

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

Heft 125

November 1967



# Neues über *Bacillus thuringiensis* und seine Anwendung

von

**Dr. A. Krieg**

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

Berlin 1967

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

Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg  
1 Berlin 61, Lindenstr. 44-47 (Westberlin)



# Inhalt

A. Einleitung .....	7
B. Mikrobiologie .....	7
1. Phasenwechsel .....	7
a) Physiologie .....	7
b) Morphologie .....	8
2. Inaktivierung .....	10
a) Sterilisation .....	10
b) Desinfektion .....	10
c) Inhibition .....	11
d) Detoxifikation .....	11
3. Biochemische Eigenschaften .....	11
a) Verwendungsstoffwechsel .....	12
b) Biochemische Leistungen .....	12
c) Isoenzym-Analysen .....	12
d) Nukleinsäure-Analysen .....	13
e) Gesamtstickstoff- und Restphosphor-Bestimmungen .....	13
4. Serotypen .....	14
5. Antagonisten .....	17
6. Lysotypen .....	17
7. Taxonomie .....	18
a) <i>Bacillus anthracis</i> und die <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> -Gruppe .....	18
b) Die <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> -Gruppe .....	22
c) Typendifferenzierung bei <i>B. thuringiensis</i> .....	22
C. Wirksamkeit gegenüber Insekten .....	25
1. Endotoxin-Kristall .....	25
a) Produktion und physikalisch-chemische Eigenschaften .....	25
b) Toxikologie .....	28
2. Exotoxin .....	34
a) Produktion und physikalisch-chemische Eigenschaften .....	34
b) Toxikologie .....	36
3. Exoenzyme .....	41
a) Phospholipasen .....	41
b) Proteinasen .....	42
4. Infektionswirkung .....	42
a) Perorale Infektion .....	42
b) Parenterale Infektion .....	43
5. Virulenz und Toleranz .....	44
a) Pathogenität und Virulenz .....	44
b) Resistenz und Toleranz .....	47

6. Umwelt-Einflüsse (Klimafaktoren) .....	49
D. Ungefährlichkeit .....	50
1. Allgemeines .....	50
2. Wirkung auf Mensch und Wirbeltiere .....	50
3. Wirkung auf Bienen ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	53
4. Wirkung auf Entomophagen und Biozönose .....	57
5. Wirkung auf Wasser- und Bodenfauna .....	58
E. Prüfmethode zur Standardisierung von Präparaten .....	59
1. Feststellung von Sporen- und Keimzahl .....	60
2. Prüfung auf Identität bzw. Ausschluß von Fremdkeimen .....	61
3. Prüfung auf Hauptwirkung .....	63
a) „Absolute“ Wirksamkeitsbestimmung .....	65
b) Relative Wirksamkeitsbestimmung .....	66
4. Prüfung auf Nebenwirkungen .....	69
a) Test an Mäusen ( <i>Mus musculus</i> ) .....	69
b) Test an Bienen ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	69
F. Die Anwendung von <i>B. thuringiensis</i> in der Schädlingsbekämpfung .....	70
1. Herstellung von <i>B. thuringiensis</i> -Präparaten .....	70
a) Produktion .....	70
b) Formulierung .....	72
c) Stabilität .....	72
2. Zulassung, Anerkennung und Kennzeichnung .....	73
3. Grundlagen der Anwendung .....	74
a) Die Präparate .....	74
b) Anwendung gegen Lepidopteren-Larven .....	74
c) Infektion nicht-larvaler Stadien von Lepidopteren; Vektoren; Epizootien .....	79
d) Anwendung gegen Nicht-Lepidopteren .....	82
4. Kombinationen und Wechselwirkungen .....	84
a) Stressoren und Inhibitoren .....	84
b) Wechselwirkungen mit Mikroorganismen .....	85
b 1) Mischinfektion mit anderen Bakterien .....	85
b 2) Mischinfektion mit Bakteriophagen .....	85
b 3) Mischinfektion mit insektenpathogenen Viren .....	86
G. Ausblick .....	87
H. Literatur .....	87

## Contents

A. Introduction .....	7
B. Microbiology .....	7
1. Life cycle .....	7
a) Physiology .....	7
b) Morphology .....	8
2. Inactivation .....	10
a) Sterilisation .....	10
b) Disinfection .....	10
c) Inhibition .....	11
d) Detoxification .....	11
3. Biochemical properties .....	11
a) Nutritional requirements .....	12
b) Metabolic activities .....	12
c) Analysis of isoenzymes .....	12
d) Analysis of nucleic acids .....	13
e) Estimation of total nitrogen and residue phosphorus .....	13
4. Serotypes .....	14
5. Antagonists .....	17
6. Lysotypes .....	17
7. Taxonomy .....	18
a) <i>Bacillus anthracis</i> and the <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> -group .....	18
b) The <i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i> -group .....	22
c) Differentiation of types of <i>B. thuringiensis</i> .....	22
C. Efficiency against insects .....	25
1. Endotoxin crystal .....	25
a) Production and physical-chemical properties .....	25
b) Toxicology .....	28
2. Exotoxin .....	34
a) Production and physical-chemical properties .....	34
b) Toxicology .....	36
3. Exoenzymes .....	41
a) Phospholipases .....	41
b) Proteinases .....	42
4. Infectivity .....	42
a) Infection by peroral route .....	42
b) Infection by parenteral route .....	43
5. Virulence and tolerance .....	44
a) Pathogenicity and virulence .....	44
b) Resistance and tolerance .....	47
6. Environmental influences (climatic factors) .....	49

D. Harmlessness .....	50
1. General remarks .....	50
2. Effect on human beings and vertebrates .....	50
3. Effect on bees ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	53
4. Effect on entomophagous insects and on biocoenosis .....	57
5. Effect on aquatic and soil fauna .....	58
E. Test methods for standardisation of preparations .....	59
1. Estimation of total and viable spore count .....	60
2. Identification and tests for detection of other germs .....	61
3. Tests on primary effects .....	63
a) "Absolute" evaluation .....	65
b) Relative evaluation .....	66
4. Tests on side effects .....	69
a) with mice ( <i>Mus musculus</i> ) .....	69
b) with bees ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	69
F. Application of <i>B. thuringiensis</i> in pest control .....	70
1. Production of <i>B. thuringiensis</i> preparations .....	70
a) Production .....	70
b) Formulation .....	72
c) Stability .....	72
2. Registration and labeling .....	73
3. Principles of application .....	74
a) Preparations .....	74
b) Application against lepidopterous larvae .....	74
c) Infection of non-larval stages of Lepidoptera; vectors; epizootics .....	79
d) Application against insects other than Lepidoptera .....	82
4. Combinations and interactions .....	84
a) Stressors and inhibitors .....	84
b) Interactions with microorganisms .....	85
b 1) Mixed infections with other bacteria .....	85
b 2) Mixed infections with bacteriophages .....	85
b 3) Mixed infections with insectpathogenic viruses .....	86
G. Outlook .....	87
H. Literature .....	87

## A. Einleitung

Seit Erscheinen des Heftes „*Bacillus thuringiensis* Berliner usw.“ (Nr. 103 dieser Mitteilungen, K r i e g 1961) sind über 5 Jahre vergangen. In welchem Maße mittlerweile das Interesse an den Grundlagenuntersuchungen und Anwendungen von *B. thuringiensis* gestiegen ist, mag daran abgelesen werden, daß seitdem etwa 400 wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema erschienen sind. Im Vergleich dazu beträgt die Anzahl der in den vorausgegangenen 50 Jahren über *B. thuringiensis* erschienenen Veröffentlichungen nur etwa die Hälfte. Die weit verstreute Literatur war zum Teil nur mit Unterstützung des Dokumentationsdienstes der O.I.L.B.<sup>1)</sup> zu beschaffen.

Es ist selbstverständlich unmöglich, alle neueren Arbeiten einzeln zu berücksichtigen. Dies scheint auch nicht notwendig, da die meisten von ihnen dem Wirkungsspektrum des *B. thuringiensis* bzw. den Erfolgen oder gelegentlich auch den Mißerfolgen in der biologischen Schädlingsbekämpfung mit technischen Präparaten gewidmet sind. Hinsichtlich der hier nicht zitierten neueren Arbeiten sei auf die „Bibliographie über biologische Bekämpfung“ des Dokumentationsdienstes der O.I.L.B. hingewiesen (F r a n z 1961 b, 1963, 1966 a, 1967 a, F r a n z und L a u x 1963, 1964).

In Ergänzung des Heftes 103 sollen zunächst die wichtigeren neuen Ergebnisse aus der Grundlagenforschung zusammenhängend referiert werden. Anschließend stehen bestimmte aktuelle Probleme der Bekämpfung schädlicher Insekten mittels industriell erzeugten *B. thuringiensis*-Präparaten zur Diskussion. Da dieses Heft auch ohne Vorlage von Heft 103 ein abgerundetes Bild über den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnis vermitteln soll, ließen sich gelegentlich Wiederholungen nicht ganz vermeiden.

Modernen Bestrebungen folgend wurde auf die Nennung jeglicher Autorennamen im Zusammenhang mit Artnamen verzichtet. Genus-Synonyme sind bei der ersten Nennung von Insektenarten in Klammern beigelegt. Im Falle von *Bacillus thuringiensis* wird im allgemeinen der Gennusname abgekürzt, bei Nennung von Varietäten auch der Artname, also: *B. t.* var. *thuringiensis*.

Für kritische Durchsicht des Manuskriptes sei Herrn Prof. Dr. Franz gedankt.

## B. Mikrobiologie

### I. Phasenwechsel

Alle Arten der Familie Bacillaceae und speziell des Genus *Bacillus* besitzen einen Phasenwechsel zwischen der physiologisch aktiven und vermehrungsfähigen vegetativen Zelle und der weitgehend physiologisch inaktiven und stabilen Spore.

#### a) Physiologie

*Bacillus thuringiensis* ist ebenso wie *Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis* ein aerober Sporenbildner, der zwar unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, aber nicht zu sporulieren vermag. — Sporulation tritt im allgemeinen ein, wenn durch Erschöpfung der C- oder der N-Quelle das Wachstum begrenzt wird. Da die Sporulation bei völliger Abwesenheit von Nahrungsstoffen erfolgen kann, wird sie als „endotroph“ bezeichnet. Parallel zur Sporulation läuft die Synthese

<sup>1)</sup> Organisation International de Lutte Biologique.

von Dipicolinsäure, die offenbar wichtige Zellstrukturen durch Komplexbildung stabilisiert und die auch für die Hitzeresistenz der Sporen verantwortlich zu sein scheint. In Sporenpräparaten von *B. t.* var. *thuringiensis* wurde sie von Fisher (1963) sowie von Cantwell und Mitarb. (1964 a) nachgewiesen.

Die Keimung der Sporen erfolgt im Wasser<sup>1)</sup>, wenn neben bestimmten Ionen bzw. Salzen ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) einzelne Aminosäuren (l-Alanin) oder Zucker (Inosit) oder Riboside als Induktoren vorhanden sind. Im Gegensatz zu der durch Aminosäuren (einschließlich Dipicolinsäure) auslösbaren physiologischen Keimung von Bakteriosporen bewirken kationische Detergentien, speziell quaternäre Ammoniumverbindungen (bei Temperaturen über  $50^\circ\text{C}$ ) chemische Letalkeimung von Sporen<sup>2)</sup>. Bei Verwendung langkettiger Alkylamine (n-Dodecylamin) dagegen erfolgt chemische Keimung ohne Abtötung innerhalb weniger Minuten (Rode and Foster 1960).

Die Gesamt-Keimung erfolgt in 2 Stufen: dem Zusammenbruch der Sporenstruktur (gekennzeichnet durch: Verlust des Lichtbrechungsvermögens, Anfärbbarkeit, Verlust der Hitzeresistenz, Beginn der Respiration und Abgabe von Dipicolinsäure in das Medium) und dem Aufbau der vegetativen Zelle (gekennzeichnet durch: Schwellung des Sporenhalts, seinen Austritt aus der Sporenhülle und seine Streckung zur stäbchenförmigen Zelle). — Nach Ignoffo (1962) liegt das Temperaturoptimum für die Keimung der Sporen von *B. thuringiensis* bei etwa  $51^\circ\text{C}$  und das Optimum für das Wachstum der vegetativen Zellen bei etwa  $31^\circ\text{C}$ .

Durch Teilung steigt die Zahl der vegetativen Zellen in Form einer sog. Wachstumskurve an. Eine Kennziffer der Vermehrungsrate ist die Generationszeit. Sie ist weitgehend von den Milieu-Bedingungen abhängig; unter optimalen Bedingungen liegt sie bei *B. thuringiensis* zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase unter 20 Minuten.

## b) Morphologie

Der Formwechsel der Bazillen ist von einem Kernphasen-Wechsel begleitet. Über den Zusammenhang zwischen beiden haben anhand von Untersuchungen an *B. thuringiensis* (var. *alesti*) Young und Fitz-James (1959 a) berichtet.

Die vegetative Zelle des *B. thuringiensis* ist begeißelt und hat stäbchenförmige Gestalt ( $0,8 \cdots 1,3 \times 3,0 \cdots 6,0 \mu$ ): vgl. Abb. 1 a.

Die Endospore ist elliptisch bis zylindrisch ( $0,8 \cdots 0,9 \times 1,6 \cdots 2,0 \mu$ ). Ihre Lagerung neben einem parasporalen Kristall ( $\cong 0,6 \times 2,0 \mu$ ) im Sporangium ist parazentral bis subterminal und geneigt gegenüber der Hauptachse des Sporangiums. Die Elemente des Sporangieninhaltes sind in Abb. 1 b getrennt abgebildet: Die zunächst innerhalb der Sporangienhülle (Zellwand der Sporenmutterzelle) gelegene Spore hat 2 Hüllen: ein Exosporium und ein Endosporium. Als „spore coat“ umschließt das letztere den eigentlichen Sporenhalt und wird beim Keimvorgang abgeworfen.

1) Durch schwache Dosierung (z. B. kurze Erwärmung auf  $65^\circ\text{C}$  oder kurze Inkubation bei  $\text{pH} < 4,5$ ) von an sich keimungshemmenden Reizen (hohe Temperatur, niedrige pH-Werte) kann eine reversible Aktivierung der Sporen zur Keimung erzielt werden (Kynan et al. 1964).

2) Anionische und amphotere Substanzen sind unwirksam.



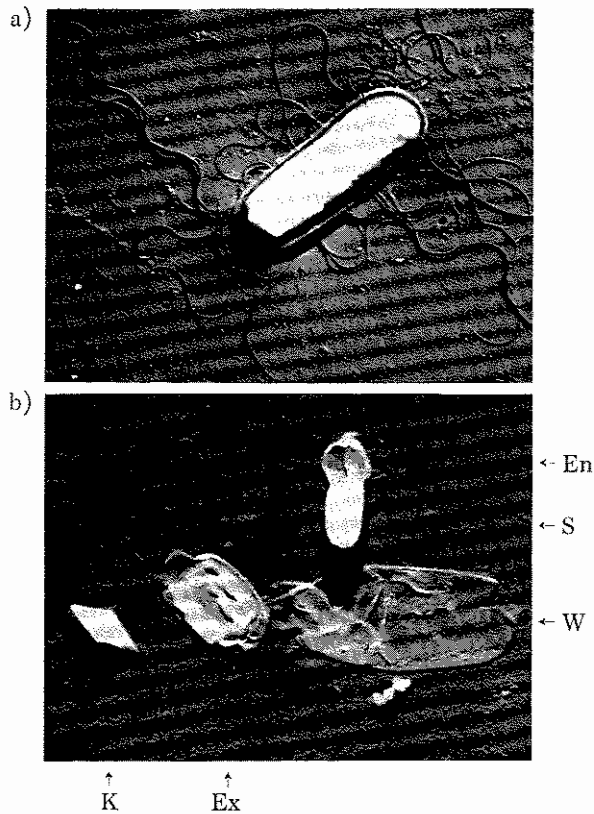


Abb. 1. *Bacillus thuringiensis* (schrägbedampft; Negativkopie)  
 Elektronenmikroskopische Aufnahme  
 Abb.-Maßstab  $\sim 9000 : 1$

- a) Vegetative Zelle mit Geißeln  
 b) Aufgebrochenes Sporangium: W = Sporangienwand, S = Spore, Ex = Exosporium,  
 En = Endosporium, K = Endotoxin-Kristall

#### Untersuchungen mittels Phasenkontrast- oder Interferenz-Mikroskop:

Diese Verfahren nutzen Phasendifferenzen im Präparat zur Abbildung aus; sie sind bedingt durch Differenzen in der Dicke und/oder Lichtbrechung der Objekte. Während keine großen Unterschiede in der Objektdicke zwischen Spore und vegetativer Zelle bestehen, existieren hohe Differenzen in der Lichtbrechung in Abhängigkeit vom Wassergehalt: Die vegetative Zelle besitzt eine geringe, die Spore dagegen eine hohe Lichtbrechung. Brechungsunterschiede werden auch zwischen Spore und parasporalem Kristall beobachtet. Bei der Untersuchung von *B. thuringiensis* als Phasen-Präparat in vivo hat sich die Blöckchen-Methode bewährt.:

Auf einen Objektträger wird ein dünnes Agarblöckchen (aus einer dünnen planparallelen Schicht ausgeschnitten) gelegt, dann ein Tropfen der Bakteriensuspension aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Der Agar saugt das Suspensionsmittel auf, und so werden die Bazillen an ihrer aktiven oder passiven Bewegung gehindert.

Bei Verwendung von Nähragar als Substrat und unter sterilen Kautelen ist bei Anwendung der Blöckchen-Methode der Ablauf des gesamten Entwicklungszyklus von *B. thuringiensis* beobachtbar. Er wurde mikrokinematographisch aufgenommen; der Film konnte zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht werden (Krieg 1964 c). Gezeigt werden Ausschnitte aus Keimung, vegetativer Vermehrung, Sporen- und Kristallbildung des *B. thuringiensis* in Phasenkontrast-Aufnahmen bei verschiedenen Vergrößerungen und Zeit-Raffungen (Bildausschnitt 0,05·0,25 mm; Raffungen 180·720 : 1).

