,  
Institut für Phytopathologie Aschersleben

In der Phytopathologie finden sich in der einschlägigen Fachliteratur immer häufiger Veröffentlichungen, die von der erfolgreichen Bekämpfung von Erregern von Pflanzenkrankheiten mit Hilfe der Antibiotika berichten. Es scheint möglich, daß man durch ihre Verwendung auch solche Krankheiten bekämpfen kann, die bisher einer chemischen Behandlung nicht zugänglich waren. Das Arbeiten mit den Antibiotika erfordert die Kenntnis spezieller Arbeitsmethoden, ohne deren Beherrschung keine erfolgversprechenden Ergebnisse zu erwarten sind. In dieser Übersicht soll in gedrängter Kürze ein Überblick über die Grundzüge der biologischen Methodik gegeben werden.

Als erstes soll über die Feststellung und die Isolierung der Antagonisten berichtet werden. Die bisher bekannten Antibiotikabildner wurden entweder zufällig oder erst nach langem systematischen Suchen gefunden. Dabei ging man zwei verschiedene Wege. Einmal wurden alle reinen Organismenkulturen durchmustert und untersucht. Bei diesem Vorgehen muß allerdings mit Fehlergebnissen gerechnet werden, da durch jahrelanges Überimpfen der Organismen sehr leicht ein Virulenzverlust eintreten kann, da gerade die Antibiotikabildner auf nicht zusagende Kulturbedingungen äußerst empfindlich reagieren. Es empfiehlt sich daher ein zweiter Weg. Hier sucht man die Antagonisten aus einem Kulturgemisch aus Boden, Kloaken, Faeces, Luft, Schmutz, Fluß- und Teichschlamm, Komposterde und allen solchen Substanzen zu isolieren, die sehr reich an sich zersetzenden Kohlehydraten sind. Durch günstige Nährbodenauswahl kann man dann die eine oder andere Organismengruppe anreichern. Legt man Wert auf die Isolierung von Actinomyceten, wird man einen für sie günstigen Nährboden wählen, wie er z. B. als Glycerin-Glycokollager oder als Asparagin-Glukoseagar gegeben ist. Ein Zusatz von Streptomycin zum Nährboden unterdrückt dabei das Bakterienwachstum. Durch Peptonzusatz und die Einstellung eines geeigneten pH-Wertes wird man die in dem Substrat befindlichen bakteriellen Antagonisten und durch einmaliges Erhitzen die sporulierenden Bakterien gut isolieren können. Zur Isolierung der Pilze greift man zu einem zuckerhaltigen Nährboden, den man zur

Unterdrückung des Bakterienwachstums etwas saurer wählt, indem man 0,1 bis 0,2n KSCN oder 0,3%ige Borsäure zusetzt. Das Substrat schwemmt man in Wasser oder einer physiologischen Kochsalzlösung auf, pipettiert dann 1 cm<sup>3</sup> in eine sterile Petrischale und schichtet den gewünschten Agarnährboden vorsichtig darüber. Nach einer gewissen Inkubationszeit untersucht man die gewachsenen Organismen auf ihre antibiotischen Fähigkeiten, indem man die gegenseitige Hemmung untersucht oder mit einer Sporensuspension des Organismus beimpft, den man mit Hilfe der Antibiotika hemmen will. Hemmhöfe geben nach einer nochmaligen Bebrütung einen Hinweis auf die Anwesenheit der Antagonisten.

Eine weitere Methode, Antagonisten im Boden festzustellen und anzureichern, sei noch kurz erwähnt: Organische Substanzen werden nach einem mehr oder minder großen Zeitraum im Boden von der Bodenmikroflora zersetzt. Vermag nun eine Art diese Substanzen nicht zu assimilieren, so gerät sie, verglichen mit anderen Organismengruppen, ins Hintertreffen. Liegt nun ein synthetischer oder natürlicher Nährboden vor, der nur diese Substanzen als Nährstoffquelle enthält, so können sich Mutanten des Organismus bilden, die die Fähigkeit der Assimilation dieser Substanz besitzen. Diese Mutanten werden bald in dem Nährsubstrat in überwiegender Zahl vorhanden sein, bis sie die ursprünglichen Organismen vollständig verdrängt haben. Um solche Mutanten zu erhalten, geht man nach folgender Versuchsmethodik vor: Frische Garten- oder Felderde wird im Labor unter geeigneten Luft-, Feuchtigkeits- und Temperaturverhältnissen stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit werden solche Stoffe zugefügt, deren Kompostierung gewünscht wird, ferner Wasser, um die Verdunstung auszugleichen und Säuren oder auch andere Verbindungen, um die Produkte der Kompostierung zu neutralisieren. In bestimmten Abständen werden Proben entnommen und die isolierten Organismen untersucht. Diese Methode findet außer bei der Isolierung zellulose- und petroleumzersetzender Organismen Anwendung bei der Isolierung der Antagonisten. Dem Boden werden als einzige Stickstoffquelle nur Organismen zugesetzt, die man hemmen möchte. Nach



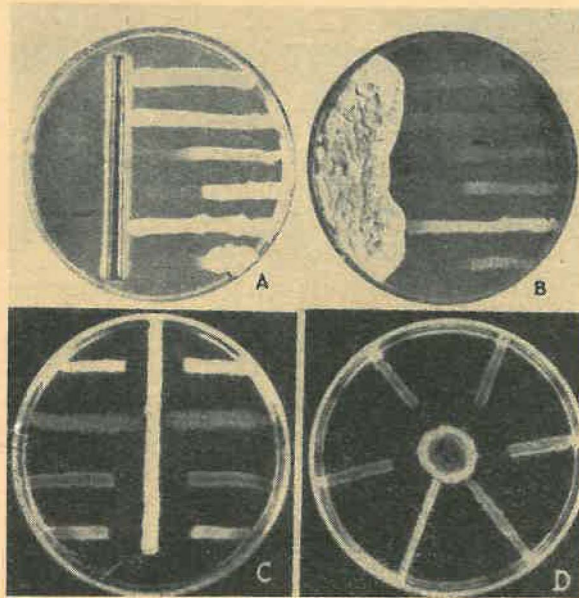


Abb. 1  
Modifikationen des Strichtestes:  
A—C: Antagonist strichförmig auf die Platte geimpft; Testorganismus im rechten Winkel dazu  
D: Antagonist ins Zentrum der Platte geimpft, Testorganismus in Radialrichtung

dieser Methode gelang es, den Produzenten des in der Humanmedizin bekannten Tyrothricins zu gewinnen, indem dem Boden zwei Jahre lang als Stickstoffquelle nur gram-positive Bakterien zugesetzt wurden. Es gelang auf diesem Wege, den sonst sehr seltenen Antagonisten *Bacillus brevis* in Reinkultur zu erhalten. Auch WAKSMAN ging bei der Anreicherung der antagonistischen Actinomyceten im Boden nach dieser Methodik vor.

Nach den Isolierungsmethoden soll von den verschiedenen Testmethoden berichtet werden. Unter einem Testorganismus versteht man einen solchen, der dem Antibiotikum gegenüber empfindlich sein muß und bei dem das Maß seiner Empfindlichkeit zur Feststellung des antibiotischen Wertes dient.

Der Testorganismus wird entweder zur gleichen Zeit wie der Antagonist auf eine Testplatte geimpft oder erst dann, wenn der Antagonist eine bestimmte Zeit gewachsen ist. Bei der Wahl der Testorganismen muß besonders sorgfältig vorgegangen werden, da es keine Antagonisten gibt, die auf alle Testorganismen hemmend wirken. Antibiotika können sogar nur auf einen bestimmten Stamm einen Einfluß besitzen, wie das u. a. bei *Bacterium coli* als Testorganismus der Fall ist. Die Wahl des geeigneten Testorganismus, seien es nun *Staphylococci*, gram-negative oder -positive Bakterien oder Pilze, ist demzufolge ausschlaggebend für den Erfolg der weiteren Arbeit.

### 1. Die Aktivitätsbestimmung der Antagonisten

Bei dieser Methode werden Antagonist und Testkeim auf einmal oder nacheinander auf die Testplatte gebracht und der antibiotische Wachstumseinfluß festgestellt. Dieser Test wird in der Literatur als **Strichtest** bezeichnet. Der Antagonist wird als Kreissekante aufgeimpft und der Testorganismus dazu im rechten Winkel (Abb. 1). — Bei diesem Test werden beinahe ausschließlich Petrischalen verwendet, die mit einem geeigneten Nährboden unter

sterilen Bedingungen beschickt wurden. — Die gehemmte Zone des Testorganismus wird mit Millimeterpapier gemessen. Vor der Anlage des Strichtestes muß geklärt werden, ob es sich bei dem Antagonisten und dem Testkeim um Aerobier oder Anaerobier handelt, ferner, ob beide Organismen die gleichen Wachstumsansprüche stellen; nach diesen Ergebnissen ist dann die entsprechende Versuchsanstellung zu wählen.

Eine Abwandlung des eben beschriebenen Strichtestes besteht darin, daß der Antagonist ins Zentrum der Platte und die Testorganismen in Radialrichtung dagegen geimpft werden. Bei dieser Testmodifikation muß beachtet werden, daß — trotz relativ großer Seltenheit — die Testkeime selbst nicht aufeinander antagonistisch wirken und dadurch das Testergebnis verfälschen können. Bei dem Ziehen der Striche der Testkeime fängt man immer am Antagonisten an, um zu vermeiden, daß gerade an dieser kritischen Stelle der Testorganismus zu dünn aufgetragen wurde.

Bei dem Scheiben- oder Streifenfestest läßt man den Antagonisten auf einer Agarplatte wachsen, die alle für die Bildung des Antibiotikums notwendigen Nährstoffe enthält. Nachdem das Wachstums- und das Aktivitätsoptimum erreicht wurde, schneidet man unter sterilen Bedingungen, meist mit einem Korkbohrer, einen Agarblock aus der bewachsenen Platte heraus und setzt ihn, unter Einhaltung größtmöglicher Sterilität auf die mit dem Testkeim bewachsene Petrischale. Den Agarblock kann man auch auf den geschmolzenen Agar setzen, so daß er sich in einer Ebene mit dem Testorganismus befindet. Die Platte wird dann wieder bebrütet und die Größe des Hemmhofes festgestellt (Abb. 2). Eine Abwandlung dieser Methode kann darin bestehen, daß kein Block, sondern ein langer schmaler Streifen des Antagonisten herausgeschnitten wird, der verschiedenaltriges Mycel enthält, so daß sich mit Hilfe dieser Streifenmethode leicht feststellen läßt, ob das jüngere oder das ältere Mycel der stärkere Antibiotikabildner ist. Diese Methode wird dann angewandt, wenn Testorganismus und Antagonist nur auf verschiedenen Kulturmedien zu wachsen vermögen, während das Wachsen unter gleichen Kulturbedingungen Voraussetzung für das Gelingen des Strichtestes ist. Mit Hilfe des Streifenfestestes kann immer nur die Wirkung des Antagonisten auf einen Testorganismus festgelegt werden, dagegen bei Verwendung des Strichtestes der Einfluß auf mehrere Organismen, so daß man diese Methode vornehmlich zur raschen Festlegung des

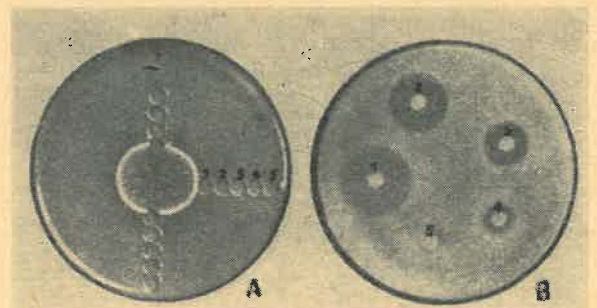


Abb. 2  
Scheibentest:  
A: Eine mit dem Antagonisten beimpfte Petriplatte  
B: Die ausgestanzten Scheiben werden auf die mit dem Testorganismus beimpfte Petriplatte überführt



Wirkungsspektrums eines Antibiotikums benutzen wird.

Bei der Zellophanagarmethode wird sterilisiertes Zellophanpapier auf die Agaroberfläche gelegt und der Antagonist auf das Zellophanpapier aufgeimpft. Das Antibiotikum diffundiert durch die Zellophanmembran. Das Papier wird nach der Erreichung des Aktivitätsoptimums des Antagonisten entfernt, und auf dem Agar werden ein oder mehrere Testorganismen dagegen geimpft. Diese Methode hat den Nachteil, daß Antibiotika, deren Moleküle zu groß zum Diffundieren sind, durch diesen Test nicht erfaßt werden können.

Ergeben sich bei diesen Testen dadurch Schwierigkeiten, daß beide Organismen verschiedene Wachstumsansprüche haben, so werden die beimpften Testplatten erst unter für den Antagonisten optimale Bedingungen (Sauerstoffbedarf, Temperatur, Feuchtigkeit) gebracht und nach genügend langer Anwachszeit in für den Testorganismus optimale Bedingungen, damit die Gewißheit gegeben ist, daß das Antibiotikum in ausreichendem Maße gebildet werden konnte. Ferner sind noch die Faktoren zu berücksichtigen, die zur Bildung des Antibiotikums notwendig sind, bzw. deren Nichtbeachtung eine Antibiotikumbildung unmöglich macht. Als erstes ist dabei auf die geeignete Zusammensetzung der Nährlösung zu sehen. Der Nährboden kann so beschaffen sein, daß das Antibiotikum entweder überhaupt nicht gebildet wird, oder, wenn es zu einer Bildung kommt, kann es reversibel oder irreversibel inaktiviert werden. Bei der Beschreibung eines jeden Antibiotikums werden genaue Hinweise gegeben, daß ein Antibiotikum nur auf einem oder mehreren bestimmten Nährböden zur Bildung gelangt. Den Nährböden sind außerdem bestimmte Biostoffe und Spurenelemente zuzufügen, wobei es besonders auf die Einhaltung der vorgeschriebenen Konzentration ankommt. Hin und wieder kommen auch Störungen durch benachbarte Organismenkulturen hinzu. So kann ein Antibiotikum unter diesem Einfluß entweder überhaupt nicht gebildet werden, oder die gebildete Substanz wird durch den Einfluß der Nachbarkultur sofort wieder zerstört. Dies tritt besonders augenfällig bei einer Infektion des Antagonisten zutage. Der enzymatische Abbau der Antibiotika durch andere Mikroorganismen, besonders durch zufällige Luftinfektionen, ist die Hauptgefahrenquelle der antibiotischen Arbeiten. Bei allen Arbeiten ist deshalb auf Einhaltung größtmöglicher Sterilität zu sehen. Ähnliche Störungen treten durch einen nicht zusagenden pH-Bereich, durch oxydierende oder reduzierende Substanzen auf, so daß dann auch hier das gebildete Antibiotikum nicht mehr nachweisbar sein kann.

Fehlerhafte Testergebnisse erhält man auch dann, wenn der Test in einer ungenügenden Entwicklungsstufe des Antagonisten vorgenommen wurde. Bei Bestehen dieses Verdachtes wird es notwendig sein, mehrere aufeinanderfolgende Tests in regelmäßigen Intervallen anzulegen. Bei einigen Antibiotika liegt der Fall vor, daß sie nicht in das Nährmedium abgegeben, sondern in den Zellen des Antagonisten gespeichert werden. Als Beispiel wäre hier das Enniatin (*Fusarium orthoceras* var. *enniatinum*) und das Tyrothricin (*Bacillus brevis*) zu nennen. Das Diplococcin (*Streptococcus cremoris*) wird im neutralen oder schwach sauren Bereich im Organismus gespeichert und ins Kulturmedium erst bei stärkerer Ansäuerung abgeschieden.

Wird nach den genannten Testmethoden der Nachweis der Antagonisten geführt, ist dann zu klären, um welches Antibiotikum es sich handelt und wie es in größerem Maßstabe darzustellen ist, was meist nur in einem flüssigen Nährmedium möglich sein wird. Die bisher genannten Tests sind nur als reine Informationstests zu werten. Da sie nur mit dem Antagonisten, nicht aber mit dem Antibiotikum selbst durchgeführt wurden, kann nach einem positiven Ausfall dieser Tests nicht mit absoluter Sicherheit ausgesagt werden, daß sich die gleiche antibiotische Aktivität auch in einem flüssigen Kulturmedium nachweisen läßt.

So besteht die Schwierigkeit, daß manche Antagonisten nicht auf einem flüssigen Kulturmedium zu wachsen vermögen. Als Beispiel wäre hier *Tricholoma nudum*, der Produzent der Nudinsäure, zu nennen, dessen Mycel in einer Nährlösung untersinkt. Hier muß dann zur Verfestigung des Nährsubstrates ein geringer Prozentsatz Agar oder ein Trägerstoff zugefügt werden. Es ist immer am vorteilhaftesten, wenn man den Antagonisten auf einem flüssigen Medium wachsen lassen kann, da hieraus das Antibiotikum am leichtesten rein darzustellen ist.

Während man zu Beginn der Antibiotikaforschung die Hemmstoffe im Oberflächenverfahren gewann, d. h., man ließ die Antagonisten in Erlenmeyer-, Fernbach- oder in den sogenannten P-Kolben wachsen, ist man jetzt, bis auf wenige Ausnahmen, zu dem Tankverfahren übergegangen. Erst durch diese Herstellungsweise ist die Großproduktion der Antibiotika wirtschaftlich geworden. Da in den Tanks die Kulturen submers wachsen und ein Oberflächenwachstum nach Möglichkeit verhindert werden soll, sind die Tanks mit einem Rührwerk ausgestattet, um die Lösung dauernd in Bewegung zu halten; ferner sind sie mit Heiz- und Kühleinrichtungen und mit einer Belüftungsanlage versehen. Die Luft wird in großen Türmen sterilisiert, die den „Penicillinfabriken“ das charakteristische Aussehen verleihen. Von einigen Antibiotika ist allerdings bekannt, daß sie durch die durchströmende Luft inaktiviert werden, man hilft sich dann durch Verwendung anderer reiner Gase oder Gasgemische oder, indem man die Luft oder die Gasgemische nur über die Oberfläche der Kultur hinwegstreichen läßt.

