

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

## Zum spezifischen Nachweis von *Bacillus thuringiensis* in Bodenproben

### Specific determination of *Bacillus thuringiensis* in soil

Von A. Krieg

#### Zusammenfassung

Zur Isolierung von *Bacillus thuringiensis* (= *B. t.*) aus natürlichen Substraten, wie z. B. Erde, ist die Verwendung geeigneter Selektiv-Nährböden indiziert, um Begleitbakterien zu unterdrücken. Solche Medien enthalten Antibiotika, wie z. B. Polymyxin B und Penicillin G, die Stämme der *B. cereus/B. t.*-Gruppe in ihrem Wachstum nicht stören. Für die anschließende Diagnose von *B. t.* (gegenüber *B. cereus*) ist es jedoch notwendig, parasporale Körper oder Kristalle in den sporulierten Zellen jeder verdächtigen Kolonie mikroskopisch nachzuweisen. Mit dieser Methode konnte festgestellt werden, daß es sich bei *B. t.*, im Gegensatz zu *B. cereus*, nicht um einen ubiquitären Bodenkeim handelt. Auch nach einer Feldanwendung von *B. t.* war dieser im Boden eines behandelten Feldes zwei Jahre später nicht mehr nachweisbar. – Um im Verlauf von ökologischen Studien das Schicksal von *B. t.* in der Natur leichter verfolgen zu können, wurde eine Mutante verwendet, die gegenüber weiteren Antibiotika (wie Chloramphenicol) resistent ist und somit auf Spezialplatten mit korrespondierenden Antibiotika zu wachsen vermag (auf denen jedoch andere Bakterien einschließlich anderer Stämme der *B. cereus/B. t.*-Gruppe unterdrückt werden). Mit dieser Technik konnte bei Versickerungsversuchen gezeigt werden, daß *B. t.*-Sporen in einem Laborlysimeter Erdsäulen von 30 cm Länge nicht zu durchdringen vermögen.

#### Abstract

For isolation of *Bacillus thuringiensis* (= *B. t.*) from natural sources, e.g. soil, it is indicated to use selective media which suppress associated bacteria. They may contain antibiotics as polymyxin B and penicillin G which do not prevent the growth of strains of the *B. cereus/B. t.* group. For subsequent diagnosis of *B. t.* (in contrast to *B. cereus*) it is necessary to demonstrate parasporal bodies or crystals in sporulated cells of each suspicious colony by microscopical examination. Using this method it could be demonstrated that *B. t.* is not a usual soil bacterium in contrast to *B. cereus*. Even after its application for pest control, *B. t.* could not be found in the soil of a treated field two years later. – For the enumeration of *B. t.* in connection with ecological studies a mutant was used which is resistant to further antibiotics (e.g. chloramphenicol) and, therefore, able to grow on special plates containing the corresponding antibiotics (which suppress all other bacteria including other strains of the *B. cereus/B. t.*-group). With this technique model experiments for elucidating the penetration dynamics of *B. t.* in soil were carried out. By lysimeter tests it was shown that the spores could not penetrate soil columns with a length of 30 cm.

#### Einleitung

In dem Maße wie kommerzielle Präparate von *B. thuringiensis* (= *B. t.*) zur Bekämpfung von Schadraupen in der Land- u. Forstwirtschaft und zur Bekämpfung von Mückenlarven im Hygienebereich heangezogen werden, gewinnt der Nachweis von *B. t.* auf behandelten Substraten und in der Umwelt an Bedeutung.

*B. t.* ist nahe verwandt mit dem ubiquitär im Erdboden vorkommenden *B. cereus*, von dem er sich aber nur durch die Bildung eines insektizid wirkenden parasporalen Kristalls unterscheidet.

*B. t.* ist immer wieder aus kranken oder toten Insektenlarven isoliert worden, speziell Schmetterlingslarven oder Mückenlarven. Aber auch außerhalb von Insekten kommt *B. t.* gelegentlich vor; sei es, daß Substrate wie Getreide und Getreideprodukte mit entomogenem (aus Kadavern oder Faeces stammendem) *B. t.* natürlicherweise kontaminiert sind, sei es, daß es sich um *B. t.*-Rückstände von Bekämpfungsmaßnahmen z. B. auf Mais- oder Kohlblättern handelt.