Differentialfärbungen:

Neben der in vivo-Untersuchung von Phasenpräparaten des *B. thuringiensis* steht als Alternative die Untersuchung von gefärbten Präparaten in fixiertem Zustand. In den letzten Jahren wurden mehrere einschlägige Färbeverfahren beschrieben. Schwierigkeiten bei der Negativdarstellung mit Nigrosin nach Hannay (1956) veranlaßten Smirnov (1961) eine Positivdarstellung mit Malachitgrün/Safranin-Färbung zu empfehlen. Werden so gefärbte Präparate im Dunkelfeld betrachtet, dann erscheinen auf Grund des „Color refraction“-Effektes die vegetativen Zellen gelb, die Sporen rot und die parasporalen Endotoxin-Kristalle gelb bis gelblichgrün. Smirnov (1962) publizierte eine zweite Sukzedan-Färbung, und zwar mit Amidoschwarz-Eisessig/Carbolfuchsin für Hellfeld-Beobachtung. Hiernach sind die vegetativen Zellen lila (nach eigenen Erfahrungen bis tiefviolett) gefärbt, die Sporen rot und die Kristalle schwarz. Benz und Borusiewicz (1963) empfehlen schließlich die Kombination Malachitgrün-Amidoschwarz-Eisessig/Safranin mit folgendem Ergebnis: vegetative Zellen purpurrot, Sporen grün und Kristalle blauschwarz.

## 2. Inaktivierung

Zur irreversiblen Inaktivierung von *B. thuringiensis* eignen sich sowohl physikalische Verfahren (Sterilisation) als auch chemische Verfahren (Desinfektion). Zur Lösung bestimmter Probleme ist auch die Kenntnis der Einflüsse wichtig, die eine reversible Inaktivierung von *B. thuringiensis* bewirken können. Es sei in diesem Zusammenhang allerdings nur auf die chemische Inhibition (durch Ionen und Antimetabolite) eingegangen, nicht dagegen auf die meist zur Konservierung des Bazillus und seiner Präparate benutzte physikalische Stoffwechelhemmung (durch Kälte, Dehydratation usw.). Über die Haltbarkeit von *B. thuringiensis*-Präparaten s. S. 72.

### a) Sterilisation

Hierzu eignet sich vor allem die Drucksterilisation in überhitztem Wasserdampf: Autoklavieren 15·30 min bei 120° C ( $\approx 2$  atü) inaktiviert vegetative Zellen und Sporen. — Eine wirksame Abtötung wird auch durch UV-Strahlen (vgl. Krieg 1961, sowie Cantwell and Franklin 1966) erreicht.

### b) Desinfektion

Als wirksames Desinfektionsmittel hat sich 4·2 %iges Formaldehyd (5 bis 15 min) gut bewährt. (Neutralisation durch Ammoniak.) — Ignoffo und Dutky (1963) empfehlen ferner 0,5·0,05 %iges Natriumhypochlorit (1 bis 30 min). (Neutralisation durch Natriumthiosulfat.) — Auch Sublimat (0,1 %ig, 10 min) tötet vegetative Zellen und Sporen ab. (Neutralisation durch Natriumthiosulfat.) — Eine wirksame Abtötung der vegetativen Zellen und Sporen ist von

der Verwendung alkylisierender Stoffe (wie Äthylenoxyd, Propylenoxyd,  $\beta$ -Propiolacton usw.) unter bestimmten apparativen Voraussetzungen (Begasungs-Apparatur) zu erwarten.

### c) Inhibition

Während kleinere Mengen Zn und Mg im Gegensatz zu Cu-Ionen sogar einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum von *B. thuringiensis* ausüben, wirken sie ebenso wie Cu-Ionen in hohen Konzentrationen hemmend. Co-Ionen dagegen behalten auch in hohen Konzentrationen ihren stimulierenden Effekt. Reduktion bzw. Unterdrückung des Wachstums erfolgt durch Al-Ionen, Cu-Ionen (S m i r n o f f and P e r r o n 1965) und durch Fe-Ionen (K l e i n and L e w i s 1966).

I g n o f f o (1963) hat das Empfindlichkeitsspektrum von *B. thuringiensis* (var. *thuringiensis*) gegenüber Antibiotika und anderen Antimetaboliten bestimmt. Die Ergebnisse, die frühere Angaben bestätigen, sind folgende: Resistenz besteht gegenüber Sulfonamiden, Isoniacid, p-Aminosalizylsäure, Bacitracin, Penicillin G, Polymyxin B, Viomycin; Sensibilität ist vorhanden gegenüber Carbomycin, Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin, Neomycin, Nitrofurantoin, Nitrofurazan, Novobiocin, Nystatin, Oleandomycin, Ristocetin, Spiramycin, (Dihydro-)Streptomycin, (Oxy-, Chlor-)Tetracyclinen, Vancomycin.

Auf Sporulation und Kristallbildung wirken hemmend Co sowie Mg und Cu, Zn aber nur in höheren Konzentrationen (S m i r n o f f and P e r r o n).

Das m-Tyrosin hemmt die Sporenbildung bei *B. thuringiensis* ebenso wie bei anderen Sporenbildnern (A r o n s o n et al. 1967); gleichzeitig wird auch die Bildung parasporaler Kristalle unterdrückt. Das gleiche gilt von den Proteinsynthese-Blockern 8-Azaguanin und 2,6-Diaminopurin (Y o u n g and F i t z - J a m e s 1959 b). — Harnstoff inhibiert in geeigneter Konzentration nur die Kristallbildung, aber nicht die Sporulation (S m i r n o f f 1963 b).

### d) Detoxifikation

Die physikalische oder chemische Inaktivierung von *B. thuringiensis* in Form von vegetativen Zellen oder Sporen ist nicht immer gleichbedeutend mit der Zerstörung der toxischen Aktivität.

Das Kristall-Endotoxin wird nicht nur inaktiviert durch Hitze (30 min bei 100° C), sondern auch durch eine Reihe von Desinfektionsmitteln wie Formaldehyd, Hypochlorit, Trichloressigsäure, jedoch nicht von Phenol. Alkalien führen zwar zu einer Lyse des Kristalls, zerstören aber die toxische Wirksamkeit des Lysates nicht. Säuren inaktivieren (unterhalb pH 3) das Endotoxin. Von UV-Strahlen wird es nicht inaktiviert.

Das Exotoxin ist thermostabil (M c C o n n e l and R i c h a r d s 1959) und nach Š e b a s t a und Mitarb. (1967) auch Alkali-resistent selbst bei 100° C. Dagegen wird das Exotoxin relativ leicht durch Säuren hydrolysiert, insbesondere bei höheren Temperaturen (100° C).

## 3. Biochemische Eigenschaften

Neben der Untersuchung klassischer Stoffwechsel-Eigenschaften, wie der Registrierung von aufgenommenen Ausgangsstoffen (Verwendungsstoffwechsel) und der abgegebenen Endprodukte (biochemische Leistungen), werden heute auch chemische Analysen zur Charakterisierung von Bakterien mit herangezogen. Brauchbare Daten im Hinblick auf *B. thuringiensis* und verwandte Arten haben

bereits Enzym-Analysen, Nukleinsäure-Analysen und Bestimmungen des Gesamt-Stickstoffs und des Rest-Phosphors geliefert.

#### a) Verwendungsstoffwechsel

Nach Untersuchungen von Proom und Knight (1955) weicht *B. thuringiensis* in seinen Ernährungsansprüchen nicht von *B. cereus* ab. In einem Ammonium-Grundmedium bestehend aus  $K_2HPO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $Fe_2(SO_4)_3$  und  $(NH_4)_2$ -molybdat (pH 7,6), wurde der Aminosäurebedarf verschiedener Sporenbildner getestet. Die geprüften Stämme von *B. t.* var. *thuringiensis* benötigten ebenso wie die untersuchten Stämme von *B. cereus* 7 Aminosäuren, nämlich L-Aspargin, L-Prolin, L-Leucin, D-, L-Alanin, L-Glutaminsäure, D-, L-Serin und D-, L-Methionin. Außerdem erwies sich *B. thuringiensis* wie *B. cereus* als Thiamin-autotroph.

Weitere Untersuchungen über den Verwendungs-Stoffwechsel speziell im Hinblick auf Kohlenhydrate und Aminosäuren als C- und N-Quellen stellten Krassilnikov und Gukasjan (1964) sowie Krepkich (1966) an. — Die zum Teil differente (Wachstum-fördernde bzw. -hemmende) Wirkung einzelner Aminosäuren, speziell von Valin, Leucin und Isoleucin auf das Wachstum verschiedener Varietäten von *B. thuringiensis* (var. *thuringiensis*, var. *sotto*, var. *entomocidus*) untersuchten Conner und Hansen (1967 a).

#### b) Biochemische Leistungen

Folgende biochemische Eigenschaften haben *B. thuringiensis*-Stämme mit *B. cereus* gemeinsam: Proteolyse, keine Indol-Bildung, keine  $H_2S$ -Bildung, Nitratreduktion. Vorhandene Fermente: Katalase, Peroxydase, Acetylerase (s. unten), Phosphomonoesterase. Nicht vorhanden: Tetrathionatreduktase, Lysin-Dehydrogenase, Tryptophan-Desaminase, Phenyl-Transaminase. Zuckerfermentation unter Säurebildung ist positiv bei Glucose, Fructose, Ribose, Glycerin. Nicht fermentiert werden: Lactose, Galactose, Rhamnose, Sorbose, Arabinose, Xylose, Mannit, Duleit, Sorbit, m-Inosit, Erythrit (vgl. auch de Barjac et Bonnefoi 1967).

Die variablen biochemischen Leistungen des *B. thuringiensis* können zur Differenzierung einzelner Varietäten herangezogen werden: Produktion von Acetyl-methylcarbinol, Produktion von Pigment<sup>1)</sup>, Lezithin-Vitellin-Reaktion<sup>2)</sup>, Fermentation von Salicin, Mannose, Saccharose, Stärke, Fett, Proteinen, Harnstoff. Diese Eigenschaften reichen indessen nicht aus, um *B. thuringiensis* von *B. cereus* zu differenzieren, da entsprechende Stoffwechsel-Varietäten bei beiden Arten vorkommen (vgl. Tabelle 2 a).

#### c) Isoenzym-Analysen

Zur Charakterisierung der biochemischen Verhältnisse kann neben der Substratspezifität von Enzymen auch die Differenzierung von Isoenzymen herangezogen werden. Solche Untersuchungen wurden von Norris und Burges (1963) sowie Norris (1964) im Hinblick auf bestimmte Endo-Esterasen von

1) Nach Uffen und Canale-Parola (1966) dürfte das von *B. t.* var. *alesti* produzierte wasserunlösliche Pigment mit dem Pulcherrimin verwandt sein, das auch von bestimmten Varietäten des *B. cereus* (Canale-Parola 1963), des *B. anthracis* (Hawkins et al. 1963) und anderen aeroben Sporenbildnern synthetisiert wird. Das Pigment wird nur unter aeroben Bedingungen und unterhalb 30° C gebildet. Zusatz von Fe-Salzen erhöhen die Ausbeute auf Nähragar. (Bei den Pulcherrimin-ähnlichen Pigmenten sind Pyrazin-Ringe chelatartig mit Fe verbunden.)

2) d. i. Prüfung auf Phospholipase (bzw. Lezithinase)-Produktion.

*B. thuringiensis* angestellt. Extrakte vegetativer Zellen wurden (in Stärke-Gel) elektrophoretisch aufgetrennt und die Acetylerase-Aktivität des Zymogramms gegenüber  $\alpha$ -Naphthylacetat getestet<sup>1</sup>). Als Indikator dient Fast blue B-Salz. In Abhängigkeit von der Varietät werden bei verschiedenen Stämmen 2–8 Banden im Zymogramm registriert. Am auffallendsten und meistverbreitetsten waren zwei starke Esterase-Banden ( $E_f$  55 und  $E_f$  65). Den Varietäten *finitimus*, *entomocidus* und *tolworthi* fehlte die Bande 65, der var. *kenyae* dagegen die Bande 55. Andere auffallende Banden hatten var. *finitimus* ( $E_f$  38 und  $E_f$  85), var. *kenyae* ( $E_f$  86) und var. *entomocidus* ( $E_f$  98). Var. *tolworthi* verfügte als einzige Varietät nur über schwache Esterase-Banden im Zymogramm.

#### d) N u k l e i n s ä u r e - A n a l y s e n

Auch Analysen der beiden in Bakterien vorhandenen Nukleinsäuren können zur Charakterisierung von Arten oder Varietäten herangezogen werden. — Nach Fitz-James und Young (1959) variiert der Gehalt an Ribonukleinsäure (RNS-P) von Sporen mit deren Größe; das bedeutet, daß große Sporen unter Umständen doppelt so viel RNS enthalten wie kleine Sporen. Sporengröße und RNS-Gehalt sind jedoch nicht streng genetisch determiniert, sondern in Grenzen auch von den Kulturbedingungen (Medium) abhängig. Demgegenüber ist der Gehalt der Sporen an Desoxyribonukleinsäure (DNS-P) für einen Genotyp bemerkenswert konstant. Beispielsweise besaßen Sporen von *B. t.* var. *alesti* etwa doppelt so viel DNA-P (nämlich  $20 \text{ g} \times 10^{-16}$  pro Spore) als *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. t.* var. *thuringiensis* und *B. t.* var. *sotto* ( $10 \cdots 12,5 \text{ g} \times 10^{-16}$  pro Spore). Mutativer Verlust von Kristallbildung (bei *B. t.* var. *alesti*, var. *thuringiensis*, var. *sotto*) hatte keinen Einfluß auf den spezifischen DNS-Gehalt der Sporen.

In der Bakterientaxonomie wird heute gelegentlich auch die Basenzusammensetzung des genetischen Materials als Kriterium verwendet. Vergleicht man die Prozente von Guanin plus Cytosin bezogen auf die Gesamt-Nukleinbasen der DNS, so ergeben sich nach Hill (1966) jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen *B. anthracis* (2 Stämme untersucht: 32–34 %), *B. cereus* (17 Stämme untersucht: 32–40 %) und *B. thuringiensis* (1 Stamm der var. *thuringiensis* untersucht: 34–36 %).

#### e) G e s a m t s t i c k s t o f f - u n d R e s t p h o s p h o r - B e s t i m m u n g e n

Diesbezügliche Analysen von Sporenmaterial, ebenfalls mit dem Ziel einer Charakterisierung von Stämmen liegen von Fitz-James und Young (1959) vor. Der Gehalt an Gesamt-N (also einschließlich Proteinen) ist ähnlich wie der Gehalt an RNS bei Sporen von deren Volumen abhängig.

Die Rest-P-Werte (also ausschließlich des Nukleinsäure-P) der Sporen sind für einen Stamm oder Varietät weitgehend konstant und werden auch durch mutativen Verlust der Kristallbildung nicht beeinflußt. Sie können somit zur Charakterisierung bestimmter Stämme oder Varietäten benutzt werden. Vergleichbare Rest P-Werte wiesen auf: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. t.* var. *alesti* und *B. t.* var. *sotto* ( $1,8 \cdots 6,9 \text{ g} \times 10^{-16}$  pro Spore). Demgegenüber hatten die Sporen von *B. t.* var. *thuringiensis* etwa zehnfach höhere Werte ( $30,0 \cdots 40,6 \times 10^{-16}$  pro Spore).

<sup>1</sup>) Nach Roberts und Rosenkranz (1966) kommt Acetylerase auch in Sporen von *B. cereus* vor.

## 4. Serotypen

Serologische Arbeiten an *B. thuringiensis* berücksichtigten bisher Sporen-Antigene, Endotoxinkristall-Antigene sowie Zellwand-Antigene und Geißel-Antigene von vegetativen Zellen. Letztere haben z. Z. für die Charakterisierung von *B. thuringiensis*-Stämmen die größte Bedeutung.

Erste Untersuchungen über die Antigen-Struktur von *B. thuringiensis* stellte Švecova (1959 a) an: Während die gegen vegetative Stäbchen in Kaninchen gebildeten Antikörper spezifisch agglutinierten, reagierten die gegen Sporen gebildeten Antiseren auch noch mit vegetativen Stäbchen. Die Seren zeigten unterschiedliche Spezifitäten: Eine Differenzierung der Varietäten *thuringiensis* und *dendrolimus* gegenüber der var. *galleriae* gelang nur bei Verwendung von Antigalleriae-Serum, jedoch nicht vice versa. Keine Antigen-Gemeinschaft (reziproke Reaktionen) wurde gefunden zwischen var. *thuringiensis* und var. *dendrolimus*. — Auch Krassilnikov und Gukasjan (1964) standen keine so spezifischen Antiseren zur Verfügung, um var. *thuringiensis* von var. *galleriae* und var. *dendrolimus* sicher abtrennen zu können. Lediglich die var. *alesti* wurde von keinem der gegen die zuvor genannten Varietäten gebildeten Antiseren agglutiniert und vice versa.

Lamanna und Jones (1961) beobachteten sehr komplexe Sporenantigen-Muster bei den von ihnen untersuchten Arten des Genus *Bacillus*. Mittels Agglutinin-Absorptionstests war es ihnen deshalb nicht möglich, die Sporen von *B. anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* (var. *thuringiensis*, var. *alesti*, var. *sotto* und var. *entomocidus*) voneinander zu differenzieren. Immerhin reagierten *B. thuringiensis*-Stämme weniger stark als *B. cereus*-Stämme mit *B. anthracis*-Antiseren und vice versa. Das gilt sowohl für die Anzahl der kreuzweise reagierenden Stämme als auch für die Höhe der beobachteten Titer. Auch Norris und Wolf (1961) fanden ein den Stämmen von *B. cereus* (var. *cereus*, var. *mycoides*) und *B. thuringiensis* (var. *thuringiensis* und var. *entomocidus*) gemeinsames Sporenantigen (Präzipitogen).

Walker und Batty (1965) beurteilten an Hand von Immunofluoreszenz das Auftreten phasenspezifischer Oberflächenantigene bei *B. cereus*. Mit dem Antiserum, gebildet gegen vegetative Zellen, reagierten keimende Zellen erst nach dem Aufbrechen der Sporen. Ganz entsprechend reagierten die Sporen mit dem gegen sie gerichteten Antiserum erst nach dem Verlassen des Sporangiums. Vielleicht wären serologische Untersuchungen mit homogenisierten Sporangien bzw. keimenden Sporen aufschlußreicher gewesen, da Sporangienwand bzw. Sporenwand hier sicher als Diffusionswiderstände wirksam waren. Die obigen Befunde sagen somit noch nichts Verbindliches über das erste Auftreten der phasenspezifischen Antigene aus.