Eine weitere Möglichkeit, schlecht wachsende Antagonisten auf einem flüssigen Nährmedium zu ziehen, besteht darin, daß man sie auf einem Zellophanstreifen wachsen läßt, der in die Kulturlösung hineintaucht. Trotz vieler Vorteile ist diese Methode jedoch nicht geeignet, Antibiotika in größerer Menge darzustellen, da sie nur im Oberflächenverfahren anwendbar und dadurch äußerst unrentabel ist. Man verwendet bei dieser Methode eine permeable Membran, wie sie aus Zellophan oder Kollodium geliefert wird. Diese Membran kann unter sterilen Bedingungen immer wieder ohne neue Einsaat auf ein frisches Nährsubstrat überführt werden, so daß von einer Kultur mehrere Ernten hintereinander gewonnen werden können. Unter Labormaßstab hat sich diese Methode eingeführt, wenn es notwendig ist, verschiedene Nährmedien bezüglich ihrer Eignung zur Gewinnung der Antibiotika zu vergleichen. Wenn man mit Antibiotika mit sehr großen Molekülen arbeitet, hat es sich als günstig erwiesen, die Membran vorher mit einer Zinkchloridlösung zu behandeln. Die Zellophan- und Kollodiummembran eignet



sich jedoch nicht für alle Antagonisten in gleicher Weise. So greift z. B. *Penicillium notatum* diese Substanzen an, so daß man in derartigen Fällen tunlichst mit einem Nitratfilm arbeitet.

Die Ernte des Antibiotikums aus der Nährlösung ist von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig, deren wichtigste folgende sind: Temperatur und Dauer der Inkubationszeit, pH-Wert und Pufferung der Nährlösung, Zusammensetzung des Nährbodens einschließlich der An- und Abwesenheit von Wachstoffsstoffen und Spurenelementen, Oxydations- und Reduktionspotentialen und dem Verhältnis der Oberfläche zum Volumen bzw. den optimalen Durchlüftungsverhältnissen.

Nach der Erreichung eines genügend starken Wachstums und optimaler Anreicherung des Antibiotikums in der Kulturlösung wird diese ausgetestet. Vorangegangene Informationsteste geben Hinweise auf das Erreichen des Optimalwertes. Die Testprobe wird filtriert, damit nicht die Teste durch die Anwesenheit des Antagonisten gestört werden und dadurch falsche Ergebnisse zeitigen. Bei einem Aussetzen der Kulturlöslrate gegen einen der schnell wachsenden gebräuchlichen Testorganismen, wie *Bacillus subtilis*, ist eine sterile Filtration nicht unbedingt erforderlich. So genügt z. B. bei den Kulturlösungen von Pilzen und Actinomyceten oft schon das Filtrieren durch sterile Glas- oder Baumwollwatte. Bei bakteriellen Antagonisten ist dagegen eine Filtration durch ein Bakterienfilter unbedingt notwendig. Um das Filtrieren zu beschleunigen, empfiehlt es sich, die Kulturlösung zu zentrifugieren. Die Lösung kann auch auf chemischem Wege, durch Hitze oder durch ultraviolettes Licht weitgehend steril erhalten werden. Hierbei muß mit der größten Vorsicht vorgegangen werden, da durch eine derartige Einwirkung das Antibiotikum selbst zerstört werden kann, so daß dann falsche Testergebnisse unausbleiblich sind.

Alle Untersuchungen der antibiotischen Aktivität und die Überprüfung der Innehaltung geeigneter Kulturmethode sind auf zuverlässige und genaue Teste aufzubauen. Es sind die verschiedensten Testmethoden gebräuchlich, die je nach Eignung für das eine oder andere Antibiotikum angewandt werden können. Die meisten Teste sind biologischer Natur. Chemische Teste sind bis jetzt nur für relativ wenige Antibiotika ausgearbeitet worden. Sie sind auch nicht unbedingt erforderlich, da den biologischen gegenüber den chemischen Testen folgende Vorteile zukommen:

1. Die biologischen Teste sind am empfindlichsten.
2. Die biologischen Teste können bei bekannten wie auch bei unbekanntem Antibiotika angewandt werden.
3. Das zu untersuchende Material ist oft chemisch inhomogen und besitzt demzufolge eine verschiedenartige Zusammensetzung, so daß bei einer chemischen Testmethode eine Fraktionierung notwendig sein dürfte, während mit Hilfe der biologischen Prüfungsmethode ohne weiteres auch Komplexverbindungen erfaßt werden können.

Durch den biologischen Test kann allerdings nicht immer entschieden werden, ob in der Kulturlösung ein oder mehrere Antibiotika vorliegen, besonders dann nicht, wenn diese Antibiotika das gleiche Wirkungsspektrum besitzen.

## 2. Die Aktivitätsbestimmung der Antibiotika

Obwohl die meisten biologischen Testmethoden für den Penicillin- oder Streptomycinnachweis ausgearbeitet wurden, können diese, wenn auch unter Einschränkung, für den Nachweis und die Wertbestimmung anderer Antibiotika verwendet werden. Die hauptsächlichlichen Prüfungsmethoden, die sowohl bei den ungereinigten Kulturfiltraten wie auch für die einzelnen Produkte der Reinigung anwendbar sind, sind folgende:

- a) Die Verdünnungsmethode;
- b) die Diffusionsmethode;
- c) die Trübungsmethode.

### a) Die Verdünnungsmethode

Man benötigt für diesen Test eine Reihe von Gefäßen, gefüllt mit einem festen oder flüssigen Medium, das den Wachstumsansprüchen des Testorganismus vollauf Genüge tut. Ferner enthalten diese Gefäße genau abgemessene Mengen des Materials, dessen antibiotische Wirksamkeit bestimmt werden soll. Bei gleichbleibender Nährlösungsmenge werden entweder die antibiotikumhaltige Lösung in verschiedenen Konzentrationen zugeführt, oder die umgekehrte Versuchsanstellung wird angewandt. Die Testgefäße werden dann mit einem empfindlichen Testorganismus angeimpft. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird festgestellt, bei welcher geringsten Konzentration des Antibiotikums das Wachstum oder sonst eine wahrnehmbare Funktion des Testorganismus noch gerade verhindert wird. Da dieser Verdünnungstest mit sehr vielen Faktoren zu variieren vermag, empfiehlt es sich, stets vergleichsweise ein Standardpräparat mit zu testen. Der Verdünnungstest ist auch heute noch die bestbekannteste und weit verbreitetste Methode, die viele Abwandlungen erfahren hat. Die Gefäße, meist Reagenzgläser, kommen unter optimalen Temperaturbedingungen des Testorganismus in einen temperaturkonstanten Raum, und nach geeigneter Zeit — meist 16 bis 24 Stunden — wird der Trübungsgrad festgestellt, d. h., der Test wird „abgelesen“. Das entscheidende ist dann das letzte, noch als klar zu bezeichnende Röhrchen (Abb. 3). Für den Streptomycinnachweis ist der Verdünnungstest nicht geeignet, da diese Methode für das Antibiotikum mit vielen Fehlern verknüpft ist und ungenaue, nicht reproduzierbare Ergebnisse bringt. Besonders störend machen sich die Fehler bei nicht zuzugender Zusammensetzung und Konzentration des Nährmediums, der Salzkonzentration, bei einem nicht geeigneten Testorganismus und bei unsachgemäßer Behandlung bemerkbar.

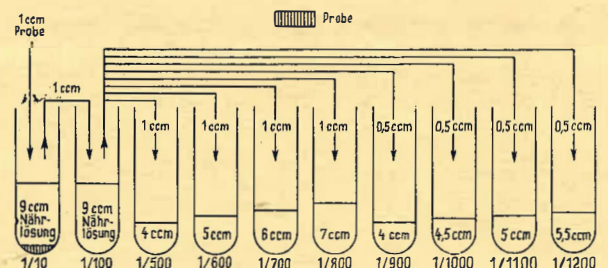


Abb. 3

Schema des Verdünnungstestes

Nährlösung: meist mit dem Testorganismus angeimpftes Peptonwasser o. ä.

Probe: antibiotikumhaltige Lösung



An den Testorganismus sind bei allen Testen folgende Anforderungen zu stellen: Der Organismus muß dem Antibiotikum gegenüber empfindlich, den Kulturbedingungen gegenüber jedoch nicht überempfindlich sein. An ihn wird demzufolge die Anforderung des „Robustseins“ gestellt, d. h., er muß leicht zu kultivieren und nicht sehr wählerisch in seinen Kulturanprüchen sein. Ferner darf er nicht zu Änderungen in seinem Verhalten neigen, und er soll schließlich nicht humanpathogen sein.

Die Dauer der Inkubationszeit kann von einer Stunde bis zu drei Tagen währen, jedoch läßt man die Teste gewöhnlich über Nacht stehen. Es läßt sich meist die Regel aufstellen, daß, je höher die optimale Inkubationstemperatur, um so kürzer die Inkubationszeit ist.

Vermögen die Antibiotika nur eine gewisse Menge von Keimen zu hemmen, muß der Menge des Testorganismus und der gleichmäßigen Verteilung Beachtung geschenkt werden. Eine Bakterienaufschwemmung in einem flüssigen Medium ist einer Entnahme der Bakterien von einem festen Substrat vorzuziehen. Auf eine regelmäßige Abwechslung zwischen fester und flüssiger Passage der Testorganismenkultur ist zu achten. Zur Bestimmung des genauen kritischen Endpunktes benutzt man entweder die Trübungsmethode, die weiter unten noch besprochen werden soll oder auch den leichter zu bestimmenden Farbumschlag, indem man in diesem Falle Säurebildner als Testorganismen verwendet. Als Nährböden sind Lackmusmilch, Laktose-Nährböden mit einem Zusatz von Brom-Kresol oder einem ähnlichen Indikator geeignet. Als Testorganismen haben sich *Streptococcus lactis* und *Streptococcus agalactiae* bewährt.

Steht der Test nur über Nacht, so sind Vorkehrungen steriler Art nicht erforderlich. Bei langsam wachsenden Testorganismen (z. B. Erreger der Tuberkulose) oder auch, wenn sich in der antibiotikumhaltigen Lösung Bakterien befinden oder die Gefahr einer Infektion besteht, die den Test stören können, muß auf strengste Sterilität geachtet werden. Meist wird man die Testprobe steril filtrieren, wobei man penicillinhaltige Lösungen auch durch ein Seitzfilter filtrieren lassen kann, während bei vielen anderen Antibiotika ein Glasbakterienfilter vorzuziehen ist, da diese durch das Seitzfilter adsorbiert werden können, so daß sie dann testmäßig nicht mehr erfaßt werden können. Außer der Sterilfiltration sind noch andere Möglichkeiten zur Erhaltung steriler Proben gegeben. Nur wenige Antibiotika können ein Autoklavieren bis zur Erreichung der Sterilität vertragen, wie es als seltene Ausnahme beim Subtilin (*Bacillus subtilis*) der Fall ist, von den meisten jedoch kann ein kurzfristiges Erhitzen auf 60–70° C ohne größeren Aktivitätsverlust ertragen werden.

Beim Penicillin kann die Zugabe eines Phosphatpuffers von pH 7,0 dazu beitragen, daß auch hier ein kurzfristiges Erhitzen ohne Verlust der Wirksamkeit ertragen werden kann. Ferner erreicht man sterile Lösungen, indem man die antibiotikumhaltige Substanz oder Lösung mit einem organischen Lösungs- oder Desinfektionsmittel versetzt. Es muß hier die kleinste noch wirksame Konzentration verwendet werden, damit eine nachteilige Wirkung auf das Antibiotikum ausgeschlossen oder doch weitgehend herabgemindert wird. Als Mittel kommen in Betracht: Chloroform, Tetrachloräthylen oder Tetra-

chlorkohlenstoff. Ist das Antibiotikum in Alkohol oder einem anderen organischen Lösungsmittel gelöst, ist es meist steril. Bei vielen Testen ist eine vollständige Sterilität nicht erforderlich, auch nicht bezüglich der Antagonisten selbst, so wachsen z. B. die Penicilliumsporen bei 37° C — der üblichen Testtemperatur — so langsam, daß das Testergebnis durch sie nicht beeinflusst werden kann.

Der Verdünnungstest kann mit unterschiedlichen Substanzmengen durchgeführt werden, so daß er gern zur Wertbestimmung benutzt wurde. Wenn diese Methode jedoch nicht sorgfältig durchgeführt wird, haften ihr große Fehlermöglichkeiten an. Allein durch das Verwenden nicht geeichter Pipetten, die sich bei der Herstellung der Verdünnung auswirken, können Fehler bis zu 10 Prozent entstehen. Um den Ableseschwierigkeiten und den damit verbundenen beträchtlichen Fehlermöglichkeiten zu entgehen, ist das „Ablesen“ des Testes immer von der gleichen Person vorzunehmen. Da durch diese Schwierigkeiten die Zuverlässigkeit des Testes manchmal in Frage gestellt sein kann, ist man heute meist zu anderen Testmethoden übergegangen.

#### b) Die Diffusionsmethode

Bei diesem Test wird die Flüssigkeit, die geprüft werden soll oder die Substanz, die das Antibiotikum enthält — wie z. B. Agarstückchen — in Kontakt mit einem festen Medium gebracht, das den Testkeim enthält. Der Test wird fast ausschließlich in Petrischalen angelegt. Die Testplatten werden bei konstanten Temperaturen bebrütet. Die Strecke des nicht gewachsenen Testkeimes gibt an, wie wirksam das Antibiotikum ist und wie weit und in welcher Geschwindigkeit das Antibiotikum in den Agar hinein zu diffundieren vermag. Die vielen gebräuchlichen Diffusionsmethoden zerfallen in zwei Hauptgruppen, und zwar in die Vertikal- und die Horizontaldiffusionsmethode. Die erstere wird trotz ihrer einfachen Handhabung kaum mehr angewandt: In ein steriles Röhrchen wird die antibiotikumhaltige Lösung eingefüllt und der mit dem Testorganismus beimpfte Nähragar vorsichtig überschichtet. Die wachstumsfreie Zone wird dann gemessen, die sich sehr gut als durchsichtiger heller Hof in dem getrübbten Agar markiert. Man ist jetzt immer mehr zu der Horizontaldiffusionsmethode zum Nachweis und zur Wertbestimmung der Antibiotika übergegangen, da sich mit ihrer Hilfe mehrere Konzentrationsstufen eines Antibiotikums auf einmal auf einer Platte testmäßig bestimmen lassen. In Amerika hat sich die Zylindermethode durchgesetzt, während man in Deutschland mehr mit der Lochtestmethode arbeitet.

Bei beiden Methoden wird die mit Agar gefüllte Petrischale mit dem Testorganismus beimpft, entweder, indem man ihn in den Agar kurz vor dem Erstarren suspensiert oder indem man die Agaroberfläche nach dem Erstarren beimpft. Der erste Weg hat sich wegen der gleichmäßigen Verteilung als der günstigere erwiesen. Nach dem Erstarren des Agars wird das Kondenswasser vorsichtig entfernt und die Platte getrocknet, damit durch das Wasser keine Verdünnung des Antibiotikums entstehen kann, die die Gefahr von Testfehlern unvermeidlich machen. Die Platte wird solange bebrütet, bis ein gleichmäßiges Wachstum des Testorganismus feststellbar ist.

Bei der Zylindermethode verwendet man Glas-, Plexiglas- oder Porzellanzyylinder. Man erwärmt die sterilisierten Zylinder, indem man sie auf



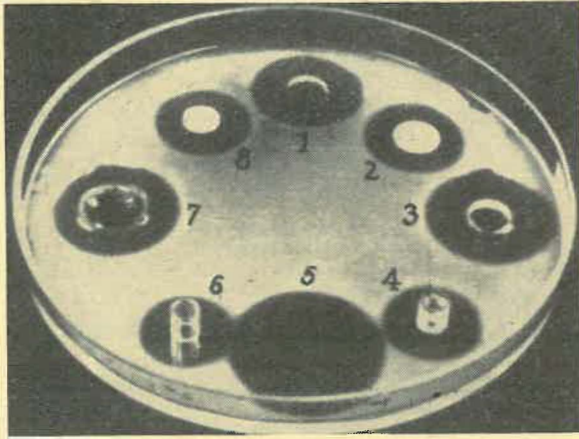


Abb. 4

Modifikationen der Horizontaldiffusionsmethoden.

- 1: Lochtest mit sterilem Korkbohrer gebohrt
- 3: Lochtest mit sterilem Glasstab gebohrt
- 7: Lochtest mit sterilem Gummistab gebohrt
- 4 und 6: Zylindermethode
- 2 und 8: Papierblättchenmethode
- 5: Auftropfmethode

Zu allen Testmodifikationen wurde die gleiche Antibiotikakonzentration gewählt

eine erwärmte sterile Platte oder in kochendes Wasser bringt, damit die Zylinder auf der Agaroberfläche etwas einsinken, das Antibiotikum in den Agar hineindiffundieren kann und ein Entlangfließen auf der Agaroberfläche vermieden wird. Die Zylinder werden mit verschiedenen Konzentrationsstufen der antibiotikumhaltigen Lösung mit genau abgemessenen, gleichbleibenden Mengen mit der Mikropipette angefüllt. Durch ungenaues Arbeiten können hier Testfehler bis zu 10 Prozent entstehen.