Darüber hinaus ist im Zusammenhang mit der Verwendung von *B. t.* zur Insektenbekämpfung sein Verhalten in der Umwelt, speziell das Schicksal seiner Sporen im Boden und im Wasser, Gegenstand von ökologischen Untersuchungen (vgl. KRIEG, 1978, ENGLER et al., 1980). In jedem Falle ist es wichtig, bei solchen Untersuchungen *B. t.* sicher von seinen Begleitkeimen zu differenzieren.

#### 1. Isolation von *B. thuringiensis* aus Erdproben

Selektiv-Nährböden zum Nachweis von *B. t.* sollen Bakterien, die nicht zur *B. cereus*-Gruppe gehören, weitgehend unterdrücken. Erstmals empfahl DONOVAN (1958) zur selektiven Erfassung von *B. cereus* Polymyxin B als Zusatz, welches vor allem Gram-negative Bakterien hemmt. Eine Zugabe von Penicillin G kann zusätzlich eine Reihe von Gram-positiven Bakterien, einschließlich *Bacillus anthracis*, unterdrücken. So verwendeten SALEH u. Mitarb. (1969) einen Polymyxin B<sup>1)</sup> + Penicillin G<sup>2)</sup>-Nähragar (= NPP-Agar) zum Nachweis von *B. t.* in Erdproben. Das von HOLBROOK u. ANDERSON (1980)

<sup>1)</sup> 5 ppm Polymyxin B-sulfat

<sup>2)</sup> 4 ppm Penicillin G

Tab. 1. Vergleich von Gesamtkeimzahl und Sporenzahl bei 2 Erdproben (unbehandeltes bzw. behandeltes Maisfeld) auf verschiedenen Nährmedien

Vorbehandlung der Bodenprobe	Nährmedium	Keime pro Gramm Boden		
		Anzahl erfaßt:	Bodenprobe aus unbehandeltem Feld	Bodenprobe aus 2 Jahre zuvor mit <i>B. t.</i> behandeltem Feld
ohne erhitzt	Nähragar	Gesamt-Keime	$2,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
	Nähragar	Gesamt-Sporen	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
ohne erhitzt	NPP-Agar	PP-resist. Keime	$2,4 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
	NPP-Agar	<i>B. c.</i> -/ <i>B. t.</i> -Sporen	$2,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
ohne erhitzt	PEMBA	P-resistente Keime	$4,3 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$
	PEMBA	<i>B. c.</i> -/ <i>B. t.</i> -Sporen	$5,4 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$

P = Polymyxin; PP = Polymyxin + Penicillin

als *B. cereus*-Selektivmedium empfohlene PEMBA-Medium enthält neben Polymyxin B noch weitere Zusätze, um auf fehlende Mannit-Fermentation<sup>3)</sup> und vorhandene Lezithinase-Produktion<sup>4)</sup> zu prüfen, also Eigenschaften, die den meisten Stämmen der *B. cereus*/*B. t.*-Gruppe zukommen, im Gegensatz zu *Bacillus megaterium* und *B. anthracis*.

**1.1 Material und Methode**

**Proben:** Erdproben (Zylinder von 20 cm Tiefe und 1,2 cm Durchmesser) wurde in der Nähe von Darmstadt (Klein-Rohrheim) auf ausgesuchten Feldern mittels Bohrstöcken ausgestochen. Es handelte sich dabei um Proben (a) von einem unbehandelten Maisfeld und (b) von einem benachbarten Maisfeld, das zur Maiszünsler-Bekämpfung 2 Jahre zuvor mit *B. t.* (DIPEL 2 kg/ha) behandelt worden war. Jeweils 10 g der zuvor gut durchmischten Erdproben wurden mit sterilem Phosphatpuffer (pH 7,2) auf 100 ml aufgefüllt und die Aufschwemmung 1/2 Std. auf einem Reziproschüttler geschüttelt. Dann wurde die jeweilige Suspension (stets unter Schütteln) zur Keimzahlbestimmung in Stufen 1:10 mit sterilem Phosphat-Puffer verdünnt.