Baillie und Norris (1964) untersuchten vergleichend die Antigen-Muster von Extrakten aus vegetativen Zellen und aus Sporen bei *B. cereus* mittels Immunoelektrophorese. Vegetative Zellen enthielten 8 thermolabile und 7 (relativ) thermostabile Teilantigene. In den Sporen waren 5 (relativ) thermostabile (darunter ein neues Antigen) und 3 thermolabile Teilantigene nachweisbar.

Mittels Gel-Diffusionstest verfolgte Monroe (1961 a) serologisch das Auftreten von Kristall-Antigenen bei *B. thuringiensis*. Dabei zeigte sich, daß Antiseren, gebildet gegen die Antigene aus Extrakten von vegetativen Zellen, nicht mit Kri-

stall-Antigen reagierten. Hieraus ist zu schließen, daß die Endotoxin-Kristalle, die im Verlauf des Sporulationsprozesses entstehen, nicht aus Vorstufen von gleichem antigenem Charakter hervorgehen, sondern durch Umbau von Proteinen (protein turnover) de novo entstehen (M o n r o 1961 b).

Bei ihren Untersuchungen über die antigenen Eigenschaften alkaligelöster Endotoxinkristalle gelang es D e B a r j a c und L e c a d e t (1961) bei *B. t.* var. *thuringiensis*, var. *entomocidus* und var. *alesti* neben einem gemeinsamen Antigen auch typenspezifische Antigene nachzuweisen. — Neuerdings haben P e n d l e t o n und M o r r i s o n (1966 a) 88 typisierte *B. thuringiensis*-Stämme auf ihre Endotoxin-Antigenmuster hin untersucht. Antikörper, gebildet gegen ganze Kristalle, präzipitierten nur e i n e s der Antigene, die durch Alkalihydrolyse aus homologen Kristallen freigesetzt wurden, jedoch nicht mit Antigenen aus heterologen Kristallen. Demgegenüber vermögen Antiseren, gebildet gegen gelöste Kristalle auch mit (m e h r e r e n) Antigenen aus heterologen Kristallen zu reagieren. Dieses Paradoxon läßt sich durch die Annahme einer Antikörper-Maskierung erklären. Im einzelnen wurden folgende Ganzkristall-Antigene bei *B. thuringiensis* unterschieden: a = var. *thuringiensis* (ex *Anagasta kühniella*, M a t t e s 1927), i = var. *thuringiensis* (ex *Galleria mellonella*, K r i e g und F r a n z 1959), b = var. *finitimus*, c = var. *sotto*, d = var. *dendrolimus*, e = var. *kenyae*, f = var. *galleriae*, g = var. *morrisoni*, h = var. *alesti*. In den folgenden beiden Tabellen ist ihre Verteilung angegeben:

Tab. 1 a. Serologische Eigenschaften der Endotoxin-Kristalle verschiedener Varietäten von *B. thuringiensis* (mehr als 5 Stämme untersucht; nach P e n d l e t o n und M o r r i s o n 1966 a, verändert)

Varietät	gemeinsame Antigene	Anzahl d. Stämme
var. <i>thuringiensis</i>	— ; b <sup>-</sup> , g <sup>-</sup>	30
var. <i>alesti</i>	— ; b <sup>-</sup> , e <sup>-</sup> , g <sup>-</sup>	9
var. <i>kenyae</i>	e <sup>+</sup> ; a <sup>-</sup> , b <sup>-</sup> , d <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , g <sup>-</sup> , i <sup>-</sup>	13
var. <i>galleriae</i> / <i>aizawai</i>	— ; a <sup>-</sup> , b <sup>-</sup> , g <sup>-</sup>	23
var. <i>entomocidus</i>	a <sup>+</sup> ; b <sup>-</sup> , d <sup>-</sup> , e <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , g <sup>-</sup> , h <sup>-</sup> , i <sup>-</sup>	6

Tab. 1 b. Serologische Eigenschaften der Endotoxin-Kristalle verschiedener Varietäten von *B. thuringiensis* (weniger als 5 Stämme untersucht; nach P e n d l e t o n und M o r r i s o n 1966 a, verändert)

Varietät	gemeinsame Antigene	Anzahl d. Stämme
var. <i>finitimus</i>	b <sup>+</sup> ; a <sup>-</sup> , c <sup>-</sup> , d <sup>-</sup> , e <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , g <sup>-</sup> , h <sup>-</sup> , i <sup>-</sup>	1
var. <i>sotto</i>	c <sup>+</sup> ; a <sup>-</sup> , b <sup>-</sup> , d <sup>-</sup> , e <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , g <sup>-</sup> , h <sup>-</sup> , i <sup>-</sup>	1
var. <i>morrisoni</i>	g <sup>+</sup> ; a <sup>-</sup> , b <sup>-</sup> , c <sup>-</sup> , e <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , h <sup>-</sup>	3
var. <i>tolworthi</i>	e <sup>+</sup> ; a <sup>-</sup> , b <sup>-</sup> , c <sup>-</sup> , d <sup>-</sup> , f <sup>-</sup> , g <sup>-</sup> , h <sup>-</sup> , i <sup>-</sup>	1

Der Tab. 1 b kommt weniger Informationsgehalt als der Tab. 1 a zu, da die gefundenen Antigenformeln sich nur auf 1-3 Stämme stützen. Die hier aufgeführten scheinbar variationspezifischen Antigene b<sup>+</sup>, c<sup>+</sup> und e<sup>+</sup> kommen außer-

dem auch bei Stämmen anderer Varietäten vor. — Vergleicht man die beiden Tabellen, so ergibt sich, daß mit der Anzahl der untersuchten Stämme auch die Anzahl festgestellter Antigen-Kombinationen steigt. Das geht so weit, daß in Tab. 1 a nur für var. *kenyae* ( $e^+$ ) und var. *entomocidus* ( $a^+$ ) je ein charakteristisches Antigen nachweisbar war. Beide Antigene kommen aber auch bei anderen Varietäten vor (z. B. bei var. *thuringiensis*). Bei allen anderen Varietäten findet man lediglich gemeinsam fehlende Antigene wie z. B. bei var. *thuringiensis*  $b^-$  und  $g^-$ . Nicht unwahrscheinlich ist jedoch, daß in Zukunft auch noch var. *thuringiensis*-Stämme mit den Antigenen  $b^+$  und  $g^+$  gefunden werden.

Pendleton und Morrison fanden demnach keine mit anderen Kriterien (speziell nicht mit den Geißel-Antigenen) korrespondierende Kristall-Antigenmuster. Die Kristall-Antigene erwiesen sich außerdem als viel komplexer als die Geißel-Antigene. Das geht auch aus einer neueren Arbeit von Krywienczyk und Angus (1967) hervor. Die Autoren untersuchten das serologische Verhalten von sporulierten Gesamtkulturen gegenüber Antiseren, gebildet gegenüber Endotoxinkristallen<sup>1)</sup> von var. *thuringiensis*, var. *sotto* bzw. var. *entomocidus* (*entomocidus*) im Gel-Diffusions-Test. Als „Gesamt-Antigen“ dienten die abzentrifugierten festen Bestandteile einer sporulierten Kultur, die zuvor mittels Darmsaft von *Bombyx mori*-Larven fermentativ abgebaut worden waren. Wie zu erwarten, reagierten die aus insgesamt 12 Stämmen bzw. Varietäten gewonnenen Gesamt-Antigene verschieden: Die Anzahl der jeweils an der Seroreaktion beteiligten Teil-Antigene betrug maximal 5 (bei Verwendung von korrespondierendem Gesamt-Antigen). Keine Reaktion mit einem der o. g. 3 Antiseren zeigte das Gesamt-Antigen der var. *finitimus*-Kultur. Die übrigen Stämme (zugehörig var. *alesti*, var. *galleriae*, var. *entomocidus* (*subtoxicus*), var. *aizawai* (IHA), var. *morrisoni*, var. *tolworthi*) reagierten stärker (3–4 Teilantigene beteiligt) oder schwächer (1–2 Teilantigene beteiligt) in Abhängigkeit von dem jeweils benutzten Antiserum. Bemerkenswert war einerseits die minimale Reaktion zwischen dem *subtoxicus*-Stamm der var. *entomocidus* und dem Anti-*entomocidus*-Serum (2 beteiligte Teilantigene) und andererseits die starke Reaktion zwischen dem IHA-Stamm der var. *aizawai* sowohl mit dem Anti-*sotto*-Serum als auch mit dem Anti-*entomocidus*-Serum (Beteiligung von 4 Teilantigenen). Über die toxischen Eigenschaften der Kristall-Teilantigene s. S. 33.

Im Gegensatz zu *B. anthracis* sind die vegetativen Zellen von *B. cereus* und *B. thuringiensis* peritrich begeißelt. De Barjac und Bonnefoi (1962) untersuchten die Geißel-Antigene der beiden letztgenannten Arten. Dabei stellten sie fest, daß innerhalb der Art *B. thuringiensis* und der Art *B. cereus* verschiedene H-Serotypen existieren. In ihrer ersten Arbeit testeten die Autoren 24 Stämme von *B. thuringiensis*; es gelang, sie in 6 verschiedene Serotypen ( $H_1$ – $H_6$ ) einzuteilen. In einer zweiten Arbeit (Bonnefoi et De Barjac 1963) wurden nochmals 26 Stämme untersucht und in diesem Zusammenhang zwei neue Serotypen ( $H_7$ ,  $H_8$ ) entdeckt (vgl. Tab. 2 a, 2 b). — Ebenfalls über H-Antigene arbeiteten Kabay (1965) (vgl. Tab. 2 a), Norris (1964) (vgl. Tab. 2 b), Švecova und Zuračova (1966 a) sowie Tumanian und Mitarb. (1966). Bisher konnte in keinem Fall eine H-Antigengemeinschaft zwischen *B. thuringiensis* und einem *B. cereus*-Stamm gefunden werden. Norris beschrieb einen neuen Serotyp (entsprechend der var. *tolworthi*) und Tumanian und Mitarb. einen

1) enthalten Antikörper gegen Kristalle (gelöst in Alkali und anschließend repräzipitiert).



weiteren Serotyp (entsprechend der var. *caucasicus*). Insgesamt sind somit z. Z. 10 H-Serotypen bei *B. thuringiensis* bekannt.

### 5. Antagonisten

Mikroorganismen lassen sich auch auf Grund ihres „antibiotischen“ Verhaltens charakterisieren. Nach Untersuchungen von Vaňková (1957, 1965) produzieren einige Varietäten von *B. thuringiensis* ein gegen grampositive Keime wie *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* und *Staphylococcus aureus* gerichtetes Antibiotikum, so z. B. var. *thuringiensis*, var. *sotto* und var. *entomocidus*. Negativ verhielten sich im Versuch var. *alesti*, var. *dendrolimus* und var. *galleriae*. Bei eigenen Versuchen (Krieg, nicht publ.) konnte eine gegen *Micrococcus lysodeikticus* antagonistische Aktivität bei bestimmten (aber nicht allen geprüften) Stämmen der var. *thuringiensis*, var. *finitimus* und var. *entomocidus* registriert werden, dagegen nicht bei Stämmen der var. *alesti*, var. *dendrolimus* und var. *galleriae*. Krassilnikov und Gukasjan (1964) gelangten zu weitgehend gleichen Ergebnissen anhand von Untersuchungen an *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus* und anderen grampositiven Testorganismen. Außerdem fanden diese Autoren auch eine antibiotische Aktivität bei var. *alesti* (jedoch nicht wirksam gegen *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus*). Keine antibiotische Wirksamkeit wurde nach wie vor beobachtet bei var. *dendrolimus* und var. *galleriae*.

Besonders bemerkenswert ist jedoch der antagonistische Effekt, den Krassilnikov und Gukasjan zwischen verschiedenen Varietäten von *B. thuringiensis* beobachten konnten. Es lassen sich hiernach 4 charakteristische Gruppen unterscheiden: (a) Stämme ohne antagonistische Aktivität wie var. *dendrolimus*, var. *tuviensis*, var. *galleriae*; (b) Stämme ohne antagonistische Reaktion wie var. *thuringiensis*, var. *sotto*, var. *entomocidus* (*subtoxicus*); (c) Stämme, die zwar nie den eigenen Typus hemmen, aber andere reaktive Stämme. Hierher gehören var. *thuringiensis*, var. *finitimus*, var. *alesti*, var. *sotto* und var. *entomocidus*; (d) reaktive Stämme, die durch antagonistische aktive Stämme merklich gehemmt werden: var. *finitimus*, var. *alesti*, var. *dendrolimus* und var. *tuviensis*. — Diese Verhältnisse bedürfen noch weiterer Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf die Natur der Hemmung, die sowohl durch bakteriolytische Enzyme als auch durch Antibiotica oder Bacteriocine hervorgerufen sein kann. Schließlich könnte auch Wirkung von Bakteriophagen im Spiele sein.

### 6. Lysotypen

Virulente Bacteriophagen wurden sowohl aus Insektdärmen als auch aus lysogenen Kulturen isoliert. Versuche, Stämme von *B. thuringiensis* mittels virulenter Phagen voneinander zu differenzieren und von *B. cereus* abzutrennen, wurden von Yoder und Nelson (1960), Afrikan (1960), Gochnauer (1960), Norris (1961), Švecova (1963), Chačatrjan und Rautenstein (1963), Rautenstein und Mitarb. (1964), Švecova und Zurbova (1966 a) sowie Tumanian und Mitarb. (1966) unternommen. Alle getesteten Phagen waren jedoch weder varietäts- noch art-spezifisch.

Besondere Aufmerksamkeit widmeten Rautenstein und Mitarb. sowie Tumanian und Mitarb. der Lysogenie<sup>1)</sup> in der *B. cereus/B. thuringiensis*-

<sup>1)</sup> Unter Lysogenie wird die Fähigkeit von Bakterien verstanden, Phagen spontan zu produzieren. In dem lysogenen Bakterium liegt dabei der Phage bis zu seiner Induktion in einer nicht-infektiösen, dem Genom integrierten Form (Prophage) vor.

Gruppe. Die meisten der lysogenen Stämme waren resistent gegenüber virulent gewordenen Eigen-Phagen. Ausgehend von diesen Befunden verglichen T u m a n i a n und Mitarb. die lysotypischen Eigenschaften der *B. cereus/B. thuringiensis*-Gruppe mit denen von *B. anthracis*. Sie testeten 30 virulente Phagen von *B. thuringiensis* und 2 virulente Phagen von *B. cereus* gegenüber 19 Stämmen von *B. anthracis* (darunter 15 virulenten). In keinem Fall konnte irgend eine infektiöse lytische Reaktion bei den *B. anthracis*-Stämmen festgestellt werden. Lediglich 2 Phagolysate (aus var. *thuringiensis*- und var. *galleria*-Kulturen) erzeugten bei dem sog. S t e r n - V a k z i n e - Stamm von *B. anthracis* eine Lyse; diese Wirkungen waren aber nicht übertragbar und dürften daher nicht auf einer Phagen-Infektion beruhen. Während sich in der *B. cereus / B. thuringiensis*-Gruppe wechselseitig kristallbildende Stämme und Nicht-Kristallbildner als Indikatoren zum Nachweis von lysogenen Stämmen eignen, war keiner der untersuchten 19 *B. anthracis*-Stämme als Indikator brauchbar im Hinblick auf die *B. cereus/B. thuringiensis*-Gruppe (geprüft wurden 9 lysogene Stämme von *B. cereus* und 11 lysogene Stämme von *B. thuringiensis*). Ebenfalls eigneten sich umgekehrt keine Stämme der *B. cereus / B. thuringiensis*-Gruppe als Indikatoren für Lysogenie bei *B. anthracis*. — Abgesehen von solchen, in ihrem Wirkungsspektrum auf die *B. cereus / B. thuringiensis*-Gruppe beschränkte Phagen, existieren auch noch polyvalente Phagen, die sogar *B. anthracis* angreifen. So berichteten Y o d e r und N e l s o n (1960) z. B. über einen aus *B. thuringiensis* isolierten Phagen a, der außer *B. t. var. thuringiensis* auch noch 3 Stämme von *B. anthracis* zu lysieren vermochte, hingegen nicht einen 4. Stamm. Diesem Phagen a gegenüber erwiesen sich *B. cereus* und *B. t. var. sotto* als resistent; die Empfindlichkeit von *B. t. var. alesi* war Stamm-spezifisch.

## 7. Taxonomie

### a) *Bacillus anthracis* und die *B. cereus / B. thuringiensis*-Gruppe

Für eine Abtrennung des *B. anthracis* von der *B. cereus / B. thuringiensis*-Gruppe sprechen nicht nur praktische Gesichtspunkte der Human- und Veterinär-Medizin. Die Angabe eines Ähnlichkeits-Indexes von 70 % zwischen *B. anthracis* und *B. cereus / B. thuringiensis* (L y s e n k o 1963) entspricht sicher nicht den wahren Verhältnissen. Der Grund hierfür liegt in der Art und Weise der Auswahl von Eigenschaften und ihrer Beurteilung nach der statistischen Methode von S n e a t h (1957); vgl. auch c).

Ohne auf die zahlreichen Arbeiten von medizinischer Seite zur Differential-Diagnose von *B. anthracis* im einzelnen einzugehen, seien hier nur zwei wichtigere und neuere Arbeiten referiert:

B r o w n und Mitarb. (1958) benutzten zur Abgrenzung von 122 *B. anthracis*-Stämmen (gegenüber 115 *B. c. var. cereus*- und 70 *B. c. var. mycoides*-Stämmen) als diagnostische Merkmale erfolgreich: (1) Fehlende Beweglichkeit, (2) Lyse durch  $\gamma$ -Phagen<sup>1)</sup> sowie (3) Pathogenität gegenüber Kaninchen (jedoch nicht gegenüber Mäusen, da sich ihnen gegenüber auch *B. cereus*-Stämme pathogen verhalten können).

<sup>1)</sup> von B r o w n und C h e r r y (1955) isolierter artspezifischer *B. anthracis*-Phage.