Eine Abänderung dieser Zylindermethode stellt die Papierblättchen-, die Lochtest- und die Auftropfmethode dar (Abb. 4 u. 5). Den Lochtest bereitet man vor, indem man aus der Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Korkbohrers mehrere Löcher stanzt, nach Möglichkeit ohne bis auf den Boden der Petrischale zu kommen. Es besteht sonst die Gefahr, daß das Antibiotikum auf dem Glasboden entlangfließt und nicht in den Agar diffundiert. Notfalls muß nach dem Stanzen in das Loch ein Tropfen eines flüssigen Nähragars gefüllt werden. Das Loch wird genauso mit dem Antibiotikum gefüllt wie die Zylinder bei der vorigen Methode. Beide Tests ergeben annähernd die gleichen Ergebnisse. Die Papierblättchen- und die Auftropfmethode werden dann verwandt, wenn Blutbeimischungen oder Pflanzenpreßsäfte mit dem Antibiotikum vermischt sind, die sich beim Loch- oder Zylindertest sofort an die Agarinnenfläche legen und dadurch ein Hineindiffundieren in den Agar verhindern. Da bei beiden Methoden selbst bei vollständig waagrechttem Tisch und größtmöglicher Gleichmäßigkeit der Agarschicht das Antibiotikum nicht gleichmäßig verteilt wird, müssen mehrere Durchmesserbestimmungen vorgenommen werden. Trotzdem treten bei beiden Testen noch Fehlermöglichkeiten von 20 Prozent auf. Bei der Papierblättchenmethode werden gleichgroße Filtrierpapierstückchen auf die getrocknete beimpfte Agaroberfläche ausgelegt und mit einer Mikropipette eine bestimmte Menge der antibiotikumhaltigen Lösung aufgetropft, während bei der Auftropfmethode die Lösung direkt auf die Agaroberfläche aufgetropft wird. Da die Wirkung bestimmter Antibiotika von der Menge der

Testkeime abhängig ist, muß beim Beimpfen größte Sorgfalt walten. Am besten bewährt hat sich folgende Methode: Man gießt eine dünne Schicht beimpften Agars auf eine dicke unbeimpfte. Für Petrischalen von etwa 9 cm Durchmesser werden folgende Mengen benötigt: 22 ccm des unbeimpften Nähragars werden nach dem Erstarren mit 3 ccm geschmolzenen Agars überschichtet, der mit 1 ccm einer Aufschwemmung der Testkultur angeimpft wurde, die rund 250 000 lebende Bakteriensporen enthalten muß. Eine mikroskopische Überprüfung der Testkultur ist stets erforderlich. Der angeimpfte Agar enthält tunlichst 0,5 Prozent weniger Agar als der sonst gebräuchliche. Die Hauptschwierigkeit der Methode besteht darin, daß man in einem zu heißen Agar die Keime abtötet und in einem etwas kühleren und damit oft schon halb erstarrten Agar den Testorganismus nicht mehr gleichmäßig verteilen kann.

Die Schichthöhe des Agars stellt ebenfalls bei allen Diffusionstesten einen entscheidenden Faktor dar. Versuche ergaben, daß eine Höhe von 8 mm die besten reproduzierbaren Werte ergibt. Man kann bei den verschiedenen Diffusionstesten jeden Nährboden verwenden, der ein gutes Wachstum des Testkeimes verspricht. Beim Einstellen des pH-Wertes ist auf die Empfindlichkeit mancher Antibiotika dem Reaktionsvermögen des Agars gegenüber Rücksicht zu nehmen. Da man während des Wachstums den pH-Wert nicht kontrollieren kann, empfiehlt sich stets der Zusatz eines Puffers.

Bei einigen Antibiotika können auch einzelne Komponenten des Nährbodens bestimmend auf die antibiotische Wirksamkeit sein, z. B. kann das Notatin (*Penicillium notatum* und einige andere Penicillien) nur in Gegenwart von Glukose ausgetestet werden.

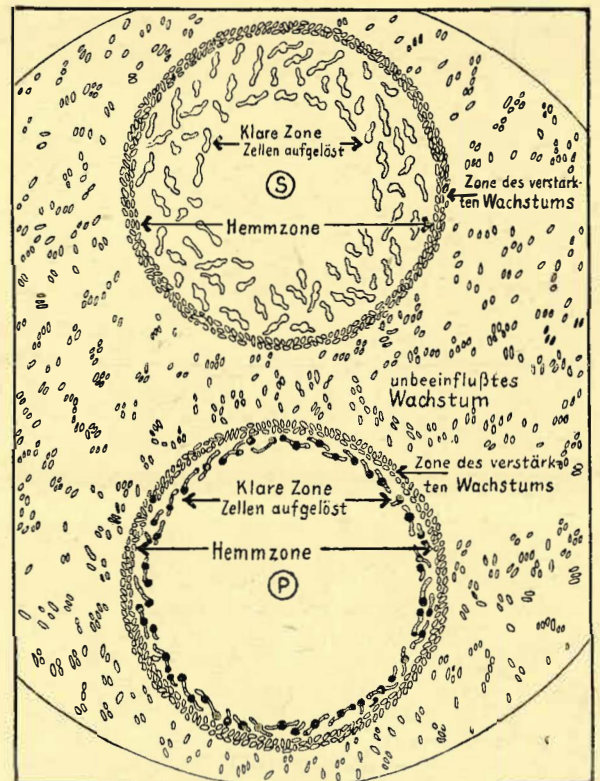


Abb. 5

Schema des Lochtestes.



Antibiotika mit großen Molekülen können nicht durch den Diffusionstest wertmäßig bestimmt werden, da ihre Diffusionsgeschwindigkeit durch den Agar zu gering ist, als daß diese gegen den Testkeim noch voll wirksam sein könnten. Muß man ein nicht wasserlösliches Antibiotikum untersuchen, so kann man es mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel ausschütteln. Da die Diffusionsgeschwindigkeit von dem pH-Wert des Antibiotikums abhängig ist, ist es mit einem Phosphatpuffer auf den gleichen pH-Wert wie das Standardpräparat einzustellen. Die Inkubationstemperatur und -dauer des Diffusionstestes müssen ausreichend sein, um ein gutes Wachstum des Testkeimes zu gewährleisten. Da die Hemmhofgröße von der Einwirkungsdauer bzw. der Diffusionszeit abhängig ist, läßt man die Platten meist erst eine gewisse Zeit mit dem Antibiotikum stehen, ehe sie mit dem Testorganismus beimpft werden. Die Messung der klaren Hemmhöfe kann mit Millimeterpapier bis zur komplizierten Größenbestimmung mit dem Projektionsapparat vorgenommen werden.

Nachdem man bei den ersten Testen hauptsächlich einen bestimmten Teststamm des *Staphylococcus aureus* benutzt hatte, verwendet man jetzt immer mehr *Bacillus subtilis*, da er folgende Vorzüge auf sich vereinigt:

1. Die Sporen sind thermostabil, so daß die Gefahr vermindert wird, daß sie abgetötet werden, wenn man sie in dem heißen geschmolzenen Agar suspensiert.
2. Die Ausgangskultur kann monatelang haltbar gemacht werden, indem man sie in den Kühlschrank stellt, so daß jedesmal von der gleichen Elternkultur Abimpfungen vorgenommen werden können. Man hat dadurch immer das gleiche Ausgangsmaterial, so daß eine wesentliche Fehlerquelle beseitigt wird.

Für die genaue Wertbestimmung ist es notwendig, daß täglich eine Testkurve gezeichnet wird, da die Ergebnisse einzelner Tage sehr schwankend sein können; täglich muß der Faktor des Testes neu bestimmt werden. Diese Testkurve erhält man, wenn man ein Standardpräparat in mehreren Verdünnungsstufen austestet und die Ergebnisse kurvenmäßig erfaßt. Da die Neigungswinkel der Kurve aus bisher noch unbekanntem Grund sich täglich ändern — vielleicht spielt hier der Bortels'sche „Wetterfaktor“ eine Rolle — kann nur das Standardpräparat Auskunft über eine genaue Wertermittlung geben.

Die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Diffusionsmethode hängen weitgehend von der Geschicklichkeit des Experimentierenden ab, daneben noch von einigen anderen Faktoren, die unserem Einfluß entzogen sind. Bei der genauen Testfaktorenermittlung lassen sich einige Unsicherheiten ausschalten, so daß diese Testmethoden vor den anderen stets den Vorrang haben werden.

### c) Die Trübungsmethode

Bei dieser Methode wird die Wachstumsintensität des Testorganismus in den verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums nach seiner Trübungsintensität festgestellt. Der Trübungsgrad wird photoelektrisch gemessen. Als Testorganismus ist nur *Staphylococcus aureus* zu verwenden. Der Test kann bereits nach 2½ bis 3 Stunden ausgewertet werden. Der Trübungstest hat sich zum Nachweis des Penicillins bewährt, ebenso für die Wertbestimmung des Subtilins, während die Loch- und Zylinderteste

für den Nachweis des Streptomycins am besten geeignet sind. Obwohl die Trübungsmethode die Vorteile einer relativ hohen Genauigkeit (beim Penicillin 0,005 Einheiten) und die einer relativ kurzen Inkubationszeit auf sich vereinigt, muß bei dieser Methode doch mit großen Schwierigkeiten gerechnet werden, die ihre Anwendung zur Wertbestimmung bestimmter Antibiotika unmöglich machen und damit die Anwendung der Trübungsmethode stark einschränken.

Die Methode besitzt folgende Fehlerquellen:

1. Da die Methode viel empfindlicher ist als die bisher erwähnten, reagiert sie auch auf Verunreinigungen, die das Wachstum und damit die Trübungsintensität des Testorganismus fördern oder hemmen können.
2. Die Methode ist nicht bei gefärbten oder getrübbten antibiotikumhaltigen Substanzen anwendbar.
3. Unspezifische Farbwechsel oder Änderungen des Trübungsgrades während der Inkubationszeit (hervorgerufen durch eine Änderung des pH-Wertes während des Wachstums des Organismus) können zu einer Fehlbeurteilung des Testes führen.

Diese Methode ist wegen ihrer kurzen Inkubationszeit für die Überprüfung der Bildung bestimmter Antibiotika und ihrer Reinigungs- und Konzentrationsprozesse gut geeignet, nicht aber für spezifische Untersuchungen.

Außer nach den genannten Testmethoden kann man die antibiotische Wertbestimmung auch nach anderen Gesichtspunkten prüfen. So kann auf verschiedene biologische Vorgänge getestet werden; in Frage kommen hierbei der Anti-Luminiscenzeffekt, wobei das Erlöschen der Luminiscenz bei *Photobacterium fischeri* als Endpunkt bestimmt wird, oder es wird getestet auf die Reduktionswirkung von Nitraten zu Nitriten, ferner kann man eine Wertbestimmung durch Messung der Atmungsintensität als Folge der Einwirkung der Antibiotika vornehmen. In der Humanmedizin baut man die Tests auch auf dem Verlust der lytischen und haemolytischen Fähigkeiten der Testorganismen durch die entscheidenden Antibiotikakonzentrationen auf.

Einige Antibiotika, wie Viridin (*Trichoderma viride*), Glutinosin (*Metarrhizium glutinosum*), Gliotoxin (*Trichoderma viride*, *T. lignorum*, *Penicillium terlikowskii*, *P. obscurum*, *Aspergillus fumigatus* mut. *helvola* und *Gliocladium fibrarium*) und Gladiolinsäure (*Penicillium gladioli*) sind viel aktiver gegen Pilze als gegen Bakterien, so daß die bisher genannten Tests, speziell der Verdünnungs- und Trübungstest, nicht angewendet werden können. Die Wertbestimmung der Diffusionsmethode ist möglich, indem man die Testplatte entweder mit einer Sporenaufschwemmung der in Frage kommenden Testpilze besprüht oder von dem Zylinder bzw. Loch aus Impfstiche der Testpilze bis zum Plattenrande zieht. Die letzte Modifikation hat den Vorteil, daß die Wirkung des Antibiotikums auf mehrere Testpilze gleichzeitig untersucht werden kann.

Eine andere zuverlässige und sehr schnelle quantitative Messung der fungistatischen Aktivität ist die Sporenkeimungsmethode nach BRIAN und HEMMING, welche wie folgt ausgeführt wird: eine Sporensuspension von *Botrytis allii*, der meist bei fungistatischen Nachweisen Verwendung



findet, wird nach den üblichen Methoden hergestellt. Nach Filtration der Sporensuspension durch sterile Baumwollgaze, um das in der Suspension befindliche Pilzmycel zurückzuhalten, wird sie evtl. so weit verdünnt, daß sich in einem Kubikzentimeter etwa 500 000 Sporen befinden. Das Kulturfiltrat des Antagonisten, der möglichst in einer Nährlösung gleicher Zusammensetzung wie die des Testorganismus wachsen soll, wird in bestimmten Konzentrationsstufen verdünnt und in einer Menge von 1 : 1 mit der Sporensuspension des Testpilzes vermischt. Drei voneinander getrennte Tropfen dieser Mischung werden auf einen sterilen Objektträger überführt, der in einer Petrischale aufbewahrt wird, die als feuchte Kammer dient. Man läßt das antagonistische Kulturfiltrat 16—18 Stunden bei 25° C auf die Suspension einwirken. Die Tropfen werden unter einem schwachen Objektiv durchmustert und der entscheidende Endpunkt als die Konzentration des antagonistischen Kulturfiltrates festgestellt, die die Sporensuspension noch zu 99 Prozent zu verhindern vermag. Diese Einheit wird als „BA-Einheit“ bezeichnet und wie folgt definiert:

Die BA-Einheit ist die Anzahl der Aktivitätseinheiten in einem Kubikzentimeter, die imstande ist, während einer gegebenen Zeit in einer bestimmten Verdünnung der Originallösung in einem Keimtropfen die Sporenkeimung von *Botrytis allii* oder eines anderen beliebigen, geeigneten Testpilzes gerade noch zu verhindern (99 Prozent). Für weitere Aktivitätsfeststellungen, auch der bakteriostatisch wirkenden Antibiotika, dienen noch die üblichen mikroskopischen Untersuchungen, einschließlich der mikroskopischen Beobachtungen des Stillstandes beweglicher Bakterienzellen, ferner die Feststellung des Erscheinens vergrößerter Zellen oder Involutionsformen der Bakterien, sowie Gestaltsänderungen der Pilzsporen und des Mycels.

Immer wieder macht man die Beobachtung, daß man sich widersprechende Testergebnisse erhält, wenn man das gleiche Antibiotikum nach verschiedensten Testmethoden austestet. Dies rührt daher, daß einzelne Methoden nur für den Penicillin- bzw. Streptomycinnachweis ausgearbeitet wurden und dann ohne die erforderliche Modifikation für die Wertbestimmung anderer Antibiotika verwandt wurden, für deren Nachweis sie jedoch in der vorliegenden Form nicht geeignet waren. Ein Vergleich der Wertbestimmungsergebnisse ist deshalb immer notwendig, vor allen Dingen dann, wenn man mit einem noch nicht näher bekannten Antibiotikum arbeitet. Man stellt dann vergleichsweise Wertprüfungen nach den verschiedensten Testmethoden an und arbeitet mit derjenigen weiter, die die genauesten, reproduzierbaren Werte ergibt.

Nun wäre noch einiges über das Messen der Aktivität, der Feststellung der Einheiten und der Bestimmung des Standardes zu sagen. Als eine Einheit wurde in früheren Arbeiten die höchste Verdünnungsstufe bezeichnet, die den Testorganismus unter den gegebenen Bedingungen gerade noch zu hemmen vermochte. Diese Definition war jedoch nur dann anwendbar, solange nur eine Person die Arbeiten des Testens und des „Ablesens“ versah, führte aber zu Irrtümern, wenn mehrere Personen ihre Ergebnisse miteinander vergleichen wollten. Diese Schwierigkeit blieb auch dann noch bestehen, als der Teststamm einheitlich festgelegt und die Testvor-

schrift immer mehr spezifiziert wurde. Von jedem Forscher und in jedem Labor wurden im Anfang quasi eigene Einheiten definiert. Inzwischen hat man die Einheiten nach zwei verschiedenen Richtungen hin bestimmt. WAKSMANN grenzte die Einheiten auf der Grundlage des Verdünnungstestes wie folgt ab: Die Menge der antibiotikumhaltigen Lösung, die zu einem Kubikzentimeter des Testorganismus zugefügt werden muß, um ihn in seinem Wachstum oder sonst einer wahrnehmbaren Funktion gerade noch zu hemmen, wird als eine Einheit bezeichnet.

Man ist inzwischen immer mehr dazu übergegangen, die Einheiten nach einem absoluten Wert zu definieren, d. h., wenn ein Antibiotikum genügend gereinigt worden ist, hat man dann die Möglichkeit, von einer Gewichtseinheit zu sprechen. X-Milligramm des Antibiotikums sind dann notwendig, den Testorganismus vollständig in seinem Wachstum zu hemmen. Die Potenz der Einheit kann variieren. Je nach dem Fortschreiten der immer weitergehenden Reinigung des Antibiotikums wird die Einheit bis zu einer bestimmten Grenze durch eine immer geringer werdende Anzahl von Milligramm ausgedrückt werden können. Die Einheiten haben bei den einzelnen Testorganismen verschiedene Wertzahlen, so daß immer hinzugesetzt werden muß, welcher Organismus als Testkeim Verwendung fand. So entsprechen 300 *Sarcina lutea*-Einheiten 75 *Bacillus mycoides*- und auch 75 *B. subtilis*-Einheiten, die wiederum weniger als 0,1 *Escherichia coli*-Einheiten beim Penicillin entsprechen. Wird ein Antibiotikum rein dargestellt, wird man nach den heutigen Forderungen seine Einheiten immer in Gramm oder Milligramm ausdrücken. Jedoch werden vielfach noch weiter reichende Forderungen erhoben und zwar, daß, zumindest zu Vergleichszwecken, die Menge und Konzentration in Molekulargewichten ausgedrückt werden sollen, da man an Hand dieser Angabe die Reinheit des Antibiotikums überprüfen kann.

Für Penicillin und Streptomycin wurde der Einheitsbegriff besonders definiert. Für die anderen Antibiotika wurde im allgemeinen folgende Definition gefunden: Eine gewisse Menge Substanz hemmt unter gegebenen Umständen einen bestimmten Testorganismus vollständig.

Da immer wieder die auch in dem gleichen Labor und unter gleichbleibenden Verhältnissen hergestellten Tests bei gleichbleibenden Konzentrationen des Antibiotikums unterschiedliche Wertergebnisse brachten, war man gezwungen, bei jedem Test ein genau bestimmtes Standardpräparat zu Vergleichszwecken mit zu testen. Mit Hilfe des Standardes kann von jedem Test der Faktor bestimmt werden. Die unterschiedlichen Testergebnisse sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Empfindlichkeit der Testorganismen zurückzuführen.