**Keimzahl-Bestimmung:** Sie erfolgte nach dem Prinzip des Kochschen Plattenverfahrens auf verschiedenen Nährböden (s. u.), wobei aus relevanten Stufen einer Verdünnungsreihe (1:10) jeweils 1 ml Suspension pro Platte verwendet wurde. Bebrütung erfolgte bei 30 °C und die Ablesung nach 24 Std. und 48 Std.

**Sporenzahl-Bestimmung:** Zur Abtötung der nicht thermoresistenten vegetativen Zellen wurden die entsprechenden Suspensionen vor dem Ausplatten im Wasserbad (unter Schütteln) 20 min auf 80 °C erhitzt.

**Nährmedien:** (1) Nähragar auf Hefeextrakt-Basis (Merck)  
 (2) NPP-Agar (nach SALEH et al., 1969)  
 (3) PEMBA-Medium (nach HOLBROOK u. ANDERSON, 1980).

***B. t.*-Identifizierung:** Sporulierte Kolonien wurden mikroskopisch im Phasenkontrast auf Kristallbildung untersucht.

**Determination der Isolate:** Sie erfolgte biochemisch und serologisch; Determinations-Schema bei DEBARJAC (1981).

**1.2 Ergebnisse**

Die Untersuchung von Erdproben aus (a) einem unbehandelten und (b) einem vor 2 Jahren mit *B. t.* behandelten Maisfeld

<sup>3)</sup> Zusatz von Mannit (1 %ig) und von Bromthymolblau als pH-Indikator

<sup>4)</sup> Eigelb-Zusatz zur Prüfung auf Lezithinasewirkung

auf ihren Gehalt an *B. t.* bzw. *B. cereus* erfolgte parallel auf normalem Nähragar, NPP-Agar und PEMBA-Medium. Um vergleichend zur Gesamtkeimzahl die Sporenzahl zu ermitteln, wurden die Proben nativ und erhitzt untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. – Hiernach lag die Masse (ca. 90 %) der mit unserer Methode (reichhaltige Nährböden, Bebrütung bei 30 °C und kurzfristiger Ablesung) im untersuchten Boden des Maisfeldes (humoser lehmiger Sand) erfaßten Bakterien in Sporenform vor, wobei auf normalem Nähragar fast eine Zehnerpotenz mehr an Sporenbildnern anwuchs als auf NPP-Agar bzw. PEMBA-Medium. Bei den auf diesen Selektivnährmedien nicht wachsenden Sporenbildnern handelte es sich um solche, die nicht zur *B. cereus*-Gruppe gehören. Bei Verwendung von PEMBA-Medium war die Erkennung von Angehörigen der *B. cereus*/*B. t.*-Gruppe anhand ihrer „blauen Kolonien“ mit Präzipitathof überzeugend.

Bemerkenswert ist vor allem der Befund, daß sich bei der Untersuchung von Erdproben kein auffallender Unterschied in der Sporenzahl zwischen dem unbehandelten und dem behandelten Feld ergab. – Bei der mikroskopischen Analyse von *B. t.*-verdächtigen Kolonien war weder in Proben aus dem unbehandelten Feld noch in solchen aus dem behandelten Feld Kristallbildung nachweisbar bis auf eine Ausnahme (vgl. Diskussion). Hierbei handelte es sich um ein Vorkommen in einer Erdprobe aus dem unbehandelten Feld. –

Auch in anderen von uns untersuchten Erdproben war *B. t.* im Gegensatz zu *B. cereus* nicht nachweisbar, speziell nicht in den von der landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsstation Speyer für Versickerungsversuche (s. Abschnitt 2) bezogenen Standard-Böden.

Tab. 2. Versickerungs-Verhalten der Sporen von *B. thuringiensis* Stamm A-201 in verschiedenen Erdböden (Sp 118; Sp 239) unter Standardbedingungen im Labor-Lysimeter. Berechnung entsprechend 200 mm/2 Tage

Bodentiefe (cm) in Erdsäule	Spezifische Keime (= <i>B. t.</i> A-201) pro Gramm Boden	
	Standardboden Sp 118	Standardboden Sp 239
1	$5,7 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$
3	$5,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
5	$6,6 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$
10	$9,6 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$
15	$2,4 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$
30	0	0
Eluat	0	0

Die Nachweisgrenze für *B. t.* bei unserem Verfahren liegt bei etwa 0,1 % entsprechend  $10^3$  *B. t.*-Sporen bei  $10^7$  Gesamtsporen pro Gramm Erde.