K n i s e l y (1965) untersuchte vergleichend 21 *B. anthracis*-Stämme, 9 Stämme von *B. c. var. cereus*, 5 Stämme von *B. c. var. mycoides*, 2 Stämme von *B. thuringiensis* sowie 18 Stämme von 5 weiteren *Bacillus*-Arten. Nach seinen Befunden sind für *B. anthracis* folgende Merkmale charakteristisch: (1) Fehlende  $\beta$ -Hämolyse auf Blutplatten, (2) Fehlende Beweglichkeit (s. o.), (3) Typische Koloniebildung, (4) Hemmung von Wachstum auf Phenyläthylalkohol- oder Chloralhydrathaltigen Medien (18 h bei 37° C), außerdem (5) Hemmung auf Penicillin-Agar und eine positive „Perlenketten“-Reaktion<sup>1)</sup>. Alle untersuchten *B. anthracis*-Stämme waren ferner (6) durch  $\gamma$ -Phagen (s. o.) lysierbar.

Als Selektivmedium für *B. anthracis*, welches *B. thuringiensis*, *B. cereus* und andere Sporenbildner unterdrückt, empfiehlt K n i s e l y (1966) einen Herzinfus-Agar, der als Inhibitoren Polymyxin, Lysozym, Äthylendiaminotetraazetat und Thalliumazetat enthält.

P r o o m und K n i g h t (1955) konnten wesentliche Unterschiede im Verwendungsstoffwechsel von *B. anthracis* einerseits und der *B. cereus* / *B. thuringiensis*-Gruppe andererseits feststellen: *B. cereus* und *B. thuringiensis* sind weit weniger heterotroph als *B. anthracis*. Während die beiden ersten Arten nur 7 essentielle Aminosäuren zum Wachstum benötigen, braucht *B. anthracis* nicht nur 16 essentielle Aminosäuren, sondern auch noch Thiamin als Wuchsstoff.

Die Unterschiede im Hinblick auf den Verwendungsstoffwechsel und die Vielfalt der anderen zur Differentialdiagnose auswertbaren Eigenschaften (bzgl. Serologie s. S. 16 und Lysotopie s. S. 13) lassen erkennen, daß eine Umwandlung von *B. thuringiensis* oder von *B. cereus* in *B. anthracis* auf keinen Fall durch einen Mutations-Schritt erreichbar ist. Im übrigen beruht die Pathogenität von *B. anthracis* und die potentielle Pathogenität von *B. cereus* auf ganz verschiedenen Mechanismen:

So führt bekanntermaßen die perorale Aufnahme von virulentem *B. anthracis* speziell bei Ungulaten zu einer echten Infektion, dem Darm-Milzbrand. Nach Eindringen in die Blutbahn bewirkt der Erreger eine Septikämie und befällt Gewebe und Organe (Milz) zum Teil sogar intracellulär. — Demgegenüber hat *B. cereus* keine akute Wirkung und eine *B. cereus*-Bakteriämie nach peroraler Applikation wird normalerweise nicht beobachtet. Lediglich, wenn der Bazillus in massiven Dosen verfüttert wird (z. B. beim Menschen  $10^4 \cdots 10^5$  veg. Zellen/g Diät<sup>2)</sup>), kann es zu einer toxischen Gastroenteritis kommen.

Nach L a m a n n a und J o n e s (1963) beträgt bei *B. anthracis* die LD<sub>50</sub> nach intraperitonealer Injektion bei (virulenten) Stämmen  $3 \cdots 8$  Sporen/Maus bzw.  $8 \cdots 43$  vegetative Zellen/Maus<sup>3)</sup>. Im Vergleich dazu liegen die LD<sub>50</sub>-Werte nach intraperitonealer Injektion bei (potentiell pathogenen) *B. cereus*-Stämmen bei  $6 \cdots 30 \times 10^7$  Sporen/Maus bzw.  $1 \cdots 3 \times 10^7$  vegetative Zellen/Maus.

Die Bakteriämie bei einer letalen *B. anthracis*-Infektion des Meerschweinchens führt zu Werten von  $3 \times 10^5 \cdots 1 \times 10^9$  Ketten vegetativer Zellen pro ml Blut.

<sup>1)</sup> Mikroskopisch sichtbare zytotoxische Reaktion von *B. anthracis*-Zellen auf Penicillin-Zusatz.

<sup>2)</sup> H a u k e (1961).

<sup>3)</sup> Bemerkenswert ist die höhere Wirksamkeit von Sporen im Vergleich zu vegetativen Zellen.

Doch bereits 1/300 dieses Blutspiegels wirkt letal (Smith 1963). Die Todesursache dürfte ein (sekundärer) oligämischer Schock sein. Nach Stanley und Smith (1963) besteht das Anthrax-Toxin aus drei synergistisch wirkenden Komponenten: Dem Ödemfaktor, dem eigentlichen Antigenanteil (protective antigen) und dem Letalitätsfaktor. Über die Isolierung und Charakterisierung der einzelnen Faktoren berichtete u. a. Fish (1966).

Eine mit der Virulenz von *B. anthracis*-Stämmen gekoppelte Eigenschaft ist die Bildung einer mikroskopisch (durch Negativfärbung) gut darstellbaren (antigen wirksamen) Kapsel aus Poly- $\gamma$ -Glutamyl in der stationären Phase<sup>1)</sup>. Sie erfolgt in vivo und unter bestimmten Bedingungen (CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und Fettsäure-Adsorbentien) auch in vitro. Die Kapsel wirkt vor allem antiphagozytär und anti-anthracid. Sie schafft auf diese Weise die Voraussetzungen für eine wirksame Reproduktion von virulenten *B. anthracis*-Zellen in vivo. — Avirulente Stämme vermögen jedoch noch lösliches Antigen (s. o.) zu bilden und so nach parenteraler Applikation in Wirbeltiere in diesen die Bildung wirksamer Antitoxine zu induzieren (was wichtig für ihre Brauchbarkeit zur Vakzination ist).

Über eine brauchbare Differenzierung von *B. anthracis* (auch der avirulenten Stämme) von *B. cereus* auf Grund ihrer verschiedenen löslichen Toxine haben Burdon und Wende (1960), Bonventre und Eckert (1963) und Bonventre (1965) berichtet: Das von *B. anthracis* gebildete Toxin tötet nach i.v.-Injektion Albinoratten, ist dagegen weitgehend unwirksam gegenüber Albinmäusen, die ihrerseits von dem löslichen Toxin des *B. cereus* schnell abgetötet werden. Nach Bonventre (1965) eignen sich zur Differenzierung von *B. anthracis*-Toxin auch Mäuse-Embryonalzellen, Meerschweinchen-Hirnzellen und KB-Zellen: sie werden nur vom *B. cereus*-Toxin abgetötet. Die toxische Wirkung der Kultur-Filtrate von *B. cereus* ist allerdings zeitlich begrenzt: Sobald die Kultur ihre stationäre Phase erreicht hat, wird das lösliche Toxin im Kulturmedium inaktiviert. Sporen-Präparate enthalten also kein Toxin mehr.

Nach i.v.-Injektion von Toxin-haltigen Kulturfiltraten von *B. anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* in Kaninchen wird ein auffallender Anstieg des Serumphosphatase-Spiegels nur im Falle der beiden letztgenannten Arten beobachtet (Slein und Logan 1962). Der Faktor kann von entsprechenden Antikörpern neutralisiert werden, jedoch nicht von Antikörpern gebildet gegen *B. anthracis*-Toxin. Nach Slein und Logan macht der Phosphatasämiefaktor alkalische Serumphosphatase unter anderem aus Erythrozyten, Leukozyten, Knochenzellen und Nierenzellen frei.

Während man bisher der Auffassung war, daß die Toxizität von *B. cereus*-Filtraten z. B. gegenüber Mäusen an die Phospholipase-Fraktion gebunden sei oder zumindest an die Hämolysin-Fraktion (vgl. Slein und Logan 1965), so scheint dies nach neueren Untersuchungen von Johnson und Bonventre (1966) doch nicht der Fall zu sein.

Für die Differenzierung des *B. anthracis* von der *B. cereus* / *B. thuringiensis*-Gruppe ist auch bedeutsam, daß *B. anthracis* keine oder keine nennenswerten

<sup>1)</sup> Eine Poly- $\gamma$ -Glutamyl-Kapsel kommt auch bei manchen Stämmen des *B. megatherium* vor. Die von gewissen Stämmen des *B. cereus* und von *B. megatherium* produzierte zellumgebende Schleimschicht besteht hingegen aus Polysacchariden.

Tab. 2 a. Biochemische und serologische Eigenschaften in der *B. cereus* / *B. thuringiensis*-Gruppe (nach Kabay 1965 und De Barjac et Bonnefoi 1962)

Art, Varietät, Stamm	Serotyp (H-Antigen)	Endotoxin-Kristall	Azetylmethylcarbinol-Produktion	Säure aus Salicin	Säure aus Saccharose	Stärke-Hydrolyse	Fett-Hydrolyse	Lezithinase-Produktion (Eidotter)	Urease
<i>B. t.</i> var. <i>thuringiensis</i> <sup>1)</sup> ATCC 10 792	II (=H <sub>1</sub> )	+	+	+	+	+	+	+++	—
<i>Bt. t.</i> var. <i>alesti</i> <sup>1)</sup> B 4089	H <sub>3</sub>	+	+	—	—	+	—	+	—
<i>B. t.</i> var. <i>sotto</i> <sup>1)</sup> CCEB	H <sub>4 a, b</sub>	+	+	—	+	+	—	+	—
<i>B. cereus</i> (4156/c) <sup>1)</sup> Stamm Altdorf	I	—	+	+	+	+	+	+++	—
<i>B. cereus</i> (B 4126) <sup>1)</sup> Stamm Darmstadt	III	—	+	—	—	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> <sup>1)</sup> ATCC 10 702	IV	—	+	—	—	+	+	++	—
<i>B. cereus</i> <sup>2)</sup> A 30	H <sub>(A 30)</sub>	—	+	—	+	—	•	++	•

<sup>1)</sup> nach Kabay (1965).

<sup>2)</sup> nach De Barjac et Bonnefoi (1962).

Mengen von Phospholipase, Hämolysin, Phosphatasämie-Faktor und Mäuse-Letalitätsfaktor produziert<sup>1)</sup>.

#### b) Die *B. cereus*/*B. thuringiensis*-Gruppe

Von der schon fast klassischen Unterscheidung zwischen Kristallbildnern und Nicht-Kristallbildnern leitet die Species *B. thuringiensis* (gegenüber *B. cereus*) ihre Daseinsberechtigung ab<sup>2)</sup>. Im Vergleich zu dieser Merkmalsalternative sind alle anderen Versuche, weitere Arten von Kristallbildnern (*B. entomocidus*, *B. finitimus*) und von Nicht-Kristallbildnern aufzustellen, oder auch nach anderen Einteilungsprinzipien zu verfahren, heute in den Hintergrund getreten<sup>3)</sup>.

Tabelle 2 a vergleicht die variablen biochemischen und serologischen Eigenschaften von *B. thuringiensis* und *B. cereus*-Stämmen nach K a b a y (1965) und anderen. Dabei zeigt sich, daß außer dem Besitz von varietäts-spezifischen H-Antigenen keine auffallenden Unterschiede insbesondere biochemischer Art existieren. Die untersuchten *B. cereus*-Stämme besitzen auch alle die für die *B. thuringiensis*-Gruppe konstanten Eigenschaften (vgl. Abschnitt 3 b). Lediglich die Bildung von Endotoxin-Kristallen ist für die der Species *thuringiensis* zugeordneten Stämme charakteristisch.

Das Vorkommen von mutativen Minus-Varianten (L y s e n k o 1960, G r e l e t 1966, K r i e g, nicht publ.) hinsichtlich der Kristallbildung hat allerdings immer wieder die Frage aufgeworfen, ob die Aufstellung der Art *B. thuringiensis* wirklich gerechtfertigt sei und ob nicht die Auffassung von T o u m a n o f f und L e C o r r o l l e r (1959) *B. thuringiensis* als eine Varietät von *B. cereus* zu betrachten, den zweifellos bestehenden phylogenetischen Beziehungen zwischen den beiden Arten besser Rechnung trüge. Aber zu welchen Konsequenzen führte diese Argumentation gegenüber asporogenen Mutanten von *Bacillus*-Arten?<sup>4)</sup>

#### c) Typendifferenzierung bei *Bacillus thuringiensis*

Eine erste Einteilung der verschiedenen Stämme von *B. thuringiensis* wurde auf Grund biochemischer Leistungen versucht (H e i m p e l and A n g u s 1958, T o u m a n o f f et L e C o r r o l l e r 1959, K r i e g 1961). Anhand dieser Kriterien wandte L y s e n k o (1963, 1964) das Adanson'sche Prinzip auf die Taxonomie von *B. thuringiensis* an. Es standen ihm 41 Stämme der *B. cereus*/*B. thuringiensis*-Gruppe zur Verfügung, darunter 36 Kristallbildner. Diese wurden an Hand von 25 Eigenschaften nach der statistischen Methode von S n e a t h (1957) miteinander verglichen. Aus den Ähnlichkeits-Koeffizienten ergab sich eine gewisse Abgrenzung der meisten *B. thuringiensis*-Stämme (var. *galleriae*, var. *alesti*, var. *thuringiensis*, var. *sotto*, var. *subtoxicus*) gegenüber *B. cereus*. Aber deutliche Ausreißer (wie var. *finitimus* und var. *dendrolimus*) zeigten klar die

<sup>1)</sup> Mit dem insektiziden ( $\beta$ -)Exotoxin mancher Stämme von *B. thuringiensis* (s. S. 34) haben diese Faktoren nichts zu tun. Sie sind thermolabil und besitzen Protein-Charakter.

<sup>2)</sup> Im Bereich des Genus *Bacillus* existieren außer *B. thuringiensis* noch weitere insektenpathogene Kristallbildner, wie z. B. *Bacillus popilliae*, die jedoch der *B. cereus*-Gruppe nicht nahe stehen. Von ihnen soll in diesem Zusammenhang nicht die Rede sein.

<sup>3)</sup> 1961 hatte z. B. N o r r i s vorgeschlagen, die *B. cereus*/*thuringiensis*-Gruppe nach ihrer Lezithinase-Produktion taxonomisch zu beurteilen. Beide so postulierten biochemischen Gruppen umfaßten dann allerdings Stämme mit und ohne Kristallbildung.

<sup>4)</sup> Eine akristallophore und asporogene Mutante von *B. thuringiensis* isolierte G r e l e t 1966.

Tab. 2 b. Biochemische und serologische Eigenschaften von *Bacillus thuringiensis*  
(nach Norris 1964 und De Barjac et Bonnefoi 1967)

Varietät	Esterase-Muster	Serotyp (H-An-tigen)	Acetyl-methyl-carbinol-Produktion	Säure aus Saccharose	Säure aus Mannose	Stärke-Hydrolyse	Lezithin-Produktion (Eidotter)	Pigment-Produktion (Eidotter)	Proteolyse	Urease
<i>thuringiensis</i> <sup>1)</sup>	1	H <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	—	+	—
<i>finitimus</i>	2	H <sub>2</sub>	+	+	—	—	+	—	+	—
<i>alesti</i>	3	H <sub>3</sub>	+	—	—	+	—	+	+	—
<i>sotto</i>	4 s	H <sub>4</sub> a, b	+	+	—	+	—	—	+	—
<i>dendrolimus</i>	4 d	H <sub>4</sub> a, b	+	—	—	+	—	—	+	—
<i>kenyae</i>	4 k	H <sub>4</sub> a, c	+	—	—	+	—	—	+	—
<i>galleriae</i>	5	H <sub>5</sub>	+	—	—	+	—	—	+	+/-
<i>aizawai</i>	5	H <sub>7</sub>	+	—	—	+	—	—	+	+
<i>entomocidus</i>	6	H <sub>6</sub>	+/-	+	+	+	—	—	+	—
<i>morrisoni</i>	8	H <sub>8</sub>	+	+	—	+	—	—	+	—
<i>tokworthi</i>	9	H <sub>9</sub>	+	— <sup>2)</sup>	—	+	+	—	+	—

<sup>1)</sup> Ausgehend von der Auffassung, daß den Biotypen Subspecies-Charakter zukommt, ist es allein richtig, die type variety mit dem Taxon „*thuringiensis*“ zu bezeichnen, wie es die Nomenklaturregeln vorschreiben. Das gelegentlich (De Barjac et Bonnefoi 1962, Norris 1964) hierfür benutzte Nomen „berliner“ gilt als Autorennamen „Berliner“ für die gesamte Art.

<sup>2)</sup> + nach De Barjac et Bonnefoi (1967).

Grenzen des Verfahrens. Da für eine statistische Auswertung alle Kriterien gleichrangig behandelt werden, führt dies zum Verwischen entscheidender Unterschiede (s. a. E t t l i n g e r 1964 und H e i m p e l 1967).

Es bedeutete daher einen wesentlichen Fortschritt, als D e B a r j a c und B o n n e f o i (1962, 1967) sowie B o n n e f o i und D e B a r j a c (1963) zeigen konnten, daß ihre Serotypen (H-Antigene) mit den biochemischen Typen weitgehend korrespondieren. Schließlich brachte die Einführung der Endoesterase-Analyse durch N o r r i s (1964) eine weitere Festigung der Biotypen. Zur Zeit sind 8 biochemische Typen, 9 Serotypen und 11 Esterase-Muster genauer bekannt (s. Tab. 2 b). — Während die biochemischen, serologischen und enzym-analytischen Eigenschaften innerhalb der Biotypen weitgehende Übereinstimmung zeigen, kommen auch Ausnahmen vor: In einem Fall (*sotto* / *dendrolimus*-Gruppe) erlaubt die Esterase-Analyse eine Differenzierung zwischen 2 serologisch identischen Varietäten. In einem anderen Fall (*galleriae* / *aizawai*-Gruppe) gelingt es mittels der serologischen Analyse 2 Typen zu unterscheiden, die beide das gleiche Esterase-Muster aufweisen. In verschiedenen anderen Fällen zeigen verschiedene Antigen- oder Esterase-Typen gleiche Stoffwechselleistungen: So existieren 2 Stoffwechsel-Typen der var. *entomocidus*, von denen der eine Acetylmethylcarbinol bildet, der andere nicht. Bemerkenswert ist auch die Aufspaltung der serologischen Gruppe 4 in die Untergruppe (a, b) (= var. *sotto* / var. *dendrolimus*) und (a, c) (= var. *kenyae*).