Ursprünglich nahm man als Standardpräparat stets das gleiche Agens. In den letzten Jahren kam man jedoch immer mehr dazu, gezwungen u. a. durch die Instabilität des Penicilliums, des „Standardantibiotikums“, die eine fortwährende Neuanlage des Standardes erforderlich machte, andere stabilere Substanzen von gleicher Wirksamkeit zu verwenden. In Frage kamen Quecksilberchlorid, Phenole oder auch Sulfonamide. Zwar unterscheiden sich diese Substanzen durch den Wirkungsmechanismus, die Spezifität, das Diffusionsgefälle und die Anfälligkeit gegenüber der Zusammensetzung des Nährmediums, die



Änderung des pH-Wertes u. a. von den Antibiotika, jedoch in dem entscheidenden Faktor, dem Verhalten des Testorganismus zu diesen Substanzen laufen sie mit den Antibiotika parallel. Es konnte festgestellt werden, daß die Empfindlichkeit des Testorganismus dem Antibiotikum gegenüber täglichen Schwankungen unterworfen ist, der Testorganismus sich jedoch der Wirkung anderer Substanzen gegenüber vollständig gleichsinnig verhält. Als wichtigste und unumgänglich notwendigste Eigenschaft des Standardes ist seine Stabilität zu bezeichnen. Die Verwendung eines Standardpräparates, das langsam seine Aktivität verliert, ist unvorteilhafter, als wenn man keins zu Vergleichszwecken verwendet. Die Stabilität des Standardpräparates wird wie folgt festgelegt:

1. Einige Standardpräparate werden unter konstanten Temperaturen aufbewahrt und testmäßig miteinander verglichen. Es werden unter den Präparaten immer einige sein, die  $\pm$  stabil als die anderen sind, wenn wohl auch kaum ein vollständiger Aktivitätsverlust zu verzeichnen sein wird. Nach diesen Testergebnissen wird man sich die günstigsten Präparate herausuchen, wird aber auch diese immer weiter unter Kontrolle halten müssen.

2. Mit dem Hauptproberöhrchen, das bei niederen Temperaturen und im Vakuum aufbewahrt wurde, werden Vergleichsteste mit einer anderen Probe angelegt, die eine bestimmte Zeit den Einfluß höherer Temperaturen (24 Stunden bei 100° C) unterworfen wurde. Wenn bei dieser Probe kein Aktivitätsverlust festgestellt wird, ist es wahrscheinlich, daß dieses Standardpräparat für einige Wochen oder Monate seine unverminderte Aktivität beibehalten wird, wenn auch andere Einflüsse, wie Feuchtigkeit, Sauer-

stoff und Licht ebenfalls inaktivierend wirken können und infolgedessen nicht unberücksichtigt bleiben dürfen.

3. Wenn in bestimmten Intervallen gegen einen Standardorganismus getestet wird und eine ständige Abnahme der antibiotischen Wirksamkeit feststellbar ist, ist die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß der Testorganismus dem Antibiotikum gegenüber resistent geworden ist.

Besteht die Möglichkeit, daß mehrere Antibiotika von einem Organismus gebildet werden oder daß in einer Lösung ein Gemisch verschiedener Antibiotika vorliegt, so lassen sie sich manchmal durch einen unterschiedlichen Wirkungsbereich bestimmen. Decken sich jedoch die Wirkungsspektren, so kann der Nachweis der Gegenwart verschiedener Antibiotika mit Hilfe der Papierchromatographie geführt werden. Man hängt die geeigneten Papierstreifen erst in ein organisches Lösungsmittel und dann in die antibiotikumhaltige Lösung. Danach legt man diese Streifen auf eine, mit einem empfindlichen Testorganismus beimpfte Testplatte und bebrütet diese. Durch das unterschiedliche Diffusionsgefälle der Antibiotika werden sich verschiedene hintereinanderliegende Hemmhöfe ergeben, die Rückschlüsse auf die vorhandene Anzahl der Antibiotika gestatten.

Dieser vorliegende Bericht sollte nur einen kurzen Überblick über die biologischen Arbeits- und Prüfungsmethoden der Antibiotika geben. Eine Beschreibung der genauen Methodik sowie der Rezepte und der rein technischen Arbeiten sollen einer eingehenderen Arbeit vorbehalten bleiben. Hier soll dann auch ein Überblick über die gesamte Literatur gegeben werden.

## Ein einfaches Labor-Prüfverfahren für Nematode

Von L. K ä m p f e

Zoologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle und Biologisches Labor des Elektrochemischen Kombines VEB Bitterfeld

Die fortschreitende Verbreitung des Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis* WOLLENWEBER und die damit verbundene Gefahr für den erfolgreichen Kartoffelanbau in der Deutschen Demokratischen Republik haben es notwendig gemacht, in verstärktem Maße die Entwicklung wirksamer chemischer Bekämpfungsmittel von der Fachindustrie zu fordern.

Bei der Erarbeitung solcher nematozid wirkender Mittel ist es unumgänglich, daß eine große Zahl von Labor- und Mittelproben anfällt, die zunächst einer Vorprüfung zugeführt werden muß, um von vornherein aussichtsreich erscheinende Proben von anderen wenig brauchbaren sondern zu können, also eine Art Vorprüfung mit möglichst einfachen Mitteln und in möglichst kurzer Zeit durchführen zu können. Der sicherste Weg, der gleichzeitig unter weitgehend natürlichen Bedingungen steht, ist der Freilandversuch, der aber aus nicht näher darzulegenden Gründen für eine Vorprüfung von grob orientierendem Wert ausscheiden muß.

Um eine möglichst einfache und rasch arbeitende Möglichkeit der Vorprüfung von Mittelproben zu erhalten, wurde in Zusammenarbeit mit dem Elektrochemischen Kombinat VEB Bitterfeld die nachstehend

beschriebene Methodik ausgearbeitet und mit Erfolg angewendet, wobei nochmals darauf hingewiesen sei, daß es sich nur um eine Vorprüfung handelt, die unter Laborbedingungen durchgeführt wird, um brauchbar erscheinende von weniger geeigneten Mitteln möglichst früh zu trennen und Hinweise auf die Stärke der Wirkung zu erhalten. Auf den eingehenderen Topfversuch und die Freilanduntersuchungen wird man später in keinem Falle verzichten dürfen.

Das Prüfverfahren setzt sich aus mehreren Arbeitsgängen zusammen, die in ihrer Reihenfolge so gehalten sind, daß die für den Nematoden schärfste, aber zugleich am weitesten von den natürlichen Bedingungen entfernte Prüfung am Anfang steht.

### I. Tauchversuch

Dazu werden 50 oder besser mehr gut gefüllte Zysten in eine Lösung bzw. Emulsion des betreffenden Mittels in der gewünschten Konzentration gebracht und nach 1, 3, 6, 12 und gegebenenfalls mehr Tagen eine Probe von wenigstens zehn Zysten entnommen, diese gut abgespült und ihr Inhalt auf eventuell eingetretene Schäden untersucht. Dabei empfiehlt es sich, die Zysten nicht zu zerquetschen, sondern vorsichtig das Integument mit zwei Präpa-



riernadeln zu öffnen und den Inhalt freizulegen, der dann einer genauen mikroskopischen Kontrolle zu unterziehen ist.

Infolge der Schwimmfähigkeit vieler Zysten und der Adhäsionswirkung macht es sich nachteilig bemerkbar, daß bei leichten Erschütterungen eine Anzahl von Zysten oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an der Wandung des Glasgefäßes haftet. Um dieses zu vermeiden, werden die Zysten in kleine Glasröhrchen eingelegt, die oben und unten mit einem Mullstück verschlossen werden. Die beiden Mullstücke werden mit Glasringen, die über die Röhrenenden gestreift werden, festgehalten (vgl. Abb. 1). Die Röhrchen, die eine Länge von etwa 2—2,5 cm und einen Durchmesser von 0,6—0,8 cm haben, werden waagrecht in Wägegläschen gelegt.

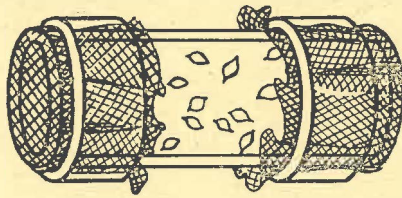


Abb. 1  
Glasröhrchen mit Zysten für den Tauchversuch und für Schlupfversuche. Das Röhrchen ist oben und unten mit Gaze verschlossen, die durch Glasringe festgehalten wird.

Ebenso wie für den Tauchversuch hat sich auch für die unter II—IV angegebenen Tests folgender einfache Zusatzversuch als zweckmäßig erwiesen: In die Vertiefung von Hohlschliffobjekträgern bringt man Eier bzw. freie Larven des Nematoden und setzt einen reichlichen Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit in den gewünschten Konzentrationen zu. Wir verfahren dabei so, daß die Kulturen nicht mit Deckgläschen bedeckt wurden, sondern dies erst im Bedarfsfalle bei der Kontrolle geschah. Um die schnelle Verdunstung zu vermeiden, wurden die Objekträger auf kleine Holzstege in Petrischalen gelegt, die mit befeuchteten Rundfiltern auf dem Boden und an der Deckelinnenseite zu feuchten Kammern hergerichtet waren. Das Auslegen der Deckelinnenseite ist unbedingt erforderlich, da sich dort sonst Kondenswasser ansammelt, das in Tropfen abfällt und die Lösung im Hohlschliff unkontrollierbar verdünnt oder auch verspritzt läßt.

Diese Zusatzprobe soll den Zweck haben, 1. die Wirkung des Mittels auf die des Schutzes durch die mütterliche Zystenwand beraubten Eier und Larven zu zeigen und 2. gleichzeitig die Möglichkeit zu geben, daß für das betreffende Mittel charakteristische Schadbild an Eiern und Larven zu erkennen, um damit für die weiteren Prüfungen einen sicheren und vergleichbaren Anhalt zum Erkennen des vielleicht weniger stark ausgeprägten Schadbildes zu erhalten.

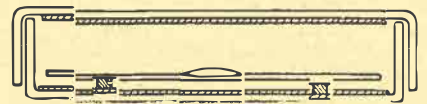
## II. Schlupfversuch

Benutzt man eine größere Anzahl von Zysten (etwa 100 Stück), so kann der Tauchversuch gleichzeitig als Schlupfversuch dienen. Auch hierbei empfiehlt sich der Gebrauch von Glasröhrchen für die Aufbewahrung der Zysten. Die Zahl der geschlüpften Larven wird alle zwei Tage durch Auszählung ermittelt und dazu das Röhrchen entnommen, mit der Wohnflüssigkeit gründlich durchgespült, um an der Gaze anhaftende Larven im Wohnwasser mit zu erfassen. Nach Zentrifugieren des Wohnwassers (= Inhalt des Wägegläschens) wird dieses weitgehend abgehebert und in das Wägegläschen zurückgegeben, der Bodenrest jedoch auf einem gefelderten Objekträger auf ge-

schlüpfte Larven ausgezählt (vgl. KÄMPFE 1953). Es ist bei der Füllung der Wägegläschen darauf zu achten, daß die Flüssigkeitsmenge von vornherein so bemessen ist, daß das Röhrchen auch trotz der geringen Verluste an Flüssigkeit beim Auszählen von dieser allseitig bedeckt bleibt. Bei der Auszählung der Larven achtet man selbstverständlich auf ihre Beweglichkeit, etwa eingetretene Veränderungen im Inneren usw. im Vergleich zu den Kontrollgläsern mit Leitungswasser, die jeweils doppelt angesetzt werden.

Es erscheint mir jedoch zweckmäßiger, im Bedarfsfalle die Schlupfversuche besonders anzusetzen, weil für die Beurteilung der Schlupfaktivierung bzw. -hemmung im allgemeinen geringere Konzentrationen anzuwenden sind als für die Prüfung einer allgemeinen Schädigung des Zysteninhaltes. Außerdem ist für die Prüfung der Schlupfbeeinflussung eine feinere Abstufung der Konzentrationen notwendig, um Fehlschlüsse zu vermeiden. Die Konzentrationsänderung um eine Zehnerpotenz (0,1 Prozent gegenüber 0,01 Prozent) kann bereits eine völlig gegenteilige Reaktion der Larven hervorrufen.

Abb. 2  
Als feuchte Kammer hergerichtete Petrischale zur Prüfung



von Mitteln gegenüber Eiern und Larven auf Hohlschliffobjekträgern.  
Weit gestrichelt: eingelegtes Fließpapier.

Zur Durchführung von Schlupfversuchen ist es im allgemeinen zweckmäßig, mit Zysten des Rübenälchens *Heterodera schachtii* SCHMIDT zu arbeiten, da die Larven hier während des ganzen Jahres schlupfbereit sind, was bei *Heterodera rostochiensis* ja nicht der Fall ist. Eine Nachprüfung mit *Heterodera rostochiensis* ist dann jedoch notwendig, wenn es sich um die Entwicklung eines den Schlupfvorgang spezifisch beeinflussenden Mittels handelt. Die Entwicklung von Mitteln, die den Zysteninhalt oder die im Boden freien Larven schädigen oder abtöten, erscheint aus Gründen der komplizierten physiologischen Reaktionslage der in Frage stehenden *Heteroderen* zweckdienlicher und sicherer.

## III. Fließpapiertest

Gleichzeitig mit den unter I und II beschriebenen Laborprüfungen wird die im folgenden kurz als Fließpapiertest bezeichnete Prüfung durchgeführt. Sie ist für den Nematoden günstiger als die bisherigen, nähert sich also etwas mehr natürlichen Bedingungen und stellt damit an das Mittel bereits höhere Ansprüche. Dabei wird so verfahren, daß in Petrischalen zwischen je zwei Blatt Filterpapier (Rundfilter) eine Anzahl gefüllter und intakter Zysten eingelegt wird, etwa 30 Stück je Petrischale. Die beiden Fließpapierlagen sind vorher mit einer in allen Gläsern des Versuches gleich großen Menge der zu prüfenden Lösung (etwa 2 ccm je Lage) getränkt worden. Dabei soll die benutzte Flüssigkeitsmenge nicht größer sein, als es dem Aufsaugvermögen des Fließpapiers entspricht. Nach 4, 8 und 12 Tagen werden je 10 Zysten je Glas entnommen, diese gut abgespült und nach Freipräparieren des Inhaltes dieser der mikroskopischen Kontrolle zugeführt. Die Zeitabschnitte, zu denen Zysten zur Kontrolle entnommen werden, lassen sich selbstverständlich entsprechend der Eigenart der Proben variieren. Auf die



Notwendigkeit des Ansatzes unbehandelter Kontrollschalen braucht nicht weiter eingegangen zu werden.

Dieser Test hat den Vorteil, daß das Mittel hier weniger direkt auf die Zysten und ihren Inhalt wirkt, sondern gewisse Anklänge an die natürlichen Verhältnisse im Boden zeigt. Bei längerer Versuchsdauer ist es möglicherweise erforderlich, die Fließpapierlagen nochmals zu befeuchten. Diese Prüfmethode hat sich bisher recht gut bewährt.

#### IV. Topftest

Die Mittel, die sich in den Vorprüfungen I bis III als brauchbar erwiesen haben, werden anschließend im Topfversuch geprüft. Hier werden wegen der Adsorptionserscheinungen im Erdreich höhere Konzentrationen Verwendung finden müssen als bisher. In Tontöpfe mit einem Durchmesser von 22 cm und einer Höhe von etwa 20 cm wird Ackererde eingefüllt und während des Einfüllens in bestimmte Tiefen (z. B. 2, 5, 10 und 15 cm, gerechnet von der Erdoberfläche) je ein Beutelchen mit wenigstens 25 Zysten eingebracht. Die Beutel sind mit etwa 1 ccm Erde gefüllt, in die die Zysten eingezählt werden. Als Material für die Beutel wurde von uns früher feine Kupferdrahtgaze benutzt, diese aber wegen einer möglichen oligodynamischen Wirkung des Kupfers durch Perlongewebe ersetzt. Die Maschenweite soll so beschaffen sein, daß die Zysten zurückgehalten werden, jedoch nicht kleiner sein, als daß ausschließende Larven bequem das Gewebe passieren können, und zwar aus Motiven, die unten ihre Begründung finden werden. Die Erdebeutelchen werden nun mit einem festen Faden verschlossen, der so lang ist, daß er bis zur Erdoberfläche reicht und hier mit einem entsprechenden Etikett versehen werden kann. Die Fäden erleichtern das Wiederauffinden der Beutel bei den Kontrollen.

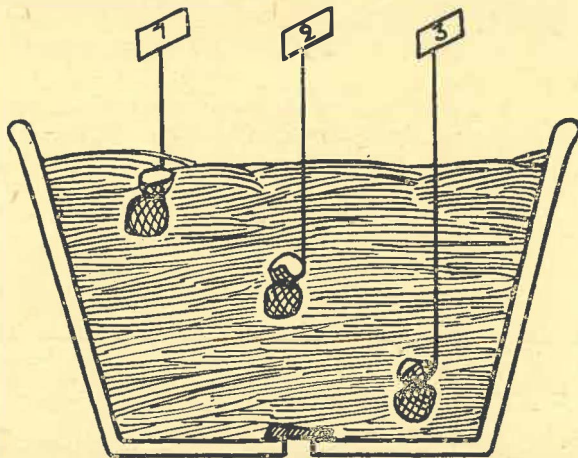


Abb. 3  
Schematische Darstellung eines Topftestes zur Prüfung der Wirkung von Mitteln in verschiedener Bodentiefe.

Nachdem die Töpfe in dieser Weise vorbereitet sind, werden die Mittel in den gewünschten Konzentrationen auf die Oberfläche gegossen, wobei die Aufwandmenge zur Oberfläche des Topfes in Beziehung gesetzt wird.