### 1.3 Diskussion

Alle bekannten Selektivnährböden wie NPP-Agar und PEMBA-Medium eignen sich zwar gut zur Unterdrückung der Begleit-Mikroflora zum Beispiel auf Erdboden-Platten, nicht aber zur differentiellen Erfassung von *B. t.* einerseits und *B. cereus* andererseits. Auch die von HOLBROOK u. ANDERSEN zur Identifizierung von *B. cereus*-Kolonien empfohlene Färbung von Lipid-Granula<sup>1)</sup> in vegetativen Zellen mit Sudan-schwarz (entsprechend der Lipidfärbung nach BURDON) fällt sowohl bei *B. cereus* als auch bei *B. t.* positiv aus. So ist eine spezifische Diagnose von *B. t.* nach wie vor nur anhand des Nachweises von parasporalen Körpern bzw. Kristallen<sup>1)</sup> bei mikroskopischer Untersuchung von **sporulierten** Kolonien möglich. Zur färberischen Darstellung der Kristalle eignet sich sowohl die Amidoschwarz-Eisessig/Carbolfuchsin-Färbung nach SMIRNOFF (1962) als auch die Malachitgrün-Amidoschwarz-Eisessig/Safranin-Färbung nach BENZ u. BORUSIEWICZ (1963). Einfacher ist jedoch die von uns praktizierte Darstellung der Kristalle im Phasenkontrast, wobei sich die Agarblöckchen-Methode (vgl. KRIEG, 1967) bewährte.

Eine genauere Determination (der Varietät) erfolgt zweckmäßigerweise serologisch anhand der H-Antigene begebelter vegetativer Zellen, und zwar entweder mikroskopisch mittels Immunofluoreszenz-Verfahren (vgl. KRIEG, 1965) oder makroskopisch im Röhren-Agglutinationstest (DE BARJAC u. BONNEFOI, 1962). Eine Determination von Isolaten ist aber auch möglich auf der Basis ihrer biochemischen Leistungen.

Auf diese Weise war es möglich nachzuweisen, daß unser *B. t.*-Isolat (var. *alesti*)<sup>2)</sup> aus dem unbehandelten Feld nicht identisch war mit dem HD-1-Stamm der var. *kurstaki*<sup>3)</sup>, welcher auf dem behandelten Maisfeld in Form von DIPEL®-Spritzpulver eingesetzt worden war. Es dürfte sich somit bei unserem Isolat um einen bodenbürtigen, primär aber wohl entomogenen Stamm von *B. t.* handeln, jedoch nicht um Sporen aus der Abtrift eines *B. t.*-Sprays (da die isolierte Varietät nie zu Bekämpfungszwecken verwendet wurde).

Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen von DE LUCCA u. LARSON (1978) in den USA. Sie benutzten zu ihren Boden-Untersuchungen den NPP-Agar nach SALEH et al., differenzierten die *B. t.*-verdächtigen Kolonien von *B. cereus* mittels Amidoschwarz-Eisessig-Färbung und charakterisierten die kristallophoren Isolate serologisch und biochemisch. Dabei stellte sich heraus, daß *B. t.* nicht als ein normaler Bestandteil der Boden-Mikroflora anzusehen ist: weniger als 0,3 % aller Proben enthielten *B. t.* Trotzdem wurden auf diese Weise einige Typen von *B. t.*<sup>4)</sup> isoliert, die nie in der Praxis eingesetzt worden waren.

Andererseits fand sich in Erdproben von intensiv mit *B. t.* behandelten Feldern (speziell Baumwollfelder in Texas) der dort applizierte *B. t.* der var. *kurstaki* in der erwarteten Grö-

ßenordnung wieder. Allerdings war bei diesen Erhebungen die früher in den USA oft eingesetzte var. *thuringiensis* nicht mehr auffindbar.