Isoliert steht noch der Kristallbildner *Bacillus fowleri* bzw. *B. t.* var. *fowleri* (H e i m p e l 1967). Er bildet Kristalle, welche aber (ähnlich wie bei var. *finitimus*) fest mit der Spore verhaftet sind; seine Insektenpathogenität ist unbedeutend. Im Gegensatz zu den übrigen Varietäten von *B. thuringiensis* ist die var. *fowleri* nicht begeißelt und gehört somit keinem H-Serotyp an.

Die von P e n d l e t o n und M o r r i s o n (1966 a) inaugurierte serologische Analyse der Endotoxinkristalle erbrachte keine spezifischen Antigenmuster für die bisherigen (durch H-Antigene oder Esterasemuster charakterisierten) Varietäten. Es gelingt mit ihr lediglich in bestimmten Fällen innerhalb der bisherigen Varietäten Stämme voneinander zu differenzieren: z. B. *B. t.* var. *thuringiensis* den sog. M a t t e s - Stamm (= a)<sup>1)</sup> von dem sog. Deutschen Galleria-Stamm<sup>2)</sup> (= i) und den meisten übrigen Stämmen dieser Varietät (= adi) oder z. B. bei *B. t.* var. *alesti* den sog. Alesti-Stamm (= hi) von dem Anduze-Stamm (= ad) und dem sog. Euxoa-Stamm (var. *euxoae* auct.)<sup>3)</sup> (= acfi).

Analog zur Berücksichtigung der Endotoxin-Produktion bei der Trennung von *B. thuringiensis* und *B. cereus* hat H e i m p e l (1967) vorgeschlagen, auch die Produktion von Exotoxin taxonomisch zu verwerten. So schlägt er beispielsweise vor, die var. *thuringiensis* zu teilen in einen a) Exotoxin-positiven Biotyp = var. *thuringiensis* und einen b) Exotoxin-negativen Biotyp = var. *amuscatotoxicus*.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Die *B. cereus* / *B. thuringiensis*-Gruppe ist diagnostisch gut abgrenzbar von dem Milzbrand-Erreger *B. anthracis*. Das gilt sowohl bezüglich physiologischer als

<sup>1)</sup> In Klammer: Antigenformel.

<sup>2)</sup> isoliert von K r i e g 1955, vgl. K r i e g und F r a n z 1959 sowie T o u m a n o f f et L e C o r r o l l e r 1959.

<sup>3)</sup> isoliert von K r i e g 1955, vgl. T o u m a n o f f et L e C o r r o l l e r 1959.



auch pathologischer Leistungen. Auf Grund der Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften ist es unwahrscheinlich, daß *B. cereus* oder *B. thuringiensis* jemals in einen gefährlichen *anthracis*-ähnlichen *Bacillus* mutieren kann. — Die Bildung von Endotoxin-Kristallen gilt als entscheidendes Art-Merkmal von *B. thuringiensis* (im Gegensatz zu *B. cereus*). — Zur Differenzierung der verschiedenen Varietäten von *B. thuringiensis* eignen sich u. a. Analysen der Esterase-Muster und der Geißel-Antigene. Innerhalb der Varietäten lassen sich noch Stämme anhand von Teilantigenen der Endotoxin-Kristalle unterscheiden. — Neuerdings ist auch die Frage aufgeworfen worden, ob es nicht zweckmäßig sei, eine taxonomische Trennung zwischen Exotoxin-positiven und -negativen Stämmen von *B. thuringiensis* vorzunehmen.

### C. Wirksamkeit gegenüber Insekten

Die Wirksamkeit des *B. thuringiensis* gegenüber Insekten ist — soweit es sich um eine perorale Infektion handelt — primär das Ergebnis von Toxinwirkungen. Man unterscheidet dabei eine (auf Lepidopteren beschränkte) Endotoxinwirkung und eine Exotoxinwirkung<sup>1)</sup>.

#### 1. Endotoxin-Kristall<sup>2)</sup>

##### a) Produktion und physiologisch-chemische Eigenschaften

Das charakteristische Art-Merkmal von *B. thuringiensis* ist die Produktion von parasporalen Kristallen. Sie sind unlöslich in neutralem Wasser, in Salzsäure und organischen Lösungsmitteln (Hanna 1953). Ihre toxische Wirksamkeit gegenüber Insekten ist thermolabil<sup>3)</sup>. In Wirbeltiere injiziert, induzieren die Kristalle die Bildung von Antikörpern (über die Serologie der Endotoxin-Kristalle s. S. 14).

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen eine enge Kopplung zwischen Sporenbildung und Kristall-Synthese erkennen. Smirnofff konnte eine Entkoppelung der beiden Vorgänge durch physikalische und chemische Verfahren experimentell durchführen: Bei Reduktion der Bebrütungstemperatur (< 15° C) bildete zwar noch ein Teil der Zellen Kristalle, aber keine Sporen mehr (Smirnofff 1963 a). Umgekehrt unterdrückte Harnstoff in geeigneter Dosierung zwar die Kristallbildung, nicht aber die Sporulation (Smirnofff 1963 b). Untersuchungen mit der Isotopentechnik und auch serologische Untersuchungen zeigten, daß die Kristall-Synthese de novo aus Aminosäuren erfolgt. Sie steht wohl im Zusammenhang mit weitgehenden Synthesen auch anderer Proteine in der Sporulationsphase (Monro 1961 a, b). — Werden Submerskulturen von *B. thuringiensis* abzentrifugiert, so gehen Sporen und Endotoxin-Kristalle in das Sediment. Eine Trennung der Endotoxin-Kristalle von den Sporen wurde mit verschiedenen Verfahren (fraktionierte Sedimentation, Gradienten-Sedimentation,

<sup>1)</sup> Unter Exotoxinen versteht man (in Analogie zu Exoenzymen) von lebenden Zellen sezernierte Wirkstoffe im Gegensatz zu Endotoxinen (und Endoenzymen), die erst nach der Zerstörung von Zellen bzw. Sporangien frei werden.

<sup>2)</sup>  $\delta$ -Endotoxin nach Heimpele (1967).

<sup>3)</sup> Im Gegensatz etwa zu den Endotoxinen von Enterobacteriaceen vom Typus der O-Antigene, die Zellwandbestandteile darstellen.

Phasen-Separation) versucht: H a n n a y and F i t z - J a m e s (1955), A n g u s (1956), V a n k o v á (1957), A n g u s (1959), M o n r o (1961 a), L e c a d e t (1965), B a t e s o n (1965), P e n d l e t o n and M o r r i s o n (1966 b). N a c h M o n r o (1961 b) beträgt die Dichte der Kristalle 1,41.

Eine Lyse der Endotoxin-Kristalle unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität ist in vitro möglich entweder durch Darmsaft empfindlicher Raupen, oder mit Hilfe von Alkali (pH  $\approx$  12,0), oder mittels 1 %igem Natriumthioglykolat bei pH 11,5 (Y o u n g and F i t z - J a m e s 1959 a) bzw. 0,1 m Natriumthioglykolat bei pH 9,5 (L e c a d e t 1966) oder auch mit Trispuffer von pH 8,6 (F a u s t and E s t e s 1966). Die so erhaltene Endotoxin-Lösung ist oberhalb pH 6 stabil. Rekristallisationen konnten bisher nicht erreicht werden. Das Protein fällt aus Lösungen nach pH-Reduktion (pH 4-5), Dialyse oder Zusatz von Ammoniumsulfat (2 %) amorph aus.

Obgleich verschiedene Bedingungen für die Löslichkeit der Endotoxin-Kristalle bekannt sind (hohes pH, niedriges rH) ist der Mechanismus des lytischen Prozesses, der zur Erzeugung wirksamer Spaltprodukte führt, noch nicht sicher aufgeklärt. Y o u n g and F i t z - J a m e s (1959 a) nahmen eine Spaltung von Disulfid-Brücken an. Doch spricht der niedrige Gehalt der Kristalle an Cystin/Cysteine ( $\sim$  1,1 %) nach F a u s t und E s t e s (1966) gegen eine solche Möglichkeit. Da den gleichen Autoren der Nachweis von 0,3-0,4 % Silizium in den Kristallen gelang, sind sie der Ansicht, daß die Auflösung von Kristallen in vivo wie in vitro primär von der Lyse des Siliziumgerüsts der Kristalle (z. B. durch alkalische, reduzierende Reagenzien) abhängt. Die Löslichkeit von Endotoxin-Kristallen in verschiedenen Reagenzien gibt Tab. 3 wieder.

Tab. 3. Löslichkeit der Kristalle von *B. t.* var. *morrisoni* (Stamm G<sub>2</sub>)  
(nach F a u s t und E s t e s 1966)

Reagens	pH	% gelöst nach 2 h
0,10 m Tris-Puffer	8,6	15,1
0,05 m Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 0,05 m NaCl	11,1	8,3
0,05 m NaCl in 0,05 m Borat-Puffer	8,5	0

Alkali-gelöste Endotoxin-Kristalle besitzen ein charakteristisches UV-Spektrum: Minimale Absorption bei  $\lambda = 265 \text{ m}\mu$  und maximale Absorption bei  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$  (A n g u s 1956, L e c a d e t 1965). — H o l m e s und M o n r o (1965) bestimmten den Gehalt der Kristalle an N zu 16,5 % und an P zu 0,09 %. Nach H a n n a y and F i t z - J a m e s (1955), H a n n a y (1956), A n g u s (1956), L e c a d e t (1965), H o l m e s und M o n r o (1965) u. a. verteilen sich 85-91 % des Gesamt-N-Anteiles der Kristalle auf 18 Aminosäuren<sup>1)</sup>. Der hohe Gehalt an Aminocarbonsäuren (Asp und Glu) von etwa 25 % dürfte die Lage des isoelektrischen Punktes des Endotoxins bei pH 5 bedingen. — Die Kristalle enthalten keine Nukleinsäure (H a n n a y and F i t z - J a m e s), aber 0,5 % Kohlenhydrate (H o l m e s and M o n r o). Bei dem Hauptanteil der Kristalle handelt es sich um ein P r o t e i n bzw. Proteid.

<sup>1)</sup> Ala, Arg, Asp, CyS(H), Glu, Gly, His, i-Leu/Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Try, Tyr, Val.

Während Young und Fitz-James (1959 a) mit der analytischen Ultrazentrifuge und mittels Elektrophorese nur eine homogene Proteinfraction in der Lösung von Endotoxin-Kristallen feststellen konnten, fanden Holmes und Monroe (1965) 2 Komponenten im Verhältnis von etwa 1 : 1. Ihre Sedimentationskonstanten waren:  $S_{20}(a) = 4,1$  und  $S_{20}(b) = 0,4 \cdots 0,8$ . — Lecadet (1966) gelang der Nachweis von 3 bzw. 4 verschiedenen Komponenten in Thioglykolat-Lysaten (pH 9,5) von Endotoxinkristallen:  $S_{20}(s_1) = 0,83 \cdots 0,84$ ,  $S_{20}(s_2) = 3,99 \cdots 6,06$ ,  $S_{20}(s_3) = 8,2 \cdots 9,6$  und die gelegentlich fehlende  $S_{20}(s_4) = 11 \cdots 27$ . Der Anteil dieser Komponenten in verschiedenen Lysaten war abhängig von der Einwirkungszeit der Thioglykolat-Lösung. Bei der Fraktion  $s_1$  — entsprechend einem Molekulargewicht von  $10^4$  — gelang die Charakterisierung durch Analyse der terminalen  $\text{NH}_2$ -Gruppen als Derivate der Aminosäuren Asp, Glu, Ser und Lys im Verhältnis von 2 : 3 : 2 : 2. Die gleichen terminalen Aminosäuren treten auf, wenn die Endotoxinkristalle in Alkali bei hohem pH gelöst wurden. Dies spricht nach Lecadet dafür, daß bei der artifiziellen Lyse (durch Reduktionsmittel sowohl als auch durch Alkalien) keine Peptidketten gelöst werden, sondern lediglich nicht-kovalente Bindungen wie z. B. Sulfid-Brücken.

Über die Serologie des Kristall-Proteins und von Lysaten wurde bereits berichtet (s. S. 14). Weitere Ergebnisse s. S. 33.

Unterlagen über die Kristall-Struktur erarbeiteten Hannay und Fitz-James (1955), Norris und Watson (1960), Labaw (1964), Holmes und Monroe (1965), sowie Vaňková und Králík (1966): Charakteristisch ist die Diamantform (nicht regulärer Oktaeder)<sup>1</sup>. An Replika-Präparaten konnte eine charakteristische Gitterstruktur der Kristall-Oberflächen beobachtet werden mit einer Periode von 260  $\cdots$  280 Å. Röntgen-Diffraktionsmessungen ergaben vergleichbare Werte (Holmes and Monroe). Nach Labaw werden die Kristalle gebildet aus oberflächenzentrierten kubischen 'Zellen' ( $a' = 123 \text{ \AA}$ )<sup>2</sup>. Holmes und Monroe nehmen dagegen tetragonale 'Zellen' ( $a = 90 \text{ \AA}$ ,  $c = 269 \text{ \AA}$ ) als Bausteine der Kristalle an. — Das Molekulargewicht kalkulierten Holmes und Monroe zu  $2,3 \times 10^5$  für eine asymmetrische Einheit; von diesen Einheiten kommen 8 Stück auf je eine 'Zelle'. Diese Angaben beziehen sich auf Kristalle von *B. t. var. thuringiensis*.

Über Unterschiede in der Kristallform bei verschiedenen Stämmen oder Varietäten, ja selbst bei gleichen Stämmen, die unter verschiedenen Bedingungen gehalten werden, berichteten Toumanoff und Le Coroller (1959), Evlachova und Švecova (1963), Grigороva und Kalucheva (1964) sowie Švecova und Zurbova (1966 b). Demgegenüber stellten Vaňková und Králík (1966) fest, daß bei unter gleichen Bedingungen gehaltenen Stämmen selbst von verschiedenen Varietäten stets die gleiche charakteristische Kristallform auftritt. Allerdings war die Zahl der Gitterlinien und die Anzahl der 'Zellen' (pro Reihe) auch bei den Kristallen eines Stammes verschieden. Typenspezifische Unterschiede ergaben sich nur bei der Messung der Größe der 'Zellen' (von Vaňková und Králík als „Moleküle“ bezeichnet). Sie beträgt bei *B. t.*

<sup>1</sup>) Eine Ausnahme bildet der von Bucher und Mitarb. (1966) isolierte Stamm 562-5 A der var. *thuringiensis* mit weitgehend rechteckigen Kristallen.

<sup>2</sup>)  $a'$  (nach Labaw) entspricht der Diagonalen von  $a^2$  (nach Holmes and Monroe).

var. *entomocidus*  $208 \pm 11 \text{ \AA}$ , bei var. *thuringiensis*  $233 \pm 10 \text{ \AA}$ , bei var. *dendrolimus*  $227 \pm 9 \text{ \AA}$ , bei var. *galleriae*  $270 \pm 11 \text{ \AA}$  und bei var. *subtoxicius*  $277 \pm 4 \text{ \AA}$ .

Über die Toxizität bzw. Virulenz von *B. thuringiensis*-Kulturen bzw. -Präparaten auf der Basis qualitativer und quantitativer Unterschiede ihres Endotoxin-Anteils s. S. 44.

#### b) Toxikologie

Die Lepidopteren-Larven verschiedener Arten reagieren bekanntlich nicht einheitlich auf das Endotoxin von *B. thuringiensis* (vgl. auch Krieg 1961). White und Briggs (1964) untersuchten diese bekannte Tatsache quantitativ anhand von Mortalitäts-Probits. Ihre Befunde sind in Tab. 4 wiedergegeben. Besonders fällt der große Unterschied in der Empfindlichkeit innerhalb der Familie der Noctuiden auf, deren Arten außerdem die Spitze in der Unempfindlichkeit halten. Manche Arten wie z. B. *Agrotis ypsilon* sind praktisch refraktär gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex.

Tab. 4. Empfindlichkeit einer Auswahl von Lepidopteren-Arten gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex (nach White and Briggs 1964)

Art	Familie	D <sub>50</sub> <sup>1)</sup> mg/100 ml	Steilheit der <sup>2)</sup> Regressionsgeraden
<i>Colias eurytheme</i>	Pieridae	0,12	0,85
<i>Estigmene acrea</i>	Arctiidae	1,4	2,1
<i>Peridroma saucia</i>	Noctuidae	1,8	0,63
<i>Trichoplusia ni</i>	Noctuidae	3,2	0,90
<i>Udea profundalis</i>	Pyraustidae	12,0	2,76
<i>Ommatopteryx texana</i>	Pyraustidae	17,0	4,0
<i>Schizura concinna</i>	Notodontidae	24,0	2,19
<i>Nomophila noctuella</i>	Pyraustidae	36,0	3,8
<i>Autographa californica</i>	Noctuidae	43,0	3,2
<i>Spodoptera exigua</i>	Noctuidae	74,0	1,16
<i>Heliothis zea</i>	Noctuidae	100,0	0,87
<i>Prodenia praefica</i>	Noctuidae	150,0	2,45
<i>Agrotis ypsilon</i>	Noctuidae	—	—
<i>Feltia subterranea</i>	Noctuidae	—	—
<i>Pseudaletia unipuncta</i>	Noctuidae	—	—

Heimpel und Angus (1959) machten für die unterschiedliche Empfindlichkeit von Lepidopteren-Raupen in erster Linie deren unterschiedliches Darm-pH verantwortlich, da sich nach ihrer Ansicht die Endotoxin-Kristalle maßgeblich der aktuellen Alkalität im Darmsaft lösen. Dementsprechend unterschieden sie gegenüber dem Endotoxin hochempfindliche Wirte wie *Bombyx mori* mit hoher

1) Das verwendete *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Präparat enthielt  $2 \times 10^{10}$  Sporen/g. Da weder die Belagsdichte noch der Fraßkonsum pro Larve bestimmt wurde, kann die D<sub>50</sub> nicht in Sporen/Tier angegeben werden.

2) Die spezifische Steilheit der Regressionsgeraden (slope) im Mortalitäts-Dosis-Programm ist angegeben durch die Differenz der Mortalitäts-Probits bei einer Dosis-Steigerung um das 10-fache.

Darm-Alkalität ( $\text{pH} \geq 10$ ) und wenig empfindliche wie *Anagasta* (syn. *Ephestia kühniella*<sup>1)</sup> mit geringer Darm-Alkalität ( $\text{pH} \approx 8,9$ ). Die Mehrzahl der empfindlichen Raupen soll sich mit einer mittelhohen Darm-Alkalität zwischen diese beiden Extreme einordnen.