Nach etwa 5, 10 und 20 Tagen werden aus der gewünschten Tiefe die entsprechenden Beutel entnommen, wobei selbstverständlich mehrere Beutel entsprechend der Zahl der Kontrollen in die gewünschten Tiefen eingebracht wurden, sofern man nicht vor-

zieht, mehrere Töpfe dazu zu benützen. Nach Abspülen und Aufpräparieren der Zysten, die durch Aufschwemmung des Beutelinhaltes in einer Petrischale leicht isoliert werden können, kann festgestellt werden, welchen Einfluß die Wirkungszeit des Mittels und die Tiefe der Zysten im Boden auf die Zysten und ihren Inhalt hinterlassen haben.

Diese Methode eignet sich nach einfacher Variation selbstverständlich ebenso zur Prüfung der Dauerwirkung eines Mittels im Topf und im Freiland, weil die Einwirkungsdauer und das Alter der Mittel im Boden genau definierbar sind.

Benutzt man eine größere Anzahl von Zysten je Beutel (wenigstens 100 Stück), so lassen sich diese nach Wiedergewinnung aus dem Beutel durch Aufschlemmen auch zu Schlüpfversuchen benutzen. Diese geben dann Auskunft über die Schlüpfbereitschaft bzw. -fähigkeit der behandelten Larven nach einer beliebigen Einwirkungszeit des im Boden vorhandenen Mittels. Damit sind Rückschlüsse auf einen möglichen Befall der Wirtspflanzen nach Anwendung der Mittel möglich.

Da neben dem Grad einer eingetretenen Schädigung des Zysteninhaltes und der Entleerung der Zysten auch die Frage nach dem weiteren Schicksal der freigewordenen Larven im Boden unter dem Einfluß der Mittel von großer Bedeutung ist, können durch einfache Änderung der Versuchsanordnung auch diesbezüglich Rückschlüsse erreicht werden. Es ist von nicht zu unterschätzender Bedeutung für die Beurteilung der Qualität eines Mittels, ob die aktivierten Larven, die noch ungeschädigt die Zyste verlassen haben können, durch das im Boden befindliche Mittel so stark geschädigt werden, daß sie bei ihrer Wanderung zur Wirtswurzel vielleicht durch Lähmung diese nicht erreichen oder auf andere Weise am Eindringen in die Wurzel gehindert werden oder ob ein normales Einwandern noch möglich ist.

Dabei werden die Beutelchen mit Zysten in jedem Topf nur in einer Tiefe eingebracht, wobei in mehreren Beuteln je nach Größe der benutzten Töpfe wenigstens 100 Zysten, besser mehr, enthalten sein sollen. Die zur Füllung der Töpfe benutzte Erde muß nematodenfrei sein, was durch Sterilisieren des Bodens leicht zu erreichen ist. Nach Aufgießen des Mittels wird eine Wirtspflanze eingesät; bei Verwendung von Rüben nematoden als Testtiere also Zuckerrüben oder auch Rüben. Ist mit einer Schädigung der Pflanzen durch das Mittel zu rechnen, so kann eine angemessen erscheinende Zeit zwischen Gabe des Mittels und Einsaat der Wirtspflanzen eingelegt werden. Der Topfversuch gibt damit gleichzeitig ein Bild von der jeweiligen Verträglichkeit des Mittels für die betreffende Pflanze.

Nach etwa 20 bis 25 Tagen ist die Einwanderung der Larven in die Wirtswurzeln so weit fortgeschritten, daß neben erst kurze Zeit eingedrungenen Larven bereits die ersten noch sehr jungen weißen Weibchen die Wurzelepidermis sprengen. Die Pflanzen werden nun vorsichtig aus dem Boden genommen, gewaschen und eine bestimmte Anzahl je Topf (etwa 5 bis 10) normale Pflanzen zur Kontrolle ausgewählt. Diese erfolgt durch Auszählen der in die Wurzeln eingedrungenen Larven, wobei die Wurzeln nach den von GOFFART (1951) angegebenen Methoden entweder mit Lugolscher Lösung oder mit Osmiumsäure oder Flemmingscher Lösung behandelt werden, um die eingewanderten Nematoden gut sichtbar zu machen. Im Vergleich zu den Kontroll-



töpfen ist auf die Wirksamkeit des Mittels zu schließen. Es ist zweckmäßig, die Zahl der eingesäten Versuchspflanzen nicht zu groß zu wählen, damit die einzelnen Pflanzen einen möglichst hohen Befall aufweisen.

Außer der Feststellung der Zahl der eingewanderten Larven ist auch hier wieder die Prüfung des Zustandes der Zysten und ihres Inhaltes möglich, die aus den Beutelchen zurückzugewinnen sind. Durch Auszählen der noch in den Zysten befindlichen Larven und Eier lassen sich gewisse Hinweise auf die Entleerung der behandelten und unbehandelten Zysten finden.

Will man sich der Mühe des Sterilisierens der Erde und des Einzählens der Zysten in die Beutel nicht unterziehen, so mag für orientierende Versuche auch die Benutzung gleichmäßig stark verseuchten Bodens ausreichend sein.

Sämtliche Versuche wurden von uns bei +25° C durchgeführt, da diese Temperatur etwa dem Optimum für *Heterodera schachtii* entspricht. Die Variation der Versuchstemperaturen wird sich allerdings in vielen Fällen als notwendig erweisen. Als Versuchstier hat sich *Heterodera schachtii* aus Gründen seiner gleichmäßigeren physiologischen Reaktionsbereitschaft, die sich praktisch über das ganze Jahr erstreckt, als recht zweckmäßig erwiesen, während *Heterodera rostochiensis* für die Testmöglichkeiten II und IV nur zu bestimmten Jahreszeiten brauchbar ist. Die nahe Verwandtschaft beider Parasiten rechtfertigt ihre vikariierende Anwendung im Rahmen einer Vorprüfung.

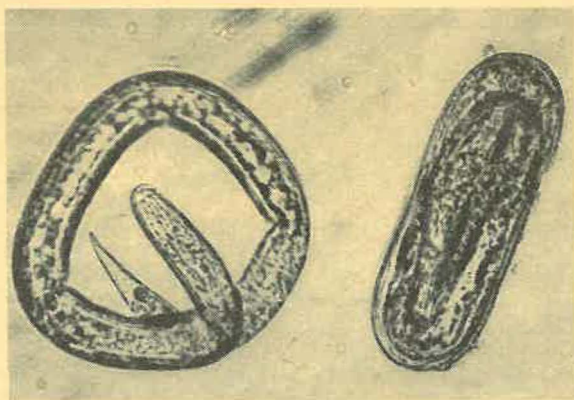


Abb. 4

Durch Einwirkung einer Mittelprobe schon im Ei geschädigte Larve von *Heterodera schachtii* SCHMIDT, die nach Freiwerden aus der Eihülle in atypischen Krümmungen verharrt. Rechts: geschädigtes Ei; etwa 550fach.

Die Frage der Keimschädigung der benutzten Mittel kann zusätzlich in einfachen Keimversuchen auf Fließpapier, das mit dem betreffenden Mittel getränkt ist, geprüft werden.

Alle unter I bis III dargestellten Testmöglichkeiten setzen Mittel voraus, die in flüssiger Form vorliegen, während Nr. IV auch mit festen Stoffen arbeiten kann. Im allgemeinen werden aber Nematozide eine gewisse Wasserlöslichkeit besitzen. Der Fließpapierversuch ist gegebenenfalls auch für feste Wirkstoffe brauchbar, die zwischen beiden Lagen einzustreuen wären. Eine bestimmte Feuchtigkeit muß aber auch dann im Fließpapier herrschen, die übrigens im Ackerboden ja auch ständig vorhanden ist.

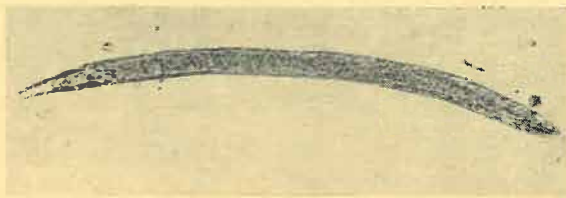


Abb. 5

Abgetötete Larve von *Heterodera schachtii* SCHMIDT mit dunkeler Granulation, die sich auch auf das vordere Körperdrittel erstreckt; etwa 400fach.

#### V. Feststellung eingetretener Schäden

Die mikroskopische Untersuchung und Beurteilung des Zustandes von Eiern und Larven aus behandelten Zysten stellt die schwierigste Aufgabe dar. Wohl ist es bei einiger Erfahrung bald möglich, gröbere Schäden an Eiern und Larven oder den Zysten zu erkennen. Die Eier weisen nach Einwirkung schädigender Mittel vielfach blasige Veränderungen auf, die sich gut vom Normalbild ungeschädigter Eier unterscheiden lassen. Dazu können vakuolenartige Bildungen treten. Weiter in der Entwicklung fortgeschrittene Eier weisen dann auch keinerlei Bewegungen der Embryonen auf. Auf das Vorhandensein von Schäden durch Verpilzungen und andere natürliche Ursachen ist zu achten.

Die Beweglichkeit der Larven kann bei der Beurteilung ihres Zustandes nur sehr bedingt herangezogen werden, da sie bekanntlich längere Zeit im gestreckten Zustand verharren können, ohne ihre Lebensfähigkeit eingebüßt zu haben. Ein brauchbares Indizium für eingetretene Schäden ist die gleichmäßige Erfüllung des vorderen Körperdrittels mit dunkelgranuliertem Inhalt, während normalerweise dieser Körperabschnitt ohne einen solchen ist und die dunkle Körnelung sich nur auf die hinteren beiden Körperdrittel erstreckt. Im Inneren können außerdem blasige Veränderungen auftreten.

Bereits im Ei stark geschädigte oder abgestorbene Larven sind nicht imstande, sich beim Zerreißen der Eihülle normal zu strecken. Sie verharren in atypischen Krümmungen und zeigen destruktive Veränderungen.

Die eben dargestellten Veränderungen dürften als Folge der Einwirkung der Mittel zu deuten sein, die jedoch nicht die primären Schäden darstellen müssen, sondern als durch sie hervorgerufene Zerfallerscheinungen oder Veränderungen in Erscheinung

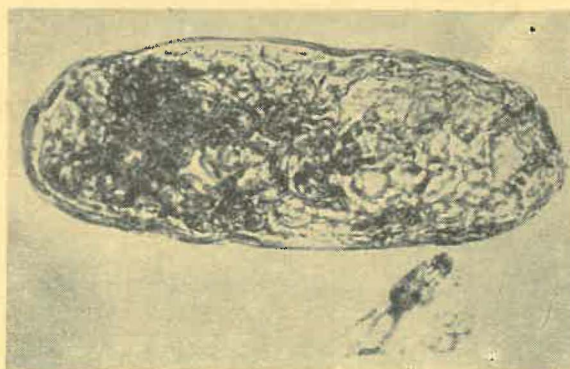


Abb. 6

Schwer geschädigtes Ei von *Heterodera schachtii* SCHMIDT mit weit fortgeschrittenen Zerfallerscheinungen im Inneren, etwa 970fach.



treten. Sie werden deshalb im allgemeinen erst einige Zeit nach Einwirkung der Mittel auftreten.

Zur sicheren Unterscheidung lebender und toter Älchen empfiehlt sich weiter auch die Anwendung und Weiterentwicklung der Fluorochromierung nach HOMEYER (1953) durch Anfärben mit Akridinorange, die jedoch für Kartoffelnematoden vielfach unterschiedliche Ergebnisse gebracht hat. Wir sind bemüht, hier noch eine einfachere zu handhabende Methode zu finden.

Abschließend sei bemerkt, daß sich der Rüben-nematode recht gut zur Durchführung der oben erwähnten Prüfmethode eignet und sich als Testobjekt ohne weiteres benutzen läßt.

Die Methoden mögen hiermit zur Diskussion gestellt werden, wobei bei ihrer Veröffentlichung, die den Charakter einer vorläufigen Mitteilung trägt, davon ausgegangen wurde, die interessierten Fachkreise besonders der Industrie möglichst schnell mit einer Prüfmethode bekannt zu machen, die zur Durchführung von orientierenden Vorprüfungen herangezogen werden kann.

#### Zusammenfassung

Die Notwendigkeit schneller Entwicklung brauchbarer Nematozide erfordert eine einfache Methode zum Aussondern unbrauchbarer Mittelproben im Laborversuch. Dazu wird so verfahren, daß an die Mittelprobe zunehmend höhere Anforderungen bezüglich ihrer Wirksamkeit unter Annäherung an möglichst natürliche Verhältnisse gestellt werden. Als Testobjekt hat sich *Heterodera schachtii* als brauchbar erwiesen.

Der Tauchversuch stellt dabei die unmittelbare Einwirkung des Mittels auf den Nematoden dar. Er kann zum Schlüpfversuch erweitert werden.

Es folgt der Fließpapiertest, bei dem das Mittel von getränktem, feuchtem Fließpapier her auf die Zysten einwirkt.

Schließlich ist der Topftest anzuwenden, der es ermöglicht, sowohl die Wirkung des Mittels im Boden auf die Zyste und ihren Inhalt in bestimmter Tiefe zu prüfen, als auch Rückschlüsse auf die Einwanderungsfähigkeit der Larven in die Wirtswurzeln zu gewinnen. Außerdem gibt er Hinweise auf die Schäd-

lichkeit für die Wirtspflanze und die Dauerwirkung des Mittels.

Es folgen einige kurze Bemerkungen über die Beurteilung der eingetretenen Schäden an Zysten, Eiern und Larven bei der mikroskopischen Kontrolle.

#### Literatur

- Goffart, H. (1937), Richtlinien für die Prüfung von Nematodenmitteln. Mitt. Biol. Reichsanst. 1937, H. 55, 155—164.
- , (1951), Nematoden der Kulturpflanzen Europas. Berlin.
- Goodey, T. (1951), Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Technical Bull. Nr.2.
- Homeyer, B. (1953), Die Unterscheidung lebender und toter Stockälchen (*Ditylenchus dipsaci* Kühn) durch Fluorochromierung mit Akridinorgane. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 5, 8—11.
- , (1953), Die fluoreszenzoptische Vitalanalyse inaktiver Nematoden. Anz. Schädlingsk. 26, 137—140.
- Kämpfe, L. (1953), Untersuchungen zur Zystenbildung bei *Heterodera schachtii* Schmidt (Nematodes). Wiss. Z. Univ. Halle, Math. nat. R., 2, 1952/53, 687—902.
- McBeth, C. W. u. Bergeson, G. B. (1953), Methods of assaying nematocides. Phytopathol. 43, 264—267.
- Nebel, B. (1926), Ein Beitrag zur Physiologie des Rüben-nematoden *Heterodera schachtii* vom Standpunkt der Bekämpfung. Kühn Arch. 12, 38.
- Peters, B. G. (1952), Toxicity tests with vinegar eelworm. I. Counting and culturing. J. Helminthol. 26, 97—110.
- , (1952), Pot tests of nematocides against potato-root eelworm. I. Pilot test and methods. Ann. appl. Biol. 39, 447—456.
- Raski, D. J. (1953), Methods of detecting and investigating plant parasitic nematodes. Phytopathol. 43, 259—263.
- Rensch, B. (1925), Zwei quantitative reizphysiologische Untersuchungsmethoden für den Rüben-nematoden. Z. wiss. Zool. 123, 488—497.

## Die Toxikologie des Phosphorwasserstoffes und die gesetzlichen Bestimmungen für seine Anwendung unter besonderer Berücksichtigung der Schädlingsbekämpfung

Von G. Laue,

Chemische Fabrik Delitia in Delitzsch

### I. Einleitung

Die stürmische Entwicklung der Schädlingsbekämpfung in den letzten beiden Jahrzehnten hat zur Auffindung und Anwendung immer neuer wirksamerer Mittel und Verfahren geführt. Es sei hier nur an die neuen Kontaktinsekticide, die neuen Rotenticide, Begasungsverfahren u. a. erinnert. Mit jedem neuen Mittel taucht aber die Frage auf, inwieweit die neuen Verbindungen und Verfahren in ihrer Anwendung auch für Mensch und Tier direkt oder indirekt gesundheitsschädlich oder giftig sind. Das trifft auch für den im Laufe dieser Entwicklung zur Anwendung gekommenen Phosphorwasserstoff bzw. die Phosphide zu.

Die Toxikologie in der Schädlingsbekämpfung ist wiederholt Gegenstand zusammenfassender Darstellung für das Gesamtgebiet u. a. von Peters (1) oder von Einzelgebieten, z. B. für die Rotenticide von Borgmann (2), Steiniger (3) u. a. gewesen. Nachdem speziell die Chemie und Physik des Phosphorwasserstoffes und seine Anwendung unter besonderer Berücksichtigung der Schädlingsbekämpfung in umfassenden Darstellungen von Laue (4) gewürdigt worden ist, soll seine Toxikologie und die daraus resultierenden gesetzlichen Bestimmungen für seine Anwendung, insbesondere im Hinblick auf die Schädlingsbekämpfung, noch einer Betrachtung unterzogen werden.



## II. Toxikologie

Da der Phosphorwasserstoff speziell auf dem Gebiete der Schädlingsbekämpfung eine so weitgehende praktische Bedeutung erlangt hat, darf seine zweifelsohne vorhandene Giftigkeit nicht außer acht gelassen werden. Die Arbeiten, die sich mit seiner Toxikologie befassen, sind sehr zahlreich und die Untersuchungsergebnisse teilweise widersprechend. Phosphorwasserstoff-Vergiftungen traten nach den Angaben der älteren Literatur in der Hauptsache durch Karbid bzw. bei Schweißarbeiten mit Acetylen, durch Ferrosilicium oder durch Phosphorcalcium aus den Leuchtspitzen der Torpedos auf. Seit Anwendung des Phosphorwasserstoffs und der Phosphide in der Schädlingsbekämpfung als Begasungsmittel und Fraßgift ist die Vergiftungsmöglichkeit wesentlich vermehrt.