## 2. Ökologische Modell-Versuche mit *B. thuringiensis*

Der spezifische mikrobiologische Nachweis von *B. t.*, speziell in Erdproben, bleibt trotz der Verwendung von Selektivnährböden sehr aufwendig, weil letztlich Einzelkolonien mikroskopisch untersucht werden müssen. Für Routine-Untersuchungen, wie sie für ökologische Untersuchungen im Modell-Maßstab (s. u.) oder gar im Rahmen eines Environmental monitoring notwendig werden, eignet sich daher diese klassische Methode kaum. Als Alternativen bieten sich an: (a) ein Indikatorplatten-Verfahren unter Verwendung von geeigneten stoffwechselphysiologischen (z. B. Cellobiose-positiven) Varianten oder (b) ein Selektivplatten-Verfahren bei Benutzung von geeigneten hemmstoffresistenten Varianten. Nach Vorversuchen mit beiden Alternativen entschlossen wir uns für das letztgenannte Verfahren, weil es weit zuverlässigere Ergebnisse lieferte.

### 2.1 Material und Methode

***B. t.*-Mutante:** Verwendet wurde ein von RIEGER auf Mehrfach-Resistenz gegen Antibiotika selektionierter Stamm von *B. t.* var. *israelensis*: A-201 (vgl. ENGLER et al., 1980). Er ist resistent gegenüber folgenden Antibiotika: Chloramphenicol, Rifampicin, Tyrothricin und auch gegen Amphotericin.

**Keimzahlbestimmung:** Sie erfolgte nach dem Prinzip des Kochschen Plattenverfahrens (vgl. 1.1).

**Selektiv-Nährmedium:** Nähragar (Merck) mit 0,07 % (w/v) Chloramphenicol, 0,57 % (w/v) Rifampicin und 0,23 % (w/v) Tyrothricin; zur Unterdrückung von Pilzwachstum wurde noch 0,02 % (v/v) Amphothericin zugefügt.

**Versuchsordnung:** Versickerungsversuche mit *B. t.* wurden nach den Richtlinien der Biologischen Bundesanstalt (BBA) für Pflanzenschutzmittel durchgeführt; Einzelheiten siehe Merkblatt Nr. 37 der BBA. Bei den verwendeten Standardböden handelte es sich (a) um einen humusarmen Sand (Sp 118) und (b) um einen humosen lehmigen Sand (Sp 239), die beide von der landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer (Rheinland-Pfalz) bezogen worden waren. Nach Sättigung der Erdsäule (von 30 cm Länge und 5 cm Durchmesser) in einem Labor-Lysimeter mit Wasser wurde 1 ml einer *B. t.*-Suspension von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml aufgebracht und anschließend (im Verlauf von 2 Tagen) mit 393 ml Aqua dest. (entsprechend 200 mm Niederschlag) „beregnet“. Im Gegensatz zu den Richtlinien wurden außer dem Eluat auch verschiedene Bodenhorizonte aus der Erdsäule analysiert. Von den in verschiedenen Tiefen entnommenen Proben wurden jeweils 10 g Erde mit Phosphatpuffer (pH 7,2) auf 100 ml aufgeschwemmt,  $\frac{1}{2}$  Std. geschüttelt, dann eine Verdünnungsreihe (in Schritten 1:10) mit Phosphatpuffer hergestellt und geeignete Verdünnungsstufen ausgeplattet (jeweils 1 ml Suspension pro Platte). Die Eluatproben wurden direkt (wiederum 1 ml pro Platte) ausgeplattet.

### 2.2 Ergebnisse

Trotz hoher Keim- und Sporenzahlen in den Standardböden ( $6,1 \times 10^6$  Gesamtkeime/g und  $5,7 \times 10^6$  Sporen/g im Falle von Sp 118;  $3,3 \times 10^6$  Gesamtkeime/g und  $2,3 \times 10^6$  Sporen/g bei Sp 239) wuchsen auf unserem Selektivmedium ausschließlich die in die Erdsäulen eingeschwemmten *B. t.*-Indi-

<sup>1)</sup> Besonders interessant und erwähnenswert ist, daß die parasporalen Körper von *B. t.* gelegentlich mit Lipidgranula vergesellschaftet sein können, wobei letztere sich (meist in Einzahl) als ovoide Gebilde seitlich am Kristall darstellen.