Nach W a t a n a b e (1967) bestehen Unterschiede zwischen dem im Raupendarmsaft (z. B. *Bombyx mori*) lysierten Endotoxin und dem artifiziell in Alkali gelösten Endotoxin. Der Autor fraktionierte die auf verschiedenem Wege erhaltenen Lysate durch Gelfiltration, Chromographie und stufenweise Gradientenelution. War das Endotoxin im Darmsaft gelöst worden, so konnte nur eine toxische Fraktion (G) isoliert werden, bei Lyse in verdünntem Alkali ( $\text{pH} 11,5$ ) dagegen mehrere Komponenten (vgl. auch H o l m e s and M o n r o e 1965 und L e c a d e t 1966). Von den in Alkali-Lysaten vorhandenen toxischen Komponenten  $F_{(1,2)}$  und S dürfte die letztgenannte mit der o. g. Komponente G identisch sein.

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Lösungsprodukte bringt W a t a n a b e mit einer enzymatischen Hydrolyse des Endotoxins im Darmsaft in Beziehung. — Bereits früher hatten M a r t o u r e t (1961, 1962) sowie L e c a d e t und M a r t o u r e t (1964) eine partielle Hydrolyse der Proteinmoleküle für das Zustandekommen einer Endotoxin-Wirkung für notwendig erachtet. Hierzu sollen aber selbst hohe pH-Werte im Raupen-Darm nicht ausreichen. M a r t o u r e t nennt Beispiele wie *Mamestra* (syn. *Barathra*) *brassicae*, bei denen zwar ein extrem hohes Darm-pH ( $\geq 10$ ) herrscht, aber im Gegensatz zu *Pieris brassicae* (mit niedrigerem Darm-pH  $\approx 9,5$ ) keine vergleichbare Reaktion auftritt. M a r t o u r e t sowie L e c a d e t und M a r t o u r e t machten deshalb für eine wirksame Hydrolyse der Kristalle im Darmsaft auch dessen Proteinase-Aktivität mit verantwortlich.

Diese Theorie der hydrolytischen Spaltung von Endotoxinkristallen im Darm empfindlicher Raupen basiert auf dem Ergebnis von Hydrolyse-Versuchen an Endotoxinkristallen mittels Proteinase aus dem Darmsaft von *Pieris brassicae*-Raupen. Das bei diesen Versuchen erhaltene Gemisch aus Enzymen und Hydrolyse-Produkten erwies sich nicht nur nach peroraler, sondern auch nach parenteraler Applikation toxisch für die Raupen<sup>2)</sup>.

Außerdem konnten L e c a d e t und M a r t o u r e t feststellen, daß die unterschiedliche Wirksamkeit von Endotoxin-Kristallen aus einem Stamm von *B. t.* var. *thuringiensis* und einem Stamm von *B. t.* var. *alesti* gegenüber *Pieris brassicae* auf deren unterschiedliches Hydrolyse-Verhalten gegenüber den Darmproteinase zurückzuführen ist: Kristalle des sog. Anduze-Stammes von *B. t.* var. *alesti* waren in einem Enzympräparat (definierter Aktivität) nach 3 Std. erst zu 41 % aufgelöst, während Kristalle eines *B. t.* var. *thuringiensis*-Stammes nach der gleichen Zeit bereits zu 75 % hydrolysiert waren.

1) Bei diesem Wirt bewirken Endotoxin-Kristalle allein keine Mortalität. Eine Wirkung tritt erst ein, wenn gleichzeitig Sporen appliziert werden oder aber, wenn Endotoxin in gelöster Form angeboten wird. (vgl. S. 42).

2) Nach Untersuchungen von H o l t m a n n (1960) und W a t a n a b e (1967) hydrolysieren auch die Proteinase des Wirbeltier-Darmes (Pepsin und Trypsin) Endotoxinkristalle. Nach einer anfänglichen Steigerung der Aktivität sinkt diese jedoch alsbald auf Null. Im Gegensatz dazu bleibt die Toxizität von enzymatischen Lysaten im Raupendarm-Saft konstant. Nach W a t a n a b e dürfte im Darm von empfindlichen Raupen, z. B. *Bombyx mori*, eine besondere Proteinase vorkommen.

Angus (1964) vertrat auf Grund von Ergebnissen an *Bombyx mori* jedoch die Ansicht, daß die von Lecadet und Martouret beobachtete Wirkung bei *Pieris brassicae* wohl eher von einer toxischen Substanz im Darmsaft der Raupen herrühre als von Hydrolyse-Produkten der Endotoxin-Kristalle. Er bezog sich bei seiner Argumentation vor allem auf Untersuchungen von Benz (1962) über die Existenz einer thermolabilen und nicht dialysablen paralytisch wirkenden Substanz im Darmtraktus von *Pieris brassicae*<sup>1)</sup>. Lecadet und Martouret (1965) zeigten jedoch, daß die in ihren Versuchen benutzte Enzymfraktion an sich nicht paralyisierend wirkte, wenn sie *Pieris brassicae*-Raupen allein appliziert wurde.

Martouret (1961) untersuchte eingehender das Verhalten von verschiedenen Noctuiden. Im Gegensatz zu *Pieris brassicae* führte der enzymatische Abbau speziell bei *Agrotis ypsilon* und *Euxoa* (syn. *Agrotis*) *segetum* lediglich zu nicht-toxischen Fragmenten. Im Darmkanal von *Mamestra brassicae* und von *Peridroma* (syn. *Lycophotia*) *saucia* soll sogar keinerlei enzymatischer Abbau von Endotoxin-Kristallen stattfinden. Diese Befunde können eine Erklärung dafür sein, warum sich bestimmte Noctuiden gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex weitgehend refraktär verhalten (vgl. auch Tab. 4).

Nach Yamvrias (1962) haben nur Hydrolysate, nicht aber intakte Endotoxin-Kristalle eine Wirkung auf Raupen von *Anagasta kühniella*. Dies interpretierten Lecadet und Martouret (1965) dahingehend, daß die Proteinase des Darmsaftes von *Anagasta kühniella* selbst nicht genügend aktives Toxin aus Endotoxin-Kristallen freisetzen können.

Die Tatsache, daß in manchen Insektendärmen Endotoxin-Kristalle nicht gelöst werden und deshalb nicht wirksam werden können, soll jedoch nach Faust und Estes (1966) anders zu erklären sein: Es fehlt in diesen Fällen im Darmsaft die Voraussetzung hinsichtlich pH und rH für die Lyse des von ihnen postulierten Siliziumgerüsts der Kristalle.

Aktives Endotoxin von *B. thuringiensis* bewirkt im Darm von Lepidopterenlarven eine erhöhte Permeabilität der Darmwand. Nach Angus und Heimpel (1956) führt dies speziell bei *Bombyx mori* nach Einwirkung von *B. t.* var. *sotto*-Endotoxin einerseits zu einer pH-Erhöhung in der Hämolymphe und andererseits zu einer Reduktion des Darm-pH (von 10,1...10,3 auf 8,6...9,4). — Ähnliche Verhältnisse wie bei *Bombyx mori* herrschen nach Angus und Heimpel (1959) bei *Antheraea pernyi*, *Protoparce sexta* und *Protoparce quinquemaculata*.

Im Gegensatz zu den genannten Beispielen beobachteten Heimpel und Angus (1959) jedoch keinen Anstieg des Hämolymphe-pH bei anderen empfindlichen Lepidopteren wie z. B. *Malacosoma disstria*. Auch Martouret und Mitarb. (1965) sowie Benz (1966a) fanden keinerlei Erhöhung des pH in der Hämolymphe von *Pieris brassicae* nach Endotoxin-Applikation, wohl aber eine Reduktion des Darm-pH. Benz erklärt den effektiven Unterschied damit, daß im Falle von *Bombyx mori* der Darmsaft, im Falle von *Pieris brassicae* aber die Hämolymphe besser gepuffert sei.

<sup>1)</sup> Eine ähnliche Substanz war in den Därmen anderer Lepidopterenlarven wie z. B. *Malacosoma neustria* oder *Barathra brassicae* nicht nachweisbar (Benz 1962).

Bei *Pieris brassicae* kann daher die beobachtete Paralyse nicht wie bei *Bombyx mori* eine Folge des Eindringens von Alkali aus dem Darm in die Hämocoel sein. Vielmehr dürfte eine Permeation der von Benz (1962) gefundenen paralytischen Substanz durch die affizierte Darmwand für die Paralyse nach Endotoxin-Einwirkung bei *Pieris brassicae* verantwortlich zu machen sein. Neben *Bombyx mori* scheint also auch *Pieris brassicae* einem pathologischen Sondernotypus anzugehören. Andere Lepidopteren-Arten wie z. B. *Malacosoma neustria* erleiden hingegen weder eine durch Darm-Alkali noch durch darmeigene Toxine bedingte Paralyse nach Endotoxin-Einwirkung.

Nach Untersuchungen von Raun und Mitarb. (1966) wirken ähnlich wie bei *Pieris brassicae* auch Darminhaltstoffe von *Ostrinia nubilalis*, in deren Hämocoel injiziert, toxisch. Im Gegensatz zu *Pieris brassicae* und ähnlich wie bei *Anagasta kühniella* ist das Darmmilieu von *O. nubilalis* nicht auffallend alkalisch (pH  $\approx$  7,1). Das Endotoxin wirkt deshalb auch hier nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von lebenden Sporen und induziert auch keine spektakulären pH-Änderungen in der Hämolymphe.

Es ist noch nicht sicher geklärt, ob die Endotoxin-bedingte Erhöhung der Darm-Permeabilität, wie sie erstmals von Angus und Heimpel (1956) bei *Bombyx mori* demonstriert werden konnte, unspezifisch oder Substrat-spezifisch ist. Gegen eine freie Diffusion von Darminhaltstoffen nach Endotoxin-Einwirkung durch die Darmwand von *Bombyx mori* sprechen Versuche mit C<sup>14</sup>-markierten Substraten: Nach Fast und Angus (1965) ist die Permeabilität nur für bestimmte Stoffe wie z. B. Carbonat-Ionen erhöht, für andere wie z. B. Glukose dagegen erniedrigt. Fast und Angus sprechen daher auch nur von einer Endotoxin-bedingten Störung, aber von keinem radikalen Zusammenbruch der Permeabilitätsschranke bei *Bombyx mori*.

Nach Benz (1966a) soll Anoxie eine ähnliche Wirkung auf den Raupendarm haben wie Endotoxin. Anoxie schädigt z. B. den Darm von *Pieris brassicae*-Larven so, daß nach 90 min die Darmwand für Anthocyane und nach 300 min sogar für Darmbakterien durchlässig wird. Diese zunehmende Permeabilitätssteigerung wird als Folge eines pH-Abfalles (durch Säure-Akkumulation) in den anaerobiontischen Darmepithelien angesehen. Wie bereits erwähnt, registrierten Martouret und Mitarb. (1965) sowie Benz (1966a) auch bei *Pieris brassicae* einen beachtlichen Anstieg des Darm-pH in den behandelten Raupen: z. B. nach 24 Std. im Mitteldarm von 9,0 bzw. 9,3 auf 6,6 bzw. 7,0. Während Martouret und Mitarb. annahmen, daß dieser auffällige Anstieg des Darm-pH in unmittelbarem Zusammenhang mit einer primären Endotoxin-bedingten physiopathologischen Störung stehe, neigt Benz zu der Ansicht, daß es sich hierbei nur um einen sekundären Ausgleich zwischen Hämolymphe-pH ( $\approx$  6,6) und Darm-pH als Folge der (primär) zusammengebrochenen Darmschranke handelt (s. o.).

Histopathologische Untersuchungen über die Wirkung des Sporen-Endotoxin-Komplexes liegen vor u. a. von Mattes (1927) an *Anagasta kühniella*, Tana da (1953) an *Pieris rapae*, Heimpel und Angus (1959) an *Bombyx mori*, Hoopingarnier und Materu (1964) an *Galleria mellonella*, Mar-

touret und Mitarb. (1965) an *Pieris brassicae*, Huang und Tamashiro (1965) an *Cactoblastis cactorum*, Sutter und Raun (1966, 1967) an *Ostrinia nubilalis* sowie Broersma und Buxton (1967) an *Trichoplusia ni*.

Trotz unterschiedlicher Einzelbefunde stimmen die Ergebnisse dahingehend überein, daß gravierende Schäden vor allem in den vorderen Anteilen des Mitteldarms auftreten: (1) Zerstörung des Darmepithels und (2) Lähmung (Paralyse) der Darmmuskulatur.

Sutter und Raun (1967) differenzierten an Raupen von *Ostrinia nubilalis* die Wirkung von Endotoxin und Sporen. — Endotoxin-Kristalle allein bewirken eine spastische Paralyse der Darmmuskulatur<sup>1)</sup> sowie eine Erosion und Isolation der Darm-Epithelzellen von der Basalmembran. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschwinden in den Endotoxin-geschädigten Epithelzellen (Zylinderzellen und Becherzellen) das endoplasmatische Retikulum und Albuminoide, dagegen bleiben die Mikrovilli des Bürstensaumes intakt. — Die im Darm aus Sporen auskeimenden vegetativen Stäbchen vermögen die peritrophische Membran zu durchdringen und im Darmepithel eine generalisierte Vakuolisierung (wohl auf enzymatischem Wege) zu induzieren. Diese Vakuolisierung, die nicht etwa auf eine Endotoxin-Wirkung zurückgeht, soll auf einer Zerstörung der internen Mikrovilli der sog. Becherzellen beruhen.

Vergleichend testete Angus (1967) die Toxizität von Endotoxinkristallen verschiedener Varietäten an *Bombyx mori*-Larven. Als Kriterium verwendete er die mittlere effektive Dosis, bei der innerhalb von 6 Std. 50 % der Versuchstiere eine Paralyse zeigen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede: Die ED<sub>50</sub> betrug für die Kristalle von *B. t.* var. *sotto* 0,02  $\gamma$ /g Larve, für die Kristalle der var. *entomocidus* (*entomocidus*) 0,03  $\gamma$ /g Larve und für die Kristalle der var. *thuringiensis* 26  $\gamma$ /g Larve.

Broersma und Buxton (1967) konnten zeigen, daß der Umfang der histopathologischen Veränderungen, die am Mitteldarm der Raupen von *Trichoplusia ni* durch (gleiche Dosen von) *B. thuringiensis* induziert werden, der Virulenz der verwendeten Stämme bzw. Varietäten korreliert waren. Während var. *entomocidus* und var. *finitimus* kaum einen histopathologischen Defekt setzten, waren die Affektionen durch var. *thuringiensis* und var. *galleriae* maximal. Zwischen diesen Extremen lagen die Befunde bei var. *alesti* und var. *sotto*.

Im Zusammenhang mit schweren histopathologischen Veränderungen am Darm-Epithel nahmen Heimpel und Angus (1960) an, daß die primäre Wirkung des Endotoxins in einer Aufspaltung von Intracellulärsubstanz<sup>2)</sup> des Darm-Epithels bestehe. Tatsächlich fand Heimpel (1965) auch etwa 60 min nach Endotoxin-Einwirkung einen deutlichen Anstieg des Glucosamin-Spiegels in der Hämolymphe von *Bombyx mori*-Raupen. — Martouret und Mitarb. (1965) vertreten demgegenüber jedoch die Ansicht, daß speziell die bei *Pieris brassicae* beobachtbaren schweren Zerstörungen am Darm-Epithel nur sekundärer Natur

<sup>1)</sup> Heimpel und Angus (1959) hatten dagegen bei *Bombyx mori* eine schlaffe Lähmung (Relaxation) beschrieben.

<sup>2)</sup> Sie besteht nach Untersuchungen von Estes und Faust (1964) am *Galleria mellonella*-Darm aus einem Glucuronsäure und N-Acetyl-glucosamin enthaltenden Komplex.



seien und mit der eigentlichen Intoxikation und der durch sie bedingten Mortalität nicht in unmittelbarem Zusammenhang stünden. Nach Ergebnissen von Modellversuchen werden sie als Säurewirkung gedeutet.

Die infolge der Darmparalyse zusammenbrechende Darmschranke macht alsbald jede weitere Nahrungsaufnahme unmöglich (A n g u s and H e i m p e l 1959) und es kommt zu einem Fraßstop. Ferner beschrieb Y a m v r i a s (1962) bei *Anagasta kühniella* und B e n z (1966a) bei *Pieris brassicae* das Auftreten von Diarrhoe als Symptom einer zusammenbrechenden Darmfunktion.

Da das Endotoxin von *Bacillus thuringiensis* ein Antigen darstellt, hat man neuerdings auch versucht, pathologische Fragestellungen serologisch zu bearbeiten: Mittels Immuno-Elektrophorese konnten K r y w i e n c z y k und A n g u s (1966) nachweisen, daß die Antigene von in Darmsaft gelösten Kristallen eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen als solche, die durch Alkali-Lyse des Proteins erhalten wurden. — In einer früheren Arbeit hatten K r y w i e n c z y k und A n g u s (1960, 1965) die Ansicht vertreten, daß Endotoxinkristalle von *B. t.* var. *sotto* und *B. t.* *entomocidus* ein gemeinsames toxisches Antigen und differente nicht-toxische Antigen-Komponenten besäßen. Neuere Untersuchungen von K r y w i e n c z y k und A n g u s (1960) haben nun das Vorliegen einer gemeinsamen toxischen Komponente in den Endotoxinkristallen beider Varietäten bestätigt, aber gleichzeitig gezeigt, daß die Kristalle der var. *entomocidus* außerdem noch ein zusätzliches toxisches Antigen enthalten: So gelang es zwar mit Antikörpern, gebildet gegen das Endotoxin von *B. t.* var. *entomocidus*, die toxische Komponente von *B. t.* var. *sotto* und auch die von *B. t.* var. *thuringiensis* zu neutralisieren, aber nicht vice versa. Ähnliche Verhältnisse beschrieben B u c h e r und Mitarb. (1966) bei dem atypischen Stamm 562-5 A von *B. t.* var. *thuringiensis*<sup>1)</sup>. Es gelang nicht, die Toxizität von Kristall-Lysaten dieses Stammes zu neutralisieren durch Antikörper gebildet gegen Endotoxin von *B. t.* var. *sotto*, von *B. t.* var. *entomocidus* oder von einem typischen Stamm der var. *thuringiensis*. Demnach dürften die kubischen Kristalle dieses atypischen Stammes der var. *thuringiensis* eine aberrante toxische Komponente besitzen.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Das Endotoxin wird von allen Varietäten des *B. thuringiensis* (im Gegensatz zu *B. cereus*) bei der Sporulation in Form von parasporalen Kristallen gebildet. Neuere biochemische Untersuchungen zeigten, daß der Endotoxin-Kristall nicht nur aus einem hochmolekularen Protein besteht, sondern noch ein Siliziumgerüst besitzt. — Ein für alle Lepidopteren-Arten geltendes pathogenetisches Schema der Endotoxin-Wirkung existiert nicht, so daß eine Reihe von Reaktionstypen zu unterscheiden sind. Die Differenzen zwischen ihnen beziehen sich sowohl auf die Löslichkeit der Endotoxin-Kristalle im Darmsaft als auch auf die pathophysiologische Wirkung des aktivierten Endotoxins. Das Endotoxin setzt primär gravierende Schäden vor allem im Mitteldarmbereich, und zwar sowohl durch Zerstörung des Darmepithels als auch durch Lähmung der Darmmuskulatur. Als Folge davon kommt es in Abhängigkeit von der Wirtsart entweder nur zu einer Permeation

<sup>1)</sup> Dieser Stamm ist u. a. gekennzeichnet durch die Bildung kubischer Kristalle.

von Darminhaltsstoffen oder auch zu einer Perforation der Darm-Basalmembran und damit zu einer Invasion von Darmkeimen in die Hämocoel. Todesursache ist dann entweder eine terminale Toxämie (z. B. bei *Pieris brassicae*) oder eine Sepsikämie (z. B. *Anagasta kühniella*). Abgesehen von allen Details im Wirkungsmechanismus ist bei allen empfindlichen Lepidopteren-Larven besonders auffällig, daß nach der Aufnahme einer kritischen Dosis von Endotoxin-Kristallen sowohl die Darmfunktion als auch die Nahrungsaufnahme reduziert bzw. eingestellt werden. Dieser Fraßstop kann daher ebenso wie die Mortalität als Kriterium der Wirksamkeit verwendet werden.

## 2. Exotoxin<sup>1)</sup>

### a) Produktion und physikalisch-chemische Eigenschaften.

Gewisse *B. thuringiensis*-Stämme können außer Endotoxin-Kristallen auch noch eine toxische Fraktion erzeugen, die von vegetativen Zellen in das Kulturmedium sezerniert wird. Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der Bildung von Endotoxin-Kristallen und von Exotoxin. Vielmehr erzeugen nur gewisse Genotypen („aktive Stämme“) bestimmter Varietäten von *B. thuringiensis* Exotoxin (Burgerjon et De Barjac 1960, 1962, Krieg 1966, Sicker und

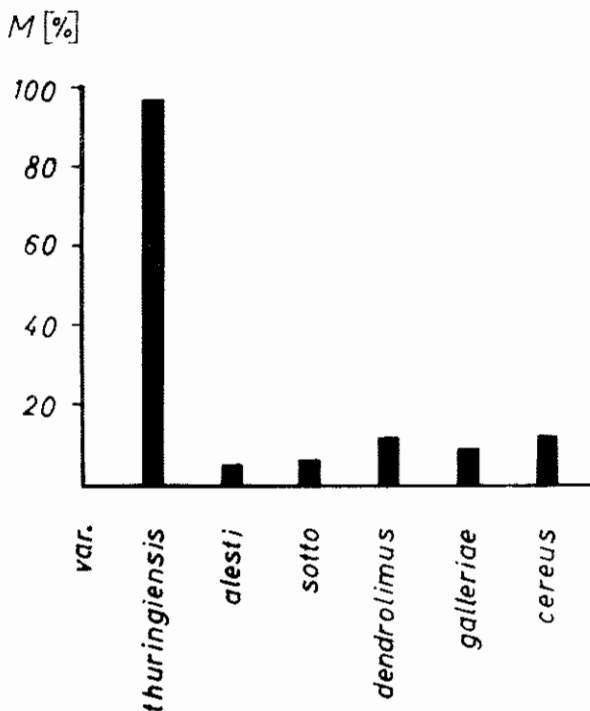


Abb. 2. Endmortalität von *Drosophila melanogaster* nach Behandlung mit Kulturüberständen verschiedener Varietäten von *Bacillus thuringiensis* (nach Krieg 1966)

<sup>1)</sup>  $\beta$ -Exotoxin nach HeimpeI (1967).

Krieg 1966, Vaňková 1966a, Cantwell et al. 1964a, De Barjac et al. 1966, Heimpel 1967, Conner und Hansen 1967b).

Die folgende Übersicht über die Produktivität von *B. thuringiensis*-Stämmen stützt sich auf Untersuchungen von De Barjac und Mitarb. (1966):

Tab. 5 a. Exotoxin-positive und -negative Genotypen bei verschiedenen Varietäten von *B. thuringiensis* (nach De Barjac und Mitarb. 1966)

Varietät	Serotyp (H-Antigen)	Anzahl der Stämme	
		Exotoxin-positive	Exotoxin-negative
<i>thuringiensis</i>	H <sub>1</sub>	47	21
<i>finitimus</i>	H <sub>2</sub>	—	} 26
<i>alesti</i>	H <sub>3</sub>	—	
<i>sotto</i>	H <sub>4</sub> a, b	—	
<i>dendrolimus</i>	H <sub>4</sub> a, b	—	
<i>galleriae</i>	H <sub>5</sub>	—	
<i>entomocidus</i>	H <sub>6</sub>	—	
<i>aizawai</i>	H <sub>7</sub>	—	10
<i>morrisoni</i>	H <sub>8</sub>	3	—
<i>tolworthi</i>	H <sub>9</sub>	3	—

Neuerdings berichtet auch Heimpel (1967) über Exotoxinbildner bei var. *morrisoni* (Serotyp H<sub>8</sub>) und außerdem über „aktive“ Stämme bei var. *galleriae* (Serotyp H<sub>5</sub>) und var. *aizawai* (Serotyp H<sub>7</sub>). Heimpel hat vorgeschlagen, die Exotoxin-positiven Stämme von den nicht-produktiven Stämmen mit sonst gleichen Eigenschaften taxonomisch zu trennen. So schlägt er für die Exotoxin-negativen Stämme der var. *thuringiensis* (Serotyp H<sub>1</sub>) die Bezeichnung var. *amuscatoxicus*, für die Exotoxin-negativen Stämme der var. *aizawai* (Serotyp H<sub>7</sub>) die Bezeichnung var. *pacificus* vor und für die Exotoxin-positiven Stämme der var. *morrisoni* (Serotyp H<sub>8</sub>) den Namen var. *anagastae*. Daneben gibt es auch akristallophore Mutanten und akristallophore + asporogene Mutanten von *B. t. thuringiensis* (Serotyp H<sub>1</sub>), die noch Exotoxin-positiv sind (De Barjac et al. 1966). Ebenfalls produziert der (sekundär?) akristallophore *B. gelechiae* auct. nach Untersuchungen von Šebasta und Mitarb. (1967) Exotoxin.

Als Standardmethode zur Gewinnung von Exotoxinpräparaten geben De Barjac und Mitarb. (1966) folgende an: Wachstum von *B. thuringiensis* in einem Mineralsalz-Medium unter Zusatz von 0,75 % Pepton und 1 % Glukose 70 Std. bei 30° C. Abzentrifugieren des Sporen-Endotoxin-Komplexes. Dekantieren, Filtrieren und dann Einengen des Überstandes auf 1/4 seines Volumen im Vakuum bei 60° C. Schließlich Sterilisation des Präparates bei 120° C im Autoklaven (15 min).

Conner und Hansen (1967b) schlugen ein Zitrat-Mineralsalzmedium mit 1 % Caseinhydrolysat (Casaminoacids) als Substrat vor. Bebrütung der Kultur erfolgt 72 Std. bei 32° C. Der Kulturüberstand wird für die weitere Verwendung gefriergetrocknet.

Die wichtigsten Eigenschaften des insektiziden Exotoxins sind Wasserlöslichkeit, Dialysierbarkeit und Thermostabilität<sup>1)</sup> (McConnell and Richards 1959, Burgerjon et De Barjac 1960, 1962, De Barjac et Dedonder 1965, Benz 1966 b, Šebasta und Mitarb. 1967). Im Gegensatz zum *B. t.*-Endotoxin<sup>2</sup> besitzt es keine antigenen Eigenschaften und nur ein niedriges Molekulargewicht. Seine Anreicherung wurde von Cantwell und Mitarb. (1964 a), De Barjac und Dedonder, Benz sowie Šebasta und Mitarb. beschrieben (Eindampfen, Kohle-Adsorption, Äthanol-Präzipitation, Papier-, Gel- und Austauscher-Chromatographie).

Die aktive Fraktion, die Cantwell und Mitarb. (1964a) isolierten, enthielt noch Calcium-Dipicolinat<sup>3)</sup>; die Autoren nahmen an, daß das Exotoxin mit diesem Salz komplexartig verbunden sei. Dies scheint aber nach den neueren Untersuchungen von De Barjac und Dedonder doch nicht der Fall zu sein: Sie konnten ein Dipicolinsäure-freies Exotoxin isolieren. Dieses gereinigte Exotoxin hat ein auffallendes UV-Spektrum: Maximale Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ m}\mu$  und minimale Absorption bei  $\lambda = 230 \text{ m}\mu$  (De Barjac et Dedonder, Benz). Das UV-Spektrum weist auf den Gehalt an bestimmten Nukleinbasen hin: Adenin (De Barjac et Dedonder, Benz, Šebasta und Mitarb.) oder Uracil (Benz). Das hydrolysierte Exotoxin gibt eine positive Diphenylamin-Reaktion, typisch für Aldopentosen, jedoch keine Reaktion für Desoxyypentosen. Negativ fiel die Ninhydrin-Reaktion aus und positiv die Probe auf Phosphat. Nach diesen analytischen Daten handelt es sich um ein Nucleotid. Diese Auffassung steht im Einklang mit dem Elektrophorese-Verhalten des nicht hydrolysierten Exotoxins: Es wandert zwischen 1'-Adenosin-mono- und 1'-Adenosin-di-phosphorsäure (De Barjac et Dedonder). Falls das Exotoxin eine monomere Adenosin-Phosphorsäure darstellen sollte, käme ihm ein Molekulargewicht von  $10^2 \cdots 10^3$  zu.

## b) Toxikologie

Die perorale Wirksamkeit von Kulturfiltraten von *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* konnte erstmals von Burgerjon und De Barjac (1960) nachgewiesen werden. Dieser Effekt — ist im Gegensatz zum Endotoxin — nicht auf Larven der Lepidopteren beschränkt: Reaktionen sind von mehreren Arten aus den Ordnungen der Dipteren, Coleopteren, Hymenopteren, Isopteren und Orthopteren bekannt (s. Tab. 5 b). Innerhalb der einzelnen Ordnungen findet man abgestufte Empfindlichkeiten, z. B. innerhalb der Ordnung der Lepidopteren eine sehr gute Wirkung gegenüber *Barathra brassicae* (Burgerjon et De Barjac 1962, 1964) und eine geringere Wirkung gegenüber *Galleria mellonella* (Vaňková 1966 a, Krieg 1967).

1) Smirnoff und Berlinguet (1966) isolierten aus zwei Chargen von Thuricide wettable powder [D-03039 (1960) und S 2-156 (1962)] jedoch nicht aus anderen Chargen des gleichen Präparates und auch nicht aus technischen Präparaten anderer Herkunft (Bacthane, Parasporine) eine sehr labile, auf Blattwespenlarven (*Pristiphora erichsonii*) toxisch wirkende Fraktion. Diese (nach Hydrolyse vornehmlich aus Aminosäuren bestehende Komponente ist nicht mit dem hier behandelten hitzestabilen Exotoxin identisch.

2) und im Gegensatz zu den Exotoxinen vom Typus des löslichen Antigens.

3) Dipicolinsäure wird bei der Sporulation von *B. thuringiensis* freigesetzt und ist gegenüber Insekten indifferent.

Wie das Endotoxin, so wirkt auch das Exotoxin vornehmlich nur auf Larvenstadien von Insekten. Jedoch kommen Ausnahmen von dieser Regel vor, insbesondere bei *Apis mellifera*, worauf noch näher eingegangen wird (s. S. 53).

Im Gegensatz zum Endotoxin bewirkt das Exotoxin keinen Fraßstop, da es nicht auf den Insektendarm wirkt. Seine Wirkung ist sogar stärker, wenn die Darmschranke durch intracoelomale Injektion umgangen wird (McConnell and Richards 1959, Kurstak 1966, Vaňková 1966a, Wittig 1967). Sowohl bei peroraler als auch bei intracoelomaler Applikation tritt jedoch die toxische Reaktion nicht akut ein. Die Larven von *Galleria mellonella* beispielsweise werden nach der Injektion zunächst lethargisch und sterben in Abhängigkeit von der Dosis erst nach 5...15 Tagen (McConnell and Richards 1959). Kurstak (1966) beschrieb bei *Anagasta kühniella* ein ähnliches Verhalten: 3...4 Std. post injectionem ist die Bewegung der Larven auffallend herabgesetzt. Nach 10...15 Tagen haben die Larven an Volumen verloren und nehmen eine gekrümmte Haltung ein. Schließlich sterben die Tiere, die eine Entwicklungsverzögerung aufweisen, meist als Larven. Es werden Veränderungen an den Hämozyten beobachtet wie Kernruptur und Hypertrophie. Wird das Exotoxin in Altlarven (*Pseudaletia unipuncta* oder *Galleria mellonella*) injiziert, so sterben die Tiere erst während der Verpuppung. Die Puppen zeigen dann oft Mißbildungen und Störungen des Melanisierungsprozesses (Wittig 1967).

Nach Beobachtungen von Burgerjon (1964), Cantwell und Mitarb. (1964a), sowie Sicker und Krieg (1966) manifestiert sich die Toxinwirkung nach peroraler Applikation vornehmlich bei Häutungen oder endlich bei der Verpuppung. Hier sterben die Tiere bevorzugt ab. Wird bei subletalen Dosen jedoch das Puppen- und Imaginalstadium lebend erreicht, so sind Anomalien häufig: Reduktion der Schlüpfrate, der Lebensdauer der Imagines, der Fertilität (s. a. Hitchings 1967). Burgerjon und Bische (1967b) berichten über teratologische Effekte von subletalen Dosen des Exotoxins bei Puppen und Imagines verschiedener Lepidopteren (*Barathra brassicae*, *Plutella maculipennis*, *Lymantria dispar*, *Zeiraphera griseana*) und Cantwell und Mitarb. (1964a) über Mißbildungen bei Dipteren-Imagines (*Musca domestica*). Nach Cantwell und Mitarb. (1964a) soll das Exotoxin speziell mit den Metamorphose-Hormonen interferieren und nach Conner und Hansen (1967b) wird auch eine Aktivierung des Juvenilhormons für möglich gehalten. Solche Wirkung-Spezifitäten sind jedoch nicht genügend gesichert und können auch nicht zur Erklärung der Wirkung von Exotoxin auf nicht-larvale Stadien wie z. B. auf Honigbienen herangezogen werden. Auch bei anderen Intoxikationen (subletale Dosen von Endotoxin) und bei verschiedenen Krankheiten zeigen die Tiere eine Entwicklungsverzögerung und sterben bevorzugt an physiologisch kritischen Punkten ab; schließlich sind die beobachteten Mißbildungen nicht überraschend, wenn vorausgegangene Entwicklungsstadien durch eine irreversible Intoxikation geschädigt wurden. Nach Benz (1966b) soll das Exotoxin als Antimetabolit des Nukleinsäure-Stoffwechsels wirken. Da es aber weder auf Anneliden (*Tubifex tubifex*, Benz 1966b) noch auf Vertebraten (*Mus musculus*, Krieg und Herfs 1963b) wirkt, müßte die Interferenz mit einem für den Nukleinsäure-Metabolismus von Insekten spezifischen Reaktionsschritt erfolgen.

Tab. 5 b. Empfindlichkeit verschiedener Insekten gegenüber dem Exotoxin

Art	Stadium <sup>1)</sup>	Empfindlichkeit (p. o.) <sup>2)</sup>	B. t. var. <sup>3)</sup>	Literatur	
<b>Lepidoptera</b>					
<i>Achroia grisella</i>	L	—	T+	Heitor 1962	
<i>Anagasta kuhniella</i>	L	+++	T+	Yanvrias 1962	
<i>Athalia colibri</i>	L <sub>1-2</sub>	++	T+	Laurent 1965	
	L <sub>3-4</sub>	—	T+	Laurent 1965	
<i>Bombyx mori</i>	L	+++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960	
	L	—	T-	Grigorova 1964	
	L	—	D	Grigorova 1964	
<i>Cirphis unipuncta</i>	L	+	T+	Burgerjon et al. 1964	
	L	—	D	Burgerjon et al. 1964	
<i>Estigmene acrea</i>	L	—	T+	Cantwell et al. 1964 a	
	L	—	T+	Mechalas and Beyer 1963	
<i>Euxoa segetum</i>	L	+	T+	Burgerjon et De Barjac 1960	
<i>Galleria mellonella</i>	L	—	T+	McConnel and Richards 1959	
	L	—	T+	Cantwell et al. 1964 a	
	L	+/+++	T+	Vaňková 1966 a	
	L	—	T-	Vaňková 1966 a	
	L	—	A	Vaňková 1966 a	
	L	—	D	Vaňková 1966 a	
	L	—	E	Vaňková 1966 a	
	L	—	G	Vaňková 1966 a	
	L	—	S	Vaňková 1966 a	
	L	+/+++	T+	Krieg 1967	
	<i>Lymantria dispar</i>	L	+++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960
		L	+++	T+	Krieg und Herfs 1963 b
		L	+++	T+	Grigorova 1964
L		—	T-	Grigorova 1964	
L		—	A	Krieg und Herfs 1963 b	
L		—	D	Krieg und Herfs 1963 b	
L		—	D	Grigorova 1964	
<i>Malacosoma neustria</i>	L	+++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960, 1964	
	L	+++	T+	Krieg und Herfs 1963 b	
<i>Mamestra brassicae</i>	L	++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960	
	L	++	T+	Burgerjon et De Barjac 1964	
	L	—	T-	Burgerjon et De Barjac 1964	
	L	—	A	Burgerjon et De Barjac 1964	
	L	—	D	Burgerjon et De Barjac 1964	

1) L = Larven; I = Imagines.