Die ältesten Untersuchungen über seine Toxikologie stammen von Nysten (1), der als erster Tierversuche mit Phosphorwasserstoff anstellte, die später von Orfila, Krupp (2) und Liebig (3) nachgeprüft wurden. Ferner haben Munk und Leyden (4) diese Versuche nachgeprüft und auf gewisse Unterschiede zwischen Phosphor- und Phosphorwasserstoff-Vergiftung hingewiesen. Als erster stellte Eulenberg (5) eine gewisse Ähnlichkeit zwischen Phosphorwasserstoff und Arsenwasserstoff in toxikologischer Beziehung fest. Die Versuche ergaben alle teils eine für Phosphorwasserstoff sehr geringe, teils eine sehr starke Giftwirkung und z. T. auch eine Ähnlichkeit mit der Phosphorvergiftung.

Zahlenmäßig machte zuerst Dybkowski (6) genauere Angaben, der bei  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{2}$  Prozent Phosphorwasserstoff in der Atmosphäre nach 8 bis 30 Minuten die Tötungszeit im Tierversuch und auch Einwirkung auf das Blut feststellte. Koschlakoff und Popoff (7) untersuchten ebenfalls die Einwirkung von reinem Phosphorwasserstoff auf Blut, desgl. Scherer (8). In der ausländischen Literatur machte Henderson (9) über Phosphorwasserstoff-Versuche Mitteilung, der in einer halben Stunde 0,2 bis 1 Prozent als tödliche Dosis für Ratten und Kaninchen feststellte. Nach Boehm (10) stellte Briliant (10) fest, daß seine Versuchstiere (Kaltblüter) bei 15 Minuten langem Aufenthalt in 6 bis 7 Volumenprozent Phosphorwasserstoff-Atmosphäre weder sofort noch später irgendwelche Vergiftungserscheinungen erkennen ließen. Wärmblüter dagegen waren wesentlich empfindlicher. 0,5 Volumenprozent töteten nach 25 Minuten langem Aufenthalt eine Katze. Er beobachtete langsamere Absorption vom Magen als von der Lunge und ein tiefes Narkosestadium vor dem Exitus, dazu Kreislaufstörungen und Blutdrucksenkung. Bolstern (11) erkannte aber, daß bei Briliants Versuchen auch Kohlen säureintoxikationen mitgewirkt haben können. Auch von Schulz (12) wird diese Möglichkeit in Betracht gezogen. Er stellte eine Schädigung der Nervenzentren sowie des Rückenmarks fest und beobachtete ein starkes Abnehmen von Puls und Blutdruck. Santesson und Malmgren (13) untersuchten vor allem die Ähnlichkeit und Zusammenhänge zwischen Phosphorwasserstoff- und Phosphorvergiftungen und die Giftwirkung von Jodphosphonium. Sie stellten eine direkte Herzwirkung und bei chronischer Einwirkung eine fettige Degeneration der Leber fest. Weitere Angaben ähnlicher Art macht Kober (14). Jokote (15) stellte fest, daß Phos-

phorwasserstoff wohl sehr giftig ist, daß er aber in kleinen Dosen in einigen Stunden kaum eine Wirkung entfaltet, während eine chronische Einwirkung bei wiederholter Einatmung möglich ist. Für charakteristisch erachtet er nach Hühnfeld (16) Schmerzen in der Zwerchfellgegend. Er berichtet von zwei tödlichen Vergiftungen u. a. nach Dietze (17) in einer Phosphorfabrik. Bahr, Lehnkering (18) und Erben (19) berichten über menschliche Vergiftungsfälle mit Ferrosilicium, wobei sehr hohe Phosphorwasserstoffkonzentrationen vorgelegen haben sollen. Außerdem ist nicht festgestellt, inwieweit Arsenwasserstoff, der meist aus Ferrosilicium mit entsteht, vorhanden gewesen ist. Sie berichten von sechs Todesfällen. Die Arbeit von Böttcher, Stock und Lenger (20) bringt nur Angaben über die Giftwirkung von festem Phosphorwasserstoff, die verhältnismäßig gering ist. Dieser wirkt nur durch die allmähliche Entwicklung von gasförmigem Phosphorwasserstoff. Gadammer (21) erwähnt, daß gasförmiger Phosphorwasserstoff im Organismus rasch zu phosphoriger Säure und Phosphorsäure oxydiert wird.

Eigentlich erst vom Jahre 1911 ab finden sich in der Literatur exaktere Angaben über die Toxizität von Phosphorwasserstoff, was leicht erklärlich ist, da man sich erst nach den auftretenden Vergiftungen durch Ferrosilicium eingehender mit den gewerblichen Vergiftungen durch Phosphorwasserstoff beschäftigt hatte. So gibt Ramboisek (22) an, daß 0,025 Prozent in der Luft für Tiere nach einiger Zeit gefährlich ist, und daß 0,2 Prozent in der Luft schnell tödlich wirken. Beachtenswert ist, daß Ramboisek als erster auf die aus Ferrosilicium entstehenden großen Mengen Arsenwasserstoff aufmerksam machte, wodurch wahrscheinlich viele dem Phosphorwasserstoff zugeschobene, akute Vergiftungen zurückzuführen sind. Er schreibt außerdem, daß leichte Phosphorwasserstoff-Vergiftungsfälle bald in Genesung ohne bleibende Folgen übergehen. Eine französische Arbeit von Welsch-Henri (23) hebt als Symptome der Vergiftung Muskellähmung hervor, Weyl (24) macht ähnliche Angaben. Lehmann-Rubner (25) führen ebenfalls die Vergiftungen durch Ferrosilicium an. Große Dosen werden nach ihren Angaben kurze Zeit ohne Folgen ertragen. Beachtenswert ist die umfassende Arbeit von Meißner (26), der den gesamten Fragenkomplex der Giftigkeit des gasförmigen Phosphorwasserstoffs, der sich in der toxikologischen Literatur angesammelt hat, einer eingehenden Prüfung unterzogen hat. Die Ursache für seine Untersuchungen war eine Notiz von Messinger und Engels (27), die sich chemisch eingehend mit der Darstellung von reinem Phosphorwasserstoff und seiner Einwirkung auf organische Substanzen befaßt haben und angeben, daß sie die angebliche Giftigkeit des Gases beim Einatmen nicht erfahren hätten. Meißner schreibt, daß er auch den Eindruck gewonnen hätte, daß Phosphorwasserstoff nicht den früheren Angaben der außerordentlichen Giftigkeit entspräche. Meißner stellte fest, daß Phosphorwasserstoff wohl in geschlossenen Räumen sehr giftig ist und daß 0,05 Prozent in 25 bis 30 Minuten ein Kaninchen töten, was ungefähr der toxischen Grenze von Schwefelwasserstoff im geschlossenen Raum entspricht. Er ruft Nervenlähmungen hervor und beeinflußt auch das Herz. Weiter gibt er an, daß Phosphorwasserstoff im Gegensatz zu Arsenwasserstoff kein Blutgift ist.



Meißner kommt zu dem Gesamtergebnis, daß Phosphorwasserstoff wohl ein giftiges Gas ist, daß man aber in einer Atmosphäre, in der man Phosphorwasserstoff noch deutlich riecht, sich längere Zeit aufhalten kann, falls der Gasgehalt unter der toxischen Grenze liegt. Außerdem mahnt der charakteristische Geruch ohne weiteres zur Vorsicht. Die Angaben älterer Autoren, daß das Einatmen kleinster, wahrnehmbarer Mengen schon tödliche Wirkung habe, besteht nicht zu Recht, zumal sein intensiver Geruch schon in kleinster Verdünnung das Gas weniger heimtückisch macht als etwa das völlig geruchlose Kohlenoxyd. Labes (28) hat den Mechanismus der  $\text{PH}_3$ -Vergiftung zu klären versucht und seine hämolytische Wirkung bei möglichem Oxydationsvorgang festgestellt, wobei eine Überführung des Phosphidphosphors in die kolloidale Form erfolgt. Heffter und Heubner (29) erwähnen auch die widersprechenden Ergebnisse der älteren Literatur. Als sicher tödliche Dosis geben sie 0,015 Prozent bis 0,025 Prozent Phosphorwasserstoff je Kilogramm Kaninchen nach 15 bis 47 Minuten an. Die Oxydation erfolgt auf Kosten des Blutes. Es erfolgt Lähmung des Atemzentrums; der Blutdruck sinkt; es kommt zur Gefäßverschiebung. In der neueren ausländischen Literatur weisen Henderson und Haggard (30) darauf hin, daß die Toxikologie von akuter Phosphorwasserstoffvergiftung noch nicht genügend untersucht ist. Sie stellen Wirkung auf das Zentralnervensystem fest, bei chronischer Einwirkung Analogie zur Phosphorvergiftung. Flury und Zangger (31) zählen Phosphorwasserstoff zu den giftigsten Gasen, der meist mit Arsenwasserstoff zusammen vorkommt. Die angegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf Angaben von Lehmann und Heß. Naelsund (32) macht Schutzmaßnahmen gegen Arsen- und Phosphorwasserstoffgefahr durch Kaliumpermanganatfilter bekannt. Das Reichsgesundheitsblatt (33) veröffentlicht einen Erlaß über den Handel und Verkehr mit Phosphorwasserstoff abgebendem Ferrosilicium. Lewin (34) weist ebenfalls auf Phosphorwasserstoff-Vergiftungen durch Ferrosilicium hin und gibt toxische Zahlenwerte für den Menschen an. Ein Aufenthalt in einer Atmosphäre von 0,5 Prozent ist als tödlich anzusehen. Ein von ihm mitgeteilter Fall einer Phosphorwasserstoff-Vergiftung durch Hypophosphit beruht evtl. auf einer Phosphorvergiftung und nicht auf einer Phosphorwasserstoff-Vergiftung. Einen menschlichen Vergiftungsfall durch Phosphorwasserstoff aus phosphidhaltigem Karbid teilt Straub (35) mit. Flury (36) hat in einer Übersicht über gewerbliche Vergiftungen den Phosphorwasserstoff in einer tabellarischen Zusammenstellung in tödlichen, gefährlichen und erträglichen Konzentrationen zu anderen Gasen in Vergleich gesetzt und dabei seine wesentlich geringere Giftigkeit gegenüber Arsenwasserstoff festgestellt, wobei u. a. die bei Gasintoxikationen maßgebenden Begriffe, wie Konzentrationsgift, Reizungsgift und Potentialgift, festgelegt werden.

Endlich gibt das Standardwerk über giftige Gase von Flury und Zernik (37) toxische Werte von Phosphorwasserstoff für den Menschen an. 2,8 mg Liter sind als rasch tödlich anzusehen, während 0,14 bis 0,26 mg im Liter  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde ohne sofortige oder spätere Folgen ertragen werden können. Wichtig ist noch die von Flury und Zernik angegebene Geruchsschwelle von 200 mg je cbm für Phosphorwasserstoff. Sie bezeichnen Phosphorwasserstoff als

Nerven- und Stoffwechselgift und schreiben ihm eine Wirkung auf die Blutgefäße zu. Von Schatz (38) werden zwei tödliche Vergiftungen erwähnt, die aber wohl mehr dem Kohlenoxyd als dem Phosphorwasserstoff zuzuschreiben sind. Brezina (39) gibt 100 bis 200 Teile Phosphorwasserstoff je Millionteil Luft für eine Stunde als ohne Schaden ertragbar an und weist darauf hin, daß im Ferrosilicium meist der giftigere Arsenwasserstoff neben Phosphorwasserstoff vorhanden ist und die Vergiftungssymptome praktisch nicht von diesem zu unterscheiden sind. Eine Zusammenstellung über toxische  $\text{PH}_3$ -Werte gibt Junk (40), der auch Angaben über die Aufnahmefähigkeit entsprechender Gasschutzfilter für Phosphorwasserstoff macht. Weber (41) gibt 2,5 Millionstel-Gramm je Liter als ungefährlich, 100 Millionstel-Gramm je Liter  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde ohne sofortige oder spätere Folgen als ertragbar an. Auch hier findet sich der Hinweis auf den giftigen Arsenwasserstoff, der neben Phosphorwasserstoff aus Ferrosilicium entsteht. Über einen Vergiftungsfall mit  $\text{PH}_3$  durch Acetylen berichtet Eichler (42). Deshalb wird auch von Seiten des Arbeitsschutzes und der Unfallverhütung auf die Verwendung von Gasmasken mit Spezialfilter hingewiesen (43).

In der neueren Literatur, die sich mit der Toxikologie des Phosphorwasserstoffs befaßt, sind die Angaben von Wirth (44) und Muntsch (45) zu erwähnen, in der dem Phosphorwasserstoff der Blausäure analoge Vergiftungssymptome zugeschrieben werden und auf die Vergiftungsmöglichkeiten aus Calciumphosphid bei den Torpedoleuchtspitzen hingewiesen wird. Über einen Phosphorwasserstoff-Vergiftungsversuch durch Phosphid per os berichtet Klauer (46). Heering (47) gibt für den Phosphorwasserstoff den Nachweis mit Quecksilbercadmiumjodid und die diesbezüglichen toxischen Grenzwerte an, die sich auf Angaben von Flury und Zernik stützen. Des weiteren wird der Phosphorwasserstoff in toxikologischer Beziehung von Koelsch (48) in bezug auf Phosphorzink und Phosphorkupfer erwähnt. Koelsch (49) bezeichnet in seiner Gewerbehygiene den Phosphorwasserstoff als Stoffwechsel- und Nervengift, welches bei chronischer Einwirkung Anaemie, Bronchitis und Verdauungsbeschwerden verursacht. Phosphorkupferschädigungen (50) durch  $\text{Cu}_3\text{P}_2$  und  $\text{Cu}_2\text{P}$  wurden auch schon früher erwähnt. Von Cazaux (51) wird eine Besprechung der Toxikologie von Zinkphosphid gegeben. Peters (52) gibt das Tödlichkeitsprodukt, das ist das Produkt aus Einwirkungszeit und Konzentration, für Phosphorwasserstoff mit 12 000 an, während es für Schwefelwasserstoff 10 000 beträgt, für Arsenwasserstoff 3000 und für Blausäure 1000. Er zählt den Phosphorwasserstoff zu den Nerven- und Blutkörperchengiften. Geßner (53) berichtet über die Phosphorwasserstoff-Vergiftung bei einer Phosphorwasserstoff-Begasung, bei der eine Frau vier Tage lang ununterbrochen der Einwirkung von Phosphorwasserstoff ausgesetzt war, so daß hier der Zeitfaktor eine wesentliche Rolle spielte. Flury (54) berichtet über die angeblich stärkere Giftigkeit von Phosphorwasserstoff gegenüber der Blausäure. Er schreibt dem Phosphorwasserstoff eine schleichende Giftwirkung zu. Laue (55) konnte feststellen, daß auf Grund der in der Literatur bisher veröffentlichten Ergebnisse dem Phosphorwasserstoff zugeschriebene Vergiftungsfälle vielfach auf Arsenwasserstoff beruhen, und daß infolge der günstig



gelegenen Geruchsschwelle des Phosphorwasserstoffs dieser schon in stärkster Verdünnung wahrnehmbar ist, im Gegensatz zur Blausäure, die außerdem ein außerordentliches Haftvermögen besitzt. Des weiteren berichtet Maenicke (56) über dem Phosphorwasserstoff zugeschriebene Vergiftungsfälle, bei denen sich herausgestellt hat, daß sie durch gleichzeitig vorhandene Stickoxyde bedingt waren. Verhaltensmaßregeln gegenüber der toxischen Einwirkung des Phosphorwasserstoffs bei seiner praktischen Anwendung gibt Lentz (57). In ausführlichem Maße werden Verhaltensmaßregeln und Vorsichtsmaßnahmen gegenüber der toxischen Einwirkung des Phosphorwasserstoffs bei seiner Anwendung in der Schädlingsbekämpfung von Freyberg (58) gegeben, wobei auch die gesetzlichen Bestimmungen für seine Anwendung ausführlich gewürdigt werden. Über die Entwicklung von Phosphorwasserstoff bei der Giftgetreideherstellung als einer Vergiftungsmöglichkeit berichtet Laue (59), während Elbel und Holsten (60) einen Vergiftungsfall durch phosphidhaltigen Staub bei Feldmausbekämpfungsmitteln besprechen. Von einer wohl keinesfalls zutreffenden, schlagartigen Giftwirkung von Phosphorwasserstoff wird von Teitge (61) berichtet. Das Blut spielt eine Rolle als Zwischenträger. Vorhanden ist eine Wirkung auf die Blutgefäße. Eine Erkrankung tritt schon durch kurze Einwirkung ein, die aber ohne Folgen vergeht. Eine durch den Geruch wahrnehmbare Menge schließt nach ihm die Vergiftung nicht aus. Auf die Betriebsgefahren durch Phosphorwasserstoff in der chemischen Industrie wird von Martius (62) hingewiesen.

Von Phosphorwasserstoff-Vergiftungsmöglichkeiten mit Phosphiden bei Tieren, insbesondere bei Vögeln und Wild, wird von Schmidt (63) und Gotink und van Ulsen (64) berichtet. Über die Vergiftungsmöglichkeiten mit durch Phosphide vergifteten Mäusen bei Raubvögeln berichten Freyberg und Laue (65). Die Phosphide werden dabei schon im Körper der Maus zersetzt. Im übrigen besitzen nach Using (66) Eulenvögel keine freie Salzsäure im Magen, können also Phosphide nicht zersetzen. Desgleichen wird über die Zinkphosphidwirkung auf Tiere von Sassenhoff (67), Scheu (68), Vianello (69) und Ballhaus und Krause (70) berichtet. Scheu ermittelte u. a. bei Zinkphosphid eine tödliche Dosis von 50 mg/kg für Mäuse, 40 mg/kg für Hühner, Ballhaus und Krause 500 mg/kg für Hunde. Nach Schander und Coetze (71) beträgt die letale Dosis von Zinkphosphid für Ratten 0,03 bis 0,05 g/100 g Ratte, nach Steiniger und Kreul (72) die Dosis letalis minima 5,5 mg/100 g Ratte. Speziell für die Wanderratte gibt Steiniger (73) 15 mg je 300 g an, für die Katze 100 mg je 2,5 kg, für den Hund 200 bis 500 mg je 5 kg. Weiter macht Steiniger (74) eingehende Angaben über die Toxizität von Zinkphosphid unter besonderer Berücksichtigung seiner Verwendung zur Rattenbekämpfung unter Angaben weiterer Literatur. Heinz (75) gibt 3,76 bis 4,73 mg je 100 g Ratte an und stellt besonders Nieren- und Leberschädigung fest. Zinkphosphidvergiftungen bei Haustieren werden dann auch von Jansch (76) und Scheuhammer (77), der Nachweis im tierischen Organismus von Hofmann (78) besprochen. Borgmann (79) weist in einer Übersicht über die Toxikologie neuer Rodenticide ebenfalls auf Zinkphosphid hin unter gleichzeitigem Hinweis, daß auf

seine Verwendung insbesondere in der Feldmausbekämpfung nicht verzichtet werden kann. Außerdem weist er darauf hin, daß es keine Gaswirkung besitzt. Spezielle toxikologische Studien über Phosphorzink sind u. a. von Johnson und Voss (80) durchgeführt worden. Sie beeinflussen die Wirkung durch Änderung des Magensäuregehaltes ihrer Versuchstiere. Bei chronischer Vergiftung stellten sie Schädigung der Lunge und Leber fest.