<sup>2)</sup> var. *alesti*: Urease-negativ, Salicin-negativ; Serotyp H-3a

<sup>3)</sup> var. *kurstaki*: Urease-positiv, Salicin-positiv; Serotyp H-3a, 3b

<sup>4)</sup> u. a. var. *darmstadiensis*, var. *indiana*, var. *dakota*

katorkeime des Stammes A-201 an. Aus den Daten des Versickerungsversuches, wie sie in Tab. 2 dargestellt sind, geht hervor, daß bis zu 5 cm Tiefe 99 % der *B. t.*-Sporen und bis zu 15 cm Tiefe 99,9 % bzw. 99,99 % adsorbiert wurden. Dementsprechend war das Eluat völlig frei von *B. t.*

### 2.3 Diskussion

Die Ergebnisse mit einer Antibiotica-resistenten Mutante von *B. t.* var. *israelensis* zeigen, daß auf diese Weise Verbrauche zur Ökologie des *B. t.* relativ leicht routinemäßig durchführbar sind. Auch bei den bei uns im Labor z. Z. noch laufenden Versuchen, die das Schicksal von *B. t.*-Sporen im Boden unter verschiedenen Bedingungen prüfen, hat sich diese Methode weiterhin bewährt.

Wie das Ergebnis unseres Versickerungsversuches zeigt, werden *B. t.*-Sporen selbst bei der relativ lockeren Struktur der Erdsäule im Labor-Lysimeter bereits innerhalb von 20 cm Tiefe völlig an den Sorptionskomplex des Bodens gebunden. Es ist anzunehmen, daß bei dem viel dichter gepackten Erd Boden aus dem Maisfeld und seinem wesentlich höheren Lehmanteil als im Falle des Standardbodens Sp 239 die *B. t.*-Sporen noch nicht einmal so tief eindringen können.

Bohrkerne mit 20 cm Tiefgang (wie sie von uns verwendet wurden) dürften daher für eine ausreichende Ermittlung des *B. t.*-Gehaltes von Kulturflächen (vgl. Abschnitt 1) geeignet sein.

### Literatur

- BARJAC DE, H., u. A. BONNEFOI 1962: Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis*. Entomophaga 7, 5–31.
- BARJAC DE, H., 1981: Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis* in: BURGESS, H. D. (edit): Microbial control of pests and plant diseases 1970–1980. Academic Press, London, p. 35–43.
- BENZ, G., u. K. BORUSIEWICZ, 1963: A method for the differential staining of spores and parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* Berliner, and *Bacillus fribourgensis* Wille. J. Insect Path. 5, 393–394.
- BURDON, K. L., 1946: Fatty Material in Bacteria and Fungi revealed by staining fixed dried slide preparations. J. Bacteriol. 32, 665–678.
- DONOVAN, K. O., 1958: A selective medium for *Bacillus cereus* in milk. J. appl. Bacteriol. 21 1, 100–103.
- ENGLER, S., J. MORAWCSIK, W. SCHNETTER u. A. KRIEG, 1980: Pilot-Versuch zur Bekämpfung von Stechmückenlarven im Freiland mit einem UV-behandelten Präparat von *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Anz. Schädlingskd. 53, 181–184.
- HOLBROOK, R., u. J. ANDERSON, 1980: An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. Can. J. Microbiol. 26, 7, 753–759.
- KRIEG, A., 1965: Identifizierung von *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in mikrobiologischen Präparaten durch Kombination von Immunofluoreszenz und Phasenkontrast-Verfahren. Zbl. Bakt. I. O., 197, 527–532.
- KRIEG, A., 1967: Neues über *Bacillus thuringiensis* und seine Anwendung. Mittlg. biol. Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem N. 125, 106 pp.
- LUCCA DE, A. J., u. A. D. LARSON, 1978: Vortrag 2. Int. Workshop on *Bacillus thuringiensis*, Darmstadt 6.–8. Sept.
- MOSSEL, D. A. A., M. J. KOOPMAN, u. E. JONGERIUS, 1967: Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. J. appl. Microbiol. 15, 3, 650–653.
- SMIRNOFF, W. A., 1962: A staining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). J. Insect. Path. 4, 384–386.