2) nicht einwandfrei geklärte (wahrscheinlich unspezifische) Reaktionen blieben unberücksichtigt.

3) T+ = var. *thuringiensis* Exotoxin-positiv; T- = var. *thuringiensis* Exotoxin-negativ; A = var. *alesti*; D = var. *dendrolimus*; E = var. *entomocidus*; F = var. *finitimus*; G = var. *galleriae*; S = var. *sotto*.

Tab. 5 b. (Fortsetzung)

Art	Stadium <sup>1)</sup>	Empfindlichkeit (p. o.) <sup>2)</sup>	B. t. var. <sup>3)</sup>	Literatur
<i>Mamestra brassicae</i>	L	—	E	Burgerjon et De Barjac 1964
	L	—	F	Burgerjon et De Barjac 1964
	L	—	S	Burgerjon et De Barjac 1964
	L	—	Cereus	Burgerjon et De Barjac 1964
	L	+++	T <sup>+</sup>	Grigorova 1964
	L	—	T <sup>-</sup>	Grigorova 1964
	L	—	D	Grigorova 1964
	L	+++	T <sup>+</sup>	Krieg und Herfs 1963 b
	L	—	D	Krieg und Herfs 1963 b
	L	—	E	Krieg und Herfs 1963 b
	L	—	S	Krieg und Herfs 1963 b
	L	—	Cereus	Krieg und Herfs 1963 b
	<i>Ostrinia nubilalis</i>	L	—	T <sup>+</sup>
<i>Peridroma saucia</i>	L	+	T <sup>+</sup>	Burgerjon et De Barjac 1960
<i>Polia oleracea</i>	L	+++	T <sup>+</sup>	Burgerjon et De Barjac 1964
	L	—	F	Burgerjon et De Barjac 1964
<i>Pieris brassicae</i>	L	+++	T <sup>+</sup>	Burgerjon et De Barjac 1960
<i>Pieris rapae</i>	L	+	T <sup>+</sup>	Herfs und Krieg (unpubl.)
<i>Plodia interpunctella</i>	L	—	T <sup>+</sup>	Cantwell et al. 1964 a
<i>Plutella maculipennis</i>	L	+++	T <sup>+</sup>	Sicker und Krieg 1966
	L	—	A	Sicker und Krieg 1966
	L	—	D	Sicker und Krieg 1966
	L	—	G	Sicker und Krieg 1966
<i>Stilpnotia salicis</i>	L	—	T <sup>-</sup>	Grigorova 1964
	L	—	D	Grigorova 1964
<b>Diptera</b>				
<i>Aedes aegypti</i>	L	—	T <sup>+</sup>	McConnel and Richards 1959
	L	+++	T <sup>+</sup>	Krieg und Herfs 1963 b
	L	+++	T <sup>+</sup>	Burgerjon 1964
	L	++	T <sup>+</sup>	Cantwell et al. 1964 b
<i>Drosophila melanogaster</i>	L	+++	T <sup>+</sup>	Krieg 1966
	L	—	A	Krieg 1966
	L	—	D	Krieg 1966
	L	—	E	Krieg 1966
	L	—	G	Krieg 1966
	L	—	S	Krieg 1966
	L	+++	T <sup>+</sup>	Benz 1966 b
	I	+	T <sup>+</sup>	David et Vago 1967
<i>Musca autumnalis</i>	L	+	T <sup>+</sup>	Cantwell et al. 1964 a
<i>Musca domestica</i>	L	+++	T <sup>+</sup>	Cantwell et al. 1964 a
	I	+++	T <sup>+</sup>	Krieg und Herfs 1963 b

Tab. 5 b. (Fortsetzung)

Art	Stadium <sup>1)</sup>	Empfindlichkeit (p. o.) <sup>2)</sup>	B. t. var. <sup>3)</sup>	Literatur
	L	+++	T+	Burgerjon and Galichet 1965
	I	++	T+	Burgerjon and Galichet 1965
	L	+++	T+	Conner and Hansen 1967 b
	L	—	E	Conner and Hansen 1967 b
	L	—	S	Conner and Hansen 1967 b
	I	—	T+	Conner and Hansen 1967 b
<i>Haematobia irritans</i>	L	+++	T+	Gingrich and Eschle 1966
Hymenoptera				
<i>Apis mellifera</i>	I	++	T+	Krieg und Herfs 1963 a
	I	++	T+	Cantwell et al. 1964 b, 1966
	L	+	T+	Cantwell et al. 1964 b, 1966
	I	++	T+	Martouret and Euverte 1964
<i>Diprion pini</i>	L	+++	T+	Burgerjon and Biache 1964
<i>Pristiphora pallipes</i>	L	+++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960, 1964
Coleoptera				
<i>Calandra granaria</i>	I	—	T+	Krieg und Herfs 1963 b
	I	—	A	Krieg und Herfs 1963 b
	I	—	D	Krieg und Herfs 1963 b
	I	—	E	Krieg und Herfs 1963 b
	I	—	S	Krieg und Herfs 1963 b
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	L	++	T+	Burgerjon et De Barjac 1960
	L	++	T+	Burgerjon et Biache 1966 a
	I	—	T+	Burgerjon et Biache 1966 a
Isoptera				
<i>Reticulitermes flaviceps</i>	?	+++	T+	Smythe and Coppel 1965
<i>Reticulitermes virginicus</i>	?	+++	T+	Smythe and Coppel 1965
<i>Reticulitermes hesperus</i>	?	+++	T+	Smythe and Coppel 1965
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	?	+++	T+	Smythe and Coppel 1965
Orthoptera				
<i>Blatta orientalis</i>	I	—	T+	Krieg und Herfs 1963 b
<i>Locusta migratoria</i>	L	+++	T+	Burgerjon et al. 1964
<i>Locusta spec.</i>	L	+++	T+	Burgerjon et al. 1964
<i>Periplaneta americana</i>	?	—	T+	McConnel and Richards 1959
<i>Schistocerca spec.</i>	L	+++	T+	Charles 1965

## Zusammenfassung

Im Gegensatz zum Endotoxin wird das Exotoxin nur von bestimmten Genotypen des *B. thuringiensis* (sog. aktiven Stämmen) gebildet. Zwischen Endotoxin- und Exotoxin-Produktion besteht daher kein notwendiger Zusammenhang. Das



Exotoxin ist wasserlöslich und thermostabil (im Gegensatz zum Endotoxin). Es handelt sich bei ihm nicht um einen Eiweißkörper, sondern wahrscheinlich um ein Nucleotid, das von vegetativen Zellen an das Kulturmedium abgegeben wird. Das Exotoxin wirkt nach peroraler Applikation nicht spezifisch auf den Darm, weswegen auch kein obligatorischer Fraßstop auftritt. Meist gehen die Larven bei der nächsten Häutung ein. Das Wirkungsspektrum ist nicht nur auf Lepidopteren beschränkt, sondern umfaßt auch andere Insekten wie Dipteren, Hymenopteren usw. Ob ein für alle empfindlichen Insektenarten gemeinsames pathogenetisches Schema der Exotoxinwirkung existiert, ist noch nicht im Einzelnen untersucht, aber nicht unwahrscheinlich.

### 3. Exoenzyme

Bestimmte Hydrolasen, die von vegetativen Zellen in das Kulturmedium sezerniert werden, können auch Zellstrukturen angreifen oder zerstören und damit als Pathogenitätsfaktor wirksam werden. So sollen beispielsweise nach *Toumanoff* (1953) sowie *Kushner* und *Heimpel* (1957) Phospholipasen (Lezithinasen) und nach *Bucher* (1960) auch Proteinasen für die Wirksamkeit von insektenpathogenen Bakterien, einschließlich *B. cereus* und *B. thuringiensis*, verantwortlich sein.

Demgegenüber betonten *Rogoff* (1966) und *Vaňková* (1965) speziell im Hinblick auf *B. thuringiensis*, daß sich bisher keine Relation zwischen der Phospholipasen-Aktivität bzw. der Proteinase-Aktivität einerseits und der peroralen Wirksamkeit von verschiedenen Stämmen andererseits feststellen ließ. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da in diesem Fall die Wirkung von Endotoxin oder auch Exotoxin ganz im Vordergrund steht. Die genannten Exo-Hydrolasen könnten jedoch bei einer infektionsbedingten Bakteriämie (s. S. 43) an der Wirkung von *B. cereus* und *B. thuringiensis* innerhalb der Hämocoel beteiligt sein. *Kurstak* (1966) beschrieb z. B. nach Injektion von nicht-autoklaviertem Überstand von *B. thuringiensis*-Kulturen in Raupen von *Anagasta kühniella* eine charakteristische Vakuolisierung und Degeneration der Hämocyten, die in dieser Form nach Injektion von autoklaviertem Überstand nicht auftrat, also mit der Exotoxin-Wirkung nicht zu identifizieren ist. Auch *Sutter* und *Raun* (1967) beschrieben eine offenbar auf enzymatischer Aktivität vegetativer Zellen von *B. thuringiensis* beruhende Vakuolisierung des Epithels im Darm von *Ostrinia nubilalis*, die nicht Endotoxin-bedingt ist.

Als Proteide sind die Exoenzyme (ebenso wie das Endotoxin und im Gegensatz zum ( $\beta$ -)Exotoxin) thermolabil. Während die Toxine nur in vivo getestet werden können (Biotest), sind diese Enzyme auch in vitro leicht nachweisbar.

#### a) Phospholipasen

Neben einer Phosphomonoesterase (auch kurz Phosphatase genannt, die u. a. Cholinphosphat hydrolysiert) besitzen die meisten Stämme von *B. cereus* und *B. thuringiensis* noch eine Phosphodiesterase C, die Lezithin in Diglycerid und Cholinphosphat spaltet und deshalb auch als Lezithinase C oder Phospholipase C<sup>1)</sup> bezeichnet wird. Entsprechend der Lezithin-Vitellin-Reaktion (s. Tab. 2 a, b) ist ihre Aktivität bei verschiedenen Varietäten oder Stämmen verschieden stark ausgeprägt. Zu den stärksten Phospholipase-Bildnern zählen u. a. *B. t.* var. *den-drolimus*, var. *sotto* und var. *alesti*; wenig oder keine Aktivität zeigen *B. t.*

<sup>1)</sup>  $\alpha$ -Exotoxin nach *Heimpel* (1967).

var. *galleriae*, var. *entomocidus* und var. *morrisoni*. Das Optimum der Phospholipase-Wirkung liegt bei pH 6,8–7,4.

#### b) Proteinasen

Neben den meist sehr substratspezifischen Oligopeptidasen besitzen die Stämme von *B. thuringiensis* und *B. cereus* auch einen Komplex von Polypeptidasen oder Proteinasen. Ihre Wirkung ist leicht zu demonstrieren gegenüber Gelatine oder Casein als Substrat. Zu den stärksten Proteinase-Bildnern zählen *B. t.* var. *alesti*, var. *sotto*, var. *dendrolimus*, zu den schwächsten *B. t.* var. *galleriae* und var. *aizawai*. — Nach Bucher (1960) sollen nach der Invasion von pathogenen Bakterien in der Hämocoele von Insekten die bakteriellen Proteinase u. a. für die (auch bei Injektion von *B. thuringiensis* oder *B. cereus* beobachtbare) Inaktivierung und Degeneration der Phagozyten verantwortlich sein.

### Zusammenfassung

Die vegetativen Zellen von *B. cereus* und *B. thuringiensis* produzieren Exoenzyme, die in der Lage sind, wichtige Zellbausteine (Phospholipide, Proteine) abzubauen. Sie wurden bisher nur in vitro getestet; ihre mögliche pathogenetische Bedeutung kann daher noch nicht ausreichend beurteilt werden.

### 4. Infektionswirkung

#### a) Perorale Infektion

Nicht alle Effekte von *B. thuringiensis* auf Insekten erschöpfen sich in Toxinwirkungen. So berichtete bereits Mattes (1927) über eine echte Infektion und Septikämie bei *Anagasta kühniella* nach peroraler Applikation des Sporen-Endotoxin-Komplexes. Burgerjon und Yamvriass (1959) sowie Heimpel und Angus (1959) stellten außerdem fest, daß gegenüber *Anagasta kühniella* das Endotoxin allein praktisch unwirksam ist. Erst seine Kombination mit lebenden Sporen führt hier zu einer bemerkenswerten (infektionsbedingten) Mortalität.

Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten Sutter und Raun (1966) bei Versuchen an *Ostrinia nubilalis*: Sporen und Endotoxin-Kristalle allein verfüttert bewirken zwar eine reduzierte Entwicklung (gemessen an der Gewichtszunahme pro Raupe), aber erst der Komplex beider Faktoren bewirkte eine auffallende Mortalität. Auch hier war die Todesursache eine terminale Septikämie nach Invasion von Keimen aus dem Darm in die Hämocoele. Die praktische Bedeutung der Infektiosität lebender Bazillen-Sporen (neben der Toxinwirkung) läßt sich auch aus Ergebnissen von UV-Bestrahlungsversuchen ableiten. So beschrieben Yamvriass (1962) bei *Anagasta kühniella* und Raun und Mitarb. (1966) bei *Ostrinia nubilalis* und *Spodoptera frugiperda* eine reduzierte pathogenetische Wirkung nach UV-Inaktivierung der Sporen in den verwendeten *B. thuringiensis*-Präparaten.

Kürzlich beschrieb Benz (1966 a) eine postparalytische und prämortale Septikämie auch bei *Pieris brassicae* nach Applikation letaler Dosen von *B. thuringiensis*. Nach dem gleichen Autor soll aber ganz allgemein bei empfindlichen Raupen nach Applikation des Sporen-Endotoxin-Komplexes eine terminale Septikämie auftreten, und zwar unabhängig davon, ob erst noch eine generelle Paralyse auftritt (wie z. B. bei *Bombyx mori* und *Pieris brassicae*) oder nicht.

Auch I s a k o v a (1964) beobachtete bei *Galleria mellonella* einen prämortalen Einbruch vegetativer Zellen in die Hämocoele nach *B. thuringiensis*-Behandlung. Außerdem beschrieb sie eindrucksvolle Veränderungen an den Hämocyten bereits vor der Septikämie: Kernpyknose, Vakuolisierung und Destruktion. Ähnliche Ergebnisse erhielt L e s k o v a (1964) bei *Hyponomeuta malinellus*. Die Autorin stellte alsbald nach der peroralen Aufnahme des Sporen-Endotoxin-Komplexes einen bemerkenswerten Anstieg der Hämocytenzahl fest. In Abhängigkeit von der applizierten Dosis kam es aber dann zu einem verschiedenen Verlauf: Bei letalen Dosen drangen schließlich vegetative Bakterienzellen in die Hämocoele ein und erzeugten dort eine tödliche Septikämie bei gleichzeitigem Hämocytensturz. Bei subletalen Dosen dagegen blieb die anfängliche Erhöhung der Hämocytenzahl lange Zeit bestehen. Nach V i d e n o v a (1966) traten auch bei einer *B. thuringiensis* Infektion von *Chloridea maritima* frühzeitig schwere Schädigungen (Vakuolisierung, Trennung von Kern und Plasma) an den Hämocyten auf, die schließlich zur Zerstörung der Zellen führten. Bevor noch alle Blutzellen zerstört waren, drangen vegetative Bakterienzellen in die Hämocoele ein und verursachten eine Septikämie. Eine wirksame Phagozytose konnte nicht beobachtet werden. Endlich fanden I s a k o v a und M o i s e e v a (1967) bei der *B. thuringiensis*-resistenten Noctuide *Barathra brassicae* eine physiologische Schwächung nach peroraler Applikation von Sporen und Endotoxinkristallen von *B. t.* var. *galleriae*: Reduktion der Nahrungsaufnahme, Verlängerung der Larvenstadien, Rückgang der Fertilität sowie Destruktion und Zerfall von Hämocyten. Es handelt sich hierbei um grundsätzlich die gleichen pathologischen Veränderungen, wie sie bei empfindlichen Wirten nach Applikation subletaler Dosen beobachtet werden (s. S. 48).

Soweit sich *B. thuringiensis* im Darmkanal von infizierten Insekten reproduziert, könnte — zumindest theoretisch — dort auch Exotoxin gebildet werden. Ob dieser Möglichkeit jedoch irgendeine pathogenetische Bedeutung zukommt, ist noch ungeklärt. Eine Endotoxin-Produktion im Tier hat hingegen auf den Verlauf der Pathogenese bestimmt keinen Einfluß mehr, da sie wohl stets erst post mortem erfolgen dürfte. Über die postmortale Sporulation und Kristallbildung von *B. thuringiensis* in *Bombyx mori* berichten A i z a w a und F u j i y o s h i (1964) und in *Vitula edmondsae* B u c h e r und Mitarb. (1966).

#### b) Parenterale Infektion

Bei einer Injektion von *B. thuringiensis*-Zellen oder -Sporen in die Hämocoele kommt es stets zu einer Septikämie. Abhängig von der Dosis tritt die Septikämie sofort oder verzögert ein und führt meistens innerhalb von 14 Std. zum Tode. Die  $D_{50}$  beträgt für Raupen von *Pectinophora gossypiella* 27...31 Bakterien/Insekt (I g n o f f o 1962)<sup>1)</sup>. — W i t t i g (1965) hat die Veränderungen des Hämocyten-Status nach Injektion von *B. thuringiensis* in *Pseudaletia unipuncta*-Raupen verfolgt: Bei mäßig hohen Dosen ( $16\cdots 33 \times 10^4$  Bakterien/Insekt) tritt vor dem Ausbruch des akuten Stadiums ein Anstieg der Plasmacyten-Zahl (Polyplasmacytose) ein. Bei sehr hohen Dosen ( $16\cdots 33 \times 10^6$  Bakterien/Insekt) kommt es

<sup>1)</sup> Bei parenteraler Applikation von *B. cereus* wurden bei Lepidopteren-Larven wie z. B. *Carpocapsa pomonella* vergleichbare Werte gefunden:  $D_{50} = 20$  Bakterien/Insekt (S t e p h e n s 1952). Nicht alle Insekten sind jedoch so hochempfindlich. Nach B u c h e r (1960) beträgt z. B. die parenterale