Auf die Gefahren des Phosphorwasserstoffs in der Schädlingsbekämpfung wird von Seisser (81) und Schwarz (82) hingewiesen. Für den Acetylenbetrieb weist Smoleczyk (83) auf die Gefahren durch Phosphorwasserstoff und Carbid hin. Untersuchungen über die Phosphorwasserstoff-Vergiftung im Tierversuch sind in neuester Zeit von Müller (84) angestellt worden. Selbst in geringen, an sich ungefährlichen Mengen wiederholt eingeatmet, zeigt der Phosphorwasserstoff kumulative Wirkung und schädigt Lunge, Leber und Nieren. Nach Fühner (85) bestehen Vergiftungsmöglichkeiten durch  $\text{PH}_3$  mit unreinem Acetylen, dem sog. Dissougas, sowie in der Schädlingsbekämpfung aus AlP; es wirkt nicht hämolytisch. Die chronische Vergiftung verläuft wie eine Phosphorvergiftung. Auch Rodenacker (86) weist sowohl auf die Vergiftungsmöglichkeit durch Ferrosilicium, wie in der Schädlingsbekämpfung durch Zinkphosphid und Aluminiumphosphid hin. Nach ihm unterscheidet sich die Wirkung des Phosphorwasserstoffes auf den Organismus nicht von der des Phosphors. Als spezifische Therapie gibt er Behandlung mit Natriumthiosulfat, Calcium Ascorbinsäure, Traubenzucker, Analeptica sowie Sauerstoffatmung an. Jahr (87) weist nochmals auf die Ähnlichkeit der Symptome der Arsen- und Phosphorwasserstoffvergiftung hin. Er gibt an, daß nach Holstein (88) die Beschwerden erst nach Stunden oder Tagen auftreten können und daß nach Baader (89) schon mehr als 0,001% akute Vergiftungen, allerdings ohne Hämolyse im Gegensatz zu Arsenwasserstoff, hervorrufen können. Sehr eingehend ist das Gebiet der Phosphorwasserstoffvergiftung, und zwar der akuten wie der chronischen Vergiftung von Taeger (90) zusammengefaßt worden. Er weist auf die verschiedenen Vergiftungsmöglichkeiten, u. a. auch durch die Schädlingsbekämpfung, hin und hebt die Wirkung auf das Zentralnervensystem hervor; bei chronischer Vergiftung, die bis dahin am Menschen nicht sicher festgestellt war, soll diese der Phosphorvergiftung ähneln. Nach seinen Angaben sind die Phosphorverbindungen erst 1936 in die Verordnung über die entschädigungspflichtigen Berufskrankheiten aufgenommen worden. In einer weiteren zusammenfassenden Toxikologie wird von Fühner, Wirth und Hefter (91) der Phosphorwasserstoff, speziell das Zinkphosphid zur Schädlingsbekämpfung erwähnt. Ferner führt Moeschlin (92) Ferrosilicium und Carbid und Zinkphosphid als  $\text{PH}_3$ -Spender an, unter Hinweis auf Angaben von Rieux und Bouillet (93) und v. Oettingen (94) und Loewenthal (95). Letzterer gibt an, daß subakute Vergiftungen zu Blut- und Lymphstörungen mit Hirn- und Blutschädigungen führen, während chronische Vergiftung direkte irreparable Schädigungen des Zentralnervensystems hervorruft. Erkrankungen durch Phosphorwasserstoff als Phosphorverbindung gehören nach der Verordnung vom 27. Dezember 1947 zu den Berufskrankheiten (96).



Damit dürfte ein ziemlich umfassender Überblick über die gesamte bestehende toxikologische Phosphorwasserstoff-Literatur gegeben sein. Dieser Überblick zeigt zunächst ziemlich widersprechende Angaben. Sie sind bedingt z. T. durch die Versuchsarrangements. Es treten schwankende Zahlenergebnisse bei Tierversuchen mit Phosphorwasserstoff auf, bis endlich das gewerblich häufigere Auftreten von Phosphorwasserstoff-Vergiftungen allmählich zu Zahlenergebnissen führt, die auch für die Toxizität des Phosphorwasserstoffs gegenüber den Menschen Anhaltspunkte geben können. So dauerte es eine geraume Zeit, bis man erkannte, daß die zahlreichen Vergiftungsfälle durch Ferrosilicium vielmehr auf das Konto des giftigeren Arsenwasserstoffs als auf das Konto des Phosphorwasserstoffs zu buchen seien. Auch bezüglich der Zahlenwerte für die Toxizität des Phosphorwasserstoffs kam man erst ziemlich spät zu genaueren Werten, die aber vielfach schwankten.

Bis zum Jahre 1935 sind in der bis dahin veröffentlichten toxikologischen Phosphorwasserstoff-Literatur eigentlich zwei Anschauungen festzustellen; nämlich einmal die von der außerordentlich starken Giftigkeit des Phosphorwasserstoffs und demgegenüber die Anschauung, daß Phosphorwasserstoff durchaus nicht eine so starke Giftigkeit besitze. Die verstärkte Anwendung des Phosphorwasserstoffs in der Schädlingsbekämpfung führte naturgemäß auch zu häufigeren Vergiftungsfällen. Andererseits konnte durch die verstärkte Produktion Phosphorwasserstoff abgebender Produkte von gewerbeärztlicher Seite Material gesammelt werden, um über die tatsächliche Giftwirkung des Phosphorwasserstoffs Klarheit zu schaffen. So hatte sich weiter in der Praxis ergeben, daß Vergiftungsfälle, die man dem Phosphorwasserstoff zuschrieb, durch Stickoxyde bedingt waren. Es zeigt sich also hier, daß ähnlich wie seinerzeit beim Ferrosilicium der Arsenwasserstoff, neben dem Phosphorwasserstoff ein anderes, toxisch stärker wirkendes Gas vorhanden war. Eine langjährige gewerbeärztliche Kontrolle, die sich auf eine laufende Untersuchung der Einwirkung von Phosphorwasserstoff ausgesetzten Personen in bezug auf den Allgemeinzustand, insbesondere Herz und Lunge, sowie auf die Veränderungen des Blutbildes erstreckte, zeitigte das Ergebnis, daß dem Phosphorwasserstoff keine Einwirkung zugeschrieben werden konnte. Nahezu 5000 laufende Blutbildkontrollen im Verlauf von sieben Jahren bestätigten den Befund bezüglich Veränderung des Blutbildes in bezug auf rote und weiße Blutkörperchen. Auch eine Einwirkung auf die Zähne, wie sie beim Phosphor vorhanden ist, war nicht festzustellen. Es zeigte sich dann aber im Verlauf weiterer Jahre, daß bei besonderer konstitutioneller Veranlagung irreparable Schädigungen des Blutbildes (Leukopenie), Störungen der Leukopoese sowie Einwirkungen auf Leber und Galle auftreten können, die z. T. an eine Phosphorschädigung erinnern. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß speziell beim Menschen die Leukocytenzahl nach *Taussig* (97) bei Phosphorvergiftungen regelmäßig abnimmt. Auch Kreislaufstörungen durch Gefäßverengung scheinen auf Grund neuerer Befunde in Betracht gezogen werden zu müssen.

Die in Standardwerken der Literatur angegebenen Zahlenwerte über die Toxicität des Phosphorwasserstoffs lassen aber bei genauer Nachprüfung der zitierten Literaturstellen die Überzeugung aufkommen, daß dieselben vielfach nur aus der Literatur ohne

Nachprüfung übernommen worden sind. Unterzieht man einmal die mit Phosphorwasserstoff vorgekommenen Vergiftungsfälle einer eingehenden Betrachtung, so ergibt sich, daß durch Ferrosilicium u. a. hervorgerufene tödliche Vergiftungen, von denen insgesamt einige 20 Todesfälle in der Literatur von *Eulenber*, *Dietze*, *Bahr*, *Lehnkering*, *Erben*, *Rambousek*, *Lewin*, *Brezina* u. a. erwähnt werden — wobei es sich z. T. noch um die gleichen Fälle handelt —, zum großen Teil einer akuten Einwirkung von Arsenwasserstoff zuzuschreiben sind. Zwei von *Schatz* erwähnte Vergiftungsfälle dürften mehr dem Kohlenoxyd zuzuschreiben sein. Die von *Lewin* erwähnte Hypophosphit-Vergiftung beruht zweifelsohne mit auf der Einwirkung von gelbem Phosphor. Bei den durch Carbid bzw. beim Schweißen mit Acetylen eingetretenen Vergiftungen, von denen vier Fälle von *Lewin*, *Straub*, *Eichler* und *Maenicke* erwähnt werden, dürfte nach den Untersuchungen von *Maenicke* den Stickoxyden vielfach die Hauptgiftwirkung zuzuschreiben sein. Eine chronische oder kumulative Wirkung wurde von *Jokote*, *Santesson*, *Malmgren*, *Lewin* und in neuer Zeit von *Müller* in Betracht gezogen.

Eine akute Einwirkung bei toxisch wirksamen Dosen hat überall da vorgelegen, wo eine Phosphorwasserstoff-Vergiftung im Magen-Darmkanal von Mensch oder Tier stattgefunden hat, wie sie von *Klauer*, *Schmidt*, *Sassenhoff*, *Scheu*, *Vianello*, *Cazaux*, *Jansch*, *Scheuhammer*, *Hofmann* u. a. beschrieben wurde. Bei diesen Vergiftungen ist die Aufnahme der Mittel immer per os erfolgt. Das Vergiftungsbild ähnelt hierbei sehr der Phosphorvergiftung, insbes. bezüglich fettiger Degeneration der Leber. Bei leichteren Vergiftungen trat Durchfall ein; bei akuter und chronischer Vergiftung Einwirkung auf die Leber, Herz, Nieren und Milz.

Die Vergiftungssymptome bei Aufnahme des Phosphorwasserstoffgases durch die Respirationsorgane sind nach *Flury* und *Zernik* bei geringer Konzentration Übelkeit, Mattigkeit, Kopfschmerzen und Erbrechen in der Zwerchfellgegend. Bei schwerer Vergiftung schnelle Betäubung, Lungenödem, Verfettung der Organe. Als wirklich einwandfrei festgestellte Phosphorwasserstoffgas-Vergiftung bleibt eigentlich nur der von *Gessner* beschriebene tödliche Vergiftungsfall übrig.

Hierbei hat der Phosphorwasserstoff ununterbrochen eine sehr lange Zeit, nämlich vier Tage, auf die vergiftete Person eingewirkt; d. h. der Zeitfaktor im Tödlichkeitsprodukt spielte eine wesentliche Rolle. Außerdem ist nach *Muntsch* (98), *Flury* und *Zernik* der Geltungsbereich des Produktes nicht als absolut feststehend zu betrachten. Entgiftung und Ausscheidung im Körper spielen bei den verschiedenen Gasen, insbesondere bei Nerven- und Blutkörperchengiften, eine wesentliche Rolle. Wie hoch die Konzentrationen bei dem Vergiftungsfall tatsächlich gelegen haben, ließ sich nachträglich nicht mehr ermitteln. Die bei Phosphorwasserstoff-Begasungen ermittelten Konzentrationen betragen im Raum 0,0056 Volumenprozent, im Getreide waren diese natürlich höher. Bei dem von *Gessner* besprochenen Vergiftungsfall waren insgesamt 11 Personen betroffen; darunter ein sieben Monate altes Kind, die sich außer dem einen Todesfall sämtlich ohne bleibende Folgen



bald wieder erholen. Bei der tödlichen Vergiftung konnte Lungenödem, Herzerweiterung und Blutüberfüllung in Leber und Nieren festgestellt werden. Der besprochene Vergiftungsfall ereignete sich durch Verkettung besonders unglücklicher Umstände. Es ist jedenfalls einer der wenigen dem Phosphorwasserstoffgas zuzuschreibenden akuten Vergiftungsfälle.

Da der Phosphorwasserstoff heute in großem Maßstabe zum Zwecke der Schädlingsbekämpfung insbes. der Getreide- und Raumentwesung verwendet wird, sei hier nur nochmals kurz darauf hingewiesen, daß eine toxische Einwirkung begasten Getreides oder sonstiger Lebensmittel oder Futtermittel beim Genuß durch Mensch oder Tier auf Grund umfangreicher Untersuchungen nicht auftreten kann. Selbst fetthaltige Stoffe werden nicht beeinflußt. Bei sehr stark wasserhaltigen Stoffen kann höchstens eine geringe Erhöhung des Gesamtphosphorsäuregehaltes eintreten. Vorsichtshalber sollen solche Stoffe bei Anwendung von Phosphorwasserstoff aus dem zu begasenden Raum entfernt werden. Auch stellen begaste Materialien keine Gefahr in bezug auf Adsorption des Gases dar, wie es bei Blausäure der Fall ist, da Phosphorwasserstoff im Gegensatz zur Blausäure keinerlei Haftvermögen besitzt und sehr bald eine Oxydation eintritt. Günstig ist zweifellos für das Arbeiten mit Phosphorwasserstoff die Geruchschwelle die, wie schon erwähnt, bei 2,00 Gamma-mg im cbm liegt. Diese günstige Wahrnehmbarkeitsgrenze des Phosphorwasserstoffs zwischen 0,002 bis 0,004 mg im Liter = 0,00014 bis 0,00028 Volumenprozent warnt rechtzeitig vor dem Gas, weshalb sich bei seiner Anwendung, im Gegensatz zur Blausäure, der Zusatz eines Warn- oder Reizgases erübrigt.

Zweifelsohne ist der Phosphorwasserstoff, insbes. bei hoher Konzentration oder langer Einwirkungszeit, ein starkes Gift; deshalb ist auch seine praktische Anwendung gesetzlich geregelt. Andererseits hat aber die jahrelange Anwendung desselben, besonders zu Begasungszwecken in der Schädlingsbekämpfung, ergeben, daß er doch weit weniger gefährlich ist, als es nach den z. T. unklaren und verworrenen Angaben der toxikologisch-pharmakologischen Literatur erscheinen mußte.

### III. Gesetzliches

Auf Grund der hohen Giftigkeit des Phosphorwasserstoffs ist seine Anwendung gesetzlich besonders geregelt. Das Phosphorwasserstoffgas fällt unter die Verordnung über die Schädlingsbekämpfung mit hochgiftigen Stoffen vom 29. Januar 1919 (1).

Eine weitere gesetzliche Maßnahme, die sich auf den Phosphorwasserstoff bezieht, ist der Erlaß über den Verkehr mit Ferrosilicium vom Jahre 1928 (2).

Für die Schädlingsbekämpfung ist auf die oben genannte Verordnung von 1919 auf Grund einer weiteren Verordnung vom 6. April 1936 (3) über die Verwendung von Phosphorwasserstoff zur Schädlingsbekämpfung Bezug genommen und seine diesbezügliche Anwendung gesetzlich festgelegt. Sie bezieht sich speziell auf die Verwendung des Phosphorwasserstoffs zu Begasungszwecken. Fraßgifte fallen nicht unter diese Verordnung; darauf wird in einer zweiten Verordnung vom 15. 8. 1936 (5) besonders hingewiesen. Eine Erleichterung für die Anwendung von

Phosphorwasserstoff entwickelnden Mitteln bringt die Verwaltungsverordnung des niedersächs. Ministers f. Ernährung, Land- und Forstwirtschaft vom 27. 10. 1950 (4), die widerruflich die Verwendung von Calciumphosphid zur Wühlmausbekämpfung in umfriedeten Grundstücken durch anerkannte Schädlingsbekämpfer gestattet.

Gesetzlich unzulässig und bedenklich ist, die Verwendung von Zink- bzw. Aluminiumphosphid durch Zersetzung mit Säuren zum Ausgasen von Nagetierbauen zu empfehlen (6).

In einem Runderlaß vom 18. 4. 1936 (7) sind dann für die Anwendung von Phosphorwasserstoff zu Begasungszwecken besondere Erleichterungen erlassen worden. Darüber hinaus weist ein Runderlaß vom 2. 9. 1936 (8) darauf hin, daß die erschwerenden Vorschriften für die Feuer- und Explosionsgefahr, speziell für die Phosphorwasserstoffbegasung nach dem Delicia-Verfahren, keine Anwendung finden. Ein Runderlaß vom 12. 10. 1937 (9) weist dann noch auf die Einhaltung besonderer technischer Anwendungsvorschriften beim Phosphorwasserstoff-Verfahren hin, während in Runderlassen vom 25. 11. 1936 (10) und 2. 2. 1937 (11) Gebührenfragen geregelt werden. Im Runderlaß vom 14. 12. 1939 (12) werden Erleichterungen in der Ausbildung von Begasungsleitern für die Anwendung von Phosphorwasserstoff bekanntgemacht. In besonderen Richtlinien über die Bekämpfung des Kornkäfers und anderer Getreideschädlinge im Gesetz- und Amtsblatt von Sachsen-Anhalt (13) wird ebenfalls auf das Phosphorwasserstoff-Kornkäferbegasungsverfahren hingewiesen.

Das sind in kurzen Zügen die gesetzlichen Hinweise und die behördlichen Vorschriften, die die Verwendung des Phosphorwasserstoffs, speziell zu Begasungszwecken, in der Schädlingsbekämpfung regeln.

Daneben galt bisher allgemein für die Verwendung der als Phosphorwasserstoffentwickler auftretenden Phosphide die Polizeiverordnung über den Handel mit Giften vom 11. 1. 1938 (14), wonach die Phosphide, wie Calciumphosphid, Zinkphosphid usw., unter die Abteilung I im Verzeichnis der Gifte zählten. Ihr Erwerb und ihre Anwendung war demnach nur mit einem polizeilich genehmigten Giftschein möglich. Eine Ausnahme bildeten Phosphorwasserstoff entwickelnde Zubereitungen mit höchstens 7 Gewichtsteilen Phosphid in 100 Gewichtsteilen des Präparates, die bei entsprechender Färbung zu Abteilung III im Verzeichnis der Gifte gehörten. Daneben war der Verkehr mit Phosphorwasserstoff entwickelnden Phosphiden auch durch die Polizeiverordnung über den Verkehr mit giftigen Pflanzenschutzmitteln vom 13. 12. 1940 (15) im gleichen Sinne geregelt. Bezüglich der Verwendung von Calciumphosphid zum Ausgasen von Bauen höhlenbewohnender Schädlinge ist bereits auf das diesbezügliche Verbot gemäß der Regierungsverordnung vom 6. 4. 1936 (16) und auf die Erleichterung seiner Anwendung gemäß Verordnung des niedersächs. Ministers f. Ernährung, Land- und Forstwirtschaft vom 27. 10. 1950 hingewiesen worden. In analoger Weise wird die Verwendung der Phosphide durch das



Gesetz über den Verkehr mit Giften (Giftgesetz) vom 6. 9. 1950 (17) und die erste Durchführungsvorschrift hierzu vom 26. 11. 1951 (18) in der DDR geregelt. Das Gesetz berücksichtigt die giftigen Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Auch hiernach gehören die Phosphide, wie Phosphorcalcium, Phosphorzink usw. zur Abteilung I, phosphorwasserstoffentwickelnde Zubereitungen mit höchstens 7 Gewichtsteilen Phosphid in 100 Gewichtsteilen zur Abteilung III des Verzeichnisses der Gifte.

Darüber hinaus sind im Rahmen der angeführten Gesetze und Verordnungen noch eine Reihe besonderer Vorschriften für Handhabung, Verpackung, Lagerung, Kennzeichnung usw. der phosphorwasserstoffabspaltenden Präparate im Rahmen der allgemeinen Bestimmungen für Gifte bzw. giftige Pflanzenschutzmittel gegeben (19). Auf diese wird auch in den entsprechenden Merkblättern und Flugblättern der Biologischen Reichsanstalt, der Biologischen Bundesanstalt, der Landesanstalt für Wasser und Luftgüte u. a. hingewiesen. Sie basieren z. T. auf den Bestimmungen des Reichsjagdgesetzes vom 3. 7. 1934 (21) und beziehen sich u. a. auf Verbot des breitwürfigen Ausstreuens der Köder, das ordnungsgemäße Einbringen derselben in die Nagerbaue, z. B. bei der Feldmausbekämpfung, oder auf entsprechende Sicherung der ausgelegten Giftköder bei der Rattenbekämpfung u. a. m.

Damit sind in den wesentlichsten Punkten die gesetzlichen Vorschriften für die Anwendung des Phosphorwasserstoffes in der Schädlingsbekämpfung angeführt. Sinn und Zweck der gesetzlichen Bestimmungen ist einmal, eine mißbräuchliche Benutzung der Giftsubstanzen — hier der Phosphide bzw. des Phosphorwasserstoffes — zu Suicidversuchen oder Mordzwecken nach Möglichkeit auszuschließen. Zum anderen soll durch die Anordnung des Gesetzgebers erreicht werden, daß die erforderliche Anwendung der Gifte bzw. ihrer Zubereitungen — hier in der Hauptsache zum Zwecke der Schädlingsbekämpfung — so vorgenommen wird, daß Schädigungen von Mensch und Tier weitgehend vermieden werden. Wenn dies beim Phosphorwasserstoff bzw. den Phosphiden als Starkgiften im Vergleich zu anderen Giften trotz umfangreichster Anwendung weitgehend gelungen und speziell beim Phosphorwasserstoff zu Begasungszwecken gegenüber anderen Giftgasen trotz stärkster Anwendung ganz besonders augenfällig ist, dann dürfte dies ein Beweis dafür sein, daß die gesetzlichen Bestimmungen für seine nun schon seit Jahren erfolgende Anwendung eine weitgehende Sicherheit darstellen und damit ihr gesetzgeberischer Zweck erreicht ist.

#### Literatur:

##### I. Einleitung

1. Peters, (1936), Chemie u. Toxikologie d. Schädlbepf.
2. Borgmann, (1952), Hyg. Zool., 193—201.
3. Steiniger, (1952), Rattenbiol. u. Rattenbekpf. einschl. Toxikologie gebräuchl. Nagergifte, Stuttgart.
4. Laue, (1952), Schädlingsbekpf., 186—190. Nachrichtenbl. f. Dtsch. Pflanzenschutzd. 1953, 143.

##### II. Toxikologie

1. Nysten, (1811), Recherches de Physiol. et de Chem. pathol.
2. Orfila-Krupp, (1853), Lehrb. d. Toxikol.

3. Orfila-Liebig, s. b. Eulenberg, 436.
4. Munk-Leyden, (1865), Die akute Phosphorvergiftg., 103.
5. Eulenberg, (1865), Lehre v. d. schäd. u. giftig. Gasen, 467.
6. Dybkowsky, (1866), Mediz.-chem. Unters., 69.
7. Koschlakoff-Popoff, (1867), Cbl. f. d. med. Wissenschaft, 405.
8. Scherer, (1867), Jahresber. Leistgen u. Fortschr. i. d. ges. Med., 13.
9. Henderson, (1879), J. of Anatomy and Physiol., 13, 109.
10. Böhm-Briliant, (1882), Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol., 15, 439, Diss. Petersburg. 1881.
11. Boltens Stern, Diss. 1889.
12. Schulz, (1890), Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol., 314, 333, 335.
13. Santesson-Malmgren, (1904), Skand. Arch. Physiol., 444—450.
14. Kobert, (1893), Lehrb. d. Intoxikat., 430.
15. Jokote, (1904), Arch. f. Hyg., 301—303.
16. Hühnfeld, Arch. f. med. Erfahr., 56, 789—794.
17. Dietze, Württembg. Correspondbl., 22, 52.
18. Bahr-Lehnkering, (1906), Vierteljahresschr. ger. Med., 126.
19. Erben, (1909), Handb. d. ärztl. Sachverständigentätigkeit.
20. Böttcher, Stock, Langer, (1909), Ber. dtsh. chem. Ges., 2839.
21. Gadamer, Lehrb. Toxikol., 57.
22. Rambousek, (1911), Vergiftg., 244.
23. Welsch-Henri, (1913), Cbl. ges. inn. Med., 229.
24. Weyl, (1913), Handb. d. Hyg., 7. Bd., 523, 579, 802.
25. Lehmann-Rubner, Handb. Hyg., 173—174, 358.
26. Meissner, (1924), Z. ges. exp. Med., 272. Meissner-Stross, (1925), Dtsch. Z. ges. ger. Med. 334—335.
27. Messinger-Engels, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 21, 326—336.
28. Labes, (1926), Dtsch. med. Wochenschr., 52, 2152—2154, 2192—2193.
29. Heffter-Heubner, (1927), Handb. exper. Pharmakol., 614.
30. Henderson-Haggard, (1927), Noxious Gases, 188.
31. Flury-Zangger, (1928), Lehrb. Toxikol., 32, 160, 161, 256, 267.
32. Naelsund, (1928), Münch. med. Wochenschr., 75.
33. Reichsgesb., 1928, 3. Jg.
34. Lewin, (1929), Gifte u. Vergiftg., 172.
35. Straub, (1930), Vergiftfälle — Führer, 115.
36. Flury, (1928), Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol., 138.
37. Flury-Zernik, (1931), Schäd. Gase, 109, 170.
38. Schatz, (1931), Arch. Kriminalog., 52.
39. Brezina, (1932), Gewerbl. Vergift. u. Bekämpfg., 29, 131—134.
40. Junk, (1933), Tabulae Biolog. Period. Bd. III/IX, 264—265, 280.
41. Weber, (1934), Cbl. Gewerbehyg. u. Unfallverhütung.
42. Eichler, (1934), Führers Sammlg. Vergiftfällen 5. Abt. B, 23—26, C 1936, I., 3539.
43. Chem. Ind., 1934, 2, 38.
44. Wirth-Muntsch, (1935), Gefahren d. Luft u. Bedämpfg. 45.
45. Muntsch, (1936), Leitfaden Patholog. u. Therap. Kampfstoffkrankg., 119.
46. Klauer, (1935), Dtsch. Zeitschr. ges. ger. Med., 43—45.
47. Heering, (1936), Gasmasken, 32, 88—89.
48. Koelsch, (1936), Chem. Fabr., 427.



49. Koelsch, (1937), Lehrb. Gewerbehyg. Stuttgart, 222.
50. Jahresber. Berufsgen., 1933—34. Chem.-Ztg., 1938, 33.
51. Cazaux, Bull. Trav. Soc. Pharm., 71, 42—50. C 1933, II., 1403.
52. Peters, (1936), Chem. u. Toxikol. Schädlingsbekpfg., 44, 47, 58.
53. Gessner, (1937), Führer Sammlg. Vergiftfällen 8. Abt. B, 13—18. C 1937, I., 3826.
54. Flury, (1937), Anz. Schädlingskd., 26—28.
55. Laue, (1937), Z. Hyg. Zool., 275—280.
56. Maenicke, (1937), Gasmasken, 46—47.
57. Lentz, (1937), Schädlingsbekämpfung m. hochgift. Stoffen, Berlin.
58. Freyberg, (1938), Anleitung z. Anwendung. Delicia-Kornkäferbegas., II. Aufl.
59. Laue, (1938), Z. Hyg. Zool., 300—301.
60. Elbel-Holsten, (1936), Dtsch. Zeitschr. f. ges. ger. Med., 26, 178—180.
61. Teitge, (1938), Chem.werker.
62. Martius, (1939), Betriebsgefahren chem. Indust. Berlin, 209, 233, 336.
63. Schmidt, (1938), Berl. tierärztl. Wochschr., 423.
64. Gotink-van Ulsen, (1952), Tijdscher. Tiergeneerskd., 77, 214—215, C 52, 5616.
65. Freyberg-Laue, (1939), Nachrichtenbl. f. Dtsch. Pflanzenschutzd., 9—10.
66. Usinger, (1951), W. u. Hund, 315.
67. Saassenhoff, (1939), Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk., 513—517. Berl. Münch. tierärztl. Wochschr., 484.
68. Scheu, (1939), Diss. München.
69. Vianello, (1939), La Clie. Veter. Berl. Münch. tierärztl. Wochschr., 62. Jg., 684—687, 509.
70. Ballhaus-Krause, (1950), Dtsche Tierärztl. Wochschr., 398—400 (1951), 220—221.
71. Schander-Goetze, (1930), Cbl. Bakt., II. Abt., 260—284, 335—367, 481—501.
72. Steiniger-Kreul, (1948), Taschenb. Schädlingsbekpfgmitt., 26—30.
73. Steiniger, (1952), Prakt. Schädlingsbek., 23.
74. Steiniger, (1952), Rattenbiol. u. Rattenbekämpfung einschl. gebräuchl. Rattenmittel, Stuttgart, 92—94.
75. Heinz, (1951), Anz. Schädlingskd., 92—93.
76. Jansch, (1940), Wiener tierärztl. Monatsschr., 531—536.
77. Scheuhammer, (1950), Wiener tierärztl. Monatsschr., 31. Monatsh. f. Vet. Med., 1951, 159.
78. Hofmann, (1940), Diss. Wien, Eigenber. Diss. 1939—1940, tierärztl. Hochsch. Wien. 1940. Berl.—Münch. tierärztl. Wochschr. 1942.
79. Borgmann, (1952), Hyg. Zool., 193—201.
80. Johnson, Voss, (1952), J. Amer. Pharmacol. Assoc. (41), 9, 468—472. Hyg. Zool., 1952, 309.
81. Seisser, (1940), Gesing., 550.
82. Schwarz, (1940), Hyg. Zool., 81.
83. Smolczyk, (1940), Gasmasken, 69.
84. Müller, (1940), Naunyn Schmied. Arch. exper. Pathol. u. Pharmacol., 195, 184—193. C 1940, II., 3063. Arch. Hyg. u. Bakt., 129, 286—292, 1943. C 1943, I., 2518.
85. Fühner, (1943), Med. Toxikolog., 58.
86. Rodenacker, (1951), Chem. Gewerbekrankh. u. Behandlg. Leipzig, 123—124. Arbeitsmed. Abhdlg. ü. Berufskrankht. u. Vergütg., 12.
87. Jahr, (1953), Gesdienst, 268—270.
88. Holstein, (1949), Grundriß d. Arbeitsmed. Leipzig.
89. Baader, (1931), Gewerbekrankh. Berlin—Wien.
90. Taeger, (1941), Klinik d. entschädigungs-pflichtig. Berufskrankheiten, Berlin, 54—58.
91. Fühner, Wirth, Heffer, (1951), Medizin. Toxikologie, 3. Aufl. Stuttgart.
92. Moeschlin, (1952), Klinik u. Therapie d. Vergiftungen, Stuttgart.
93. Rieux-Bouillet, (1948), Traité des maladies professionnelles. Paris, 48.
94. v. Oettingen, (1947), Publ. Health, Rep. Suppl. Nr. 203, Washgt.
95. Loewenthal, (1948), Bull. schweiz. Akad. Wiss., 4, 280—286.
96. Verord. 27. 12. 47. Gesdienst. Jg. 3, 253—254.
97. Taussig, (1927), Heffer-Heubner, 3. Bd., 575.
98. Muntzsch, (1936), Kampfstoffkrankg., 23—24.

### III. Gesetzliches

1. Reichsgesbl., 1919, I., 165.
2. Reichsgesundhbl., 1928, 3. Jg.
3. Reichsgesbl., 1936, I., 360. Amtl. Pflanzenschutzbest., 1936, 72.
4. Verwaltanordn. niedersächs. Min. Ernähr. Landw. 27. 10. 50. Schädlingsbekpfg., 1951, 47—48.
5. Reichsgesbl., 1936, I., 637. Amtl. Pflanzenschutzbest., 1936, 137.
6. Steiniger-Kreul, (1948), Taschenb. Schädlingsbekpfg., 46.
7. Amtl. Pflanzenschutzbest., 1936, 74. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1936, 43.
8. Amtl. Pflanzschutzbest., 1936, 180. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1936, 467.
9. Amtl. Pflanzschutzbest., 1937, 170. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1937, 755.
10. Amtl. Pflanzschutzbest., 1937, 2. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1936, 628.
11. Amtl. Pflanzschutzbest., 1937, 22. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1937, 189.
12. Amtl. Pflanzschutzbest., 1940, 4. Reichsminbl. Landw. Verwalt., 1939, 1309.
13. Gesetz- u. Amtsbl. Sachs.-Anh., 1951, Nr. 1, 2.
14. Amtl. Pflanzschutzbest., 1938, 8.
15. Amtl. Pflanzschutzbest. 1940, 25. Reichsgesbl., 1940, I., 349.
16. Reichsgesbl., 1936, I., 300.
17. Gesbl. d. DDR Nr. 1, 1950, 2.
18. Gesbl. d. DDR Nr. 141, 1951, 1108—1114.
19. Wührer, (1940), Verkehr m. giftig. Pflanzschutzmitteln, Leipzig
20. Sachtleben, (1942), Flugblatt Nr. 13 der BRA, 10. Aufl., 3.  
Miestinger, (1941), Flugblatt Nr. 98, 5. Aufl., 9—10.  
Mehl, (1950), Flugblatt C 5, BZA Braunschweig, 1. Aufl., 7—10.  
Mehl, (1950), Flugblatt C 4, BZA Braunschweig, 1. Aufl., 10—11.  
Saling, (1941), Merkblatt Nr. 12, Landesanst. Wasser u. Luftgüte, Berlin, 2. Aufl., 9—11.
21. Reichsgesetzbl. (1934) I. Nr. 73, 549, Amtl. Pflanzschutzbest. (1934), Bd. VI. Nr. 5, 78—86.  
Mitschke-Schäfer, (1935), Das Reichsjagdgesetz, 2. Aufl. Berlin, 35, 78.

Herausgeber: Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin — Verlag Deutscher Bauernverlag, Berlin C 2. Am Zeughaus 1/2; Fernsprecher: 20 04 41; Postscheckkonto: 439 20. — Schriftleitung: Prof. Dr. A. Hey, Kleinmachnow, Post Stahnsdorf bei Berlin, Stahnsdorfer Damm 81. — Erscheint monatlich einmal. — Bezugspreis: Einzelheft 2,— DM. Vierteljahresabonnement 6,— DM einschließlich Zustellgebühr. — In Postzeitungsliste eingetragen. — Bestellungen über die Postämter, den Buchhandel oder beim Verlag. — Anzeigenverwaltung: Deutscher Bauernverlag, Berlin C 2, Am Zeughaus 1/2; Fernsprecher: 20 04 41; Postscheckkonto: 443 44. — Veröffentlicht unter Lizenz-Nr. 1102 des Amtes für Literatur und Verlagswesen der DDR. — Druck: (13) Berliner Druckerei, Berlin C 2, Dresdener Straße 43. Nachdrucke, Vervielfältigungen, Verbreitungen und Übersetzungen in fremde Sprachen des Inhalts dieser Zeitschrift — auch auszugsweise mit Quellenangabe — bedürfen der schriftlichen Genehmigung des Verlages.