## Mitteilungen

### Dank der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Bei der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, dem Präsidenten und seinen Mitarbeitern sind viele gute Wünsche zum Jahreswechsel eingegangen. Wir haben uns sehr darüber gefreut, danken allen Absendern herzlich und bitten um Verständnis, daß es uns nicht möglich ist, die Glückwünsche einzeln zu beantworten. Wir erwidern die eingegangenen Glückwünsche deshalb auf diesem Wege sehr herzlich und wünschen all unseren Kollegen und Freunden, die an uns gedacht haben, ebenfalls ein gesundes und erfolgreiches neues Jahr.

Die Haushaltssituation zwingt zu äußerster Sparsamkeit. Dennoch haben wir keinen Grund zu besonderer Klage. Die Forschungsarbeiten konnten ohne wesentliche Einschränkungen fortgesetzt werden.

Bei den großen Investitionen, dem Fortgang der Baumaßnahmen in Braunschweig und den Renovierungsarbeiten des Berliner Anstalts teiles gab es keine Engpässe. Zur Unterstützung und Förderung der Forschung konnten wiederum beachtliche Mittel Dritter angeworben werden, so daß die Forschungsarbeiten ohne nennenswerte Einschränkungen fortgesetzt werden konnten. Dies belegt auch der im Druck befindliche Jahresbericht, der auf Anfrage geliefert werden kann. Allen Schwierigkeiten zum Trotz werden wir unsere Aufgaben auch im neuen Jahr mutig anpacken und wünschen allen Lesern die gleiche Zuversicht.

G. SCHUHMAN (Braunschweig)

### Beobachtungen über das Auftreten von parasitischen Hymenopteren an der Amerikanischen Lebensbaumminiermotte, *Argyresthia thuiella* (Packard)

In den Jahren 1978 und 1980 haben wir in Berlin (West) Versuche zur Bekämpfung der Amerikanischen Lebensbaumminiermotte, *Argyresthia thuiella*, durchgeführt. Um die günstigsten Applikationstermine zu bestimmen, war es notwendig, die Entwicklung des Schädlings zu verfolgen. Aus diesem Grunde wurden von mehreren befallenen Lebensbaumhecken in Berlin-Wannsee Zweigproben entnommen, die Minen geöffnet und Raupen, Puppen sowie leere Puppenhüllen gezählt (KÖLLNER und PLATE, im Druck).

Bei den Untersuchungen wurden in den Minen auch nicht näher bestimmte parasitische Hymenopteren gefunden. Die Anzahl der Parasiten einer jeden Probe ist in den Tabellen 1 und 2 angegeben. Aus den absoluten Zahlen der Wirte und Parasiten wurde der Parasitierungsgrad errechnet. Der prozentuale Anteil der Puppen kennzeichnet den Entwicklungszustand der Wirtstierpopulation; die Differenz zu 100 % entfällt zuerst auf das Larven-, später auf das Falterstadium.

Bedingt durch die Art der Untersuchung konnten die Parasiten erst dann gefunden werden, wenn sie einen bestimmten Entwicklungszustand erreicht hatten: Die erwachsene Larve mußte die Wirtsruppe verlassen haben, um sich außerhalb des Wirtes, aber innerhalb der Mine in einem seidenartigen Kokon zu verpuppen. Die in den Tabellen angegebenen Werte beziehen sich also nur auf folgende Entwick-

Tab. 1. Parasitische Hymenopteren an *Argyresthia thuiella* in Berlin-Wannsee im Jahre 1978

Datum	<i>Argyresthia thuiella</i>		Parasitische Hymenopteren	
	Anzahl absolut	Puppenstadium	Anzahl absolut	Parasitierungsgrad
27. 2.	85	0 %	0	0 %
20. 4.	47	0 %	1	2,1 %
16. 5.	82	83,3 %	5	5,7 %
23. 5.	55	94,4 %	1	1,8 %
4. 6.	63	98,2 %	3	4,5 %
11. 6.	37	100 %	5	11,9 %
18. 6.	81	28,2 %	1	1,2 %
21. 6.	73	3,0 %	4	5,2 %
25. 6.	76	1,4 %	2	2,6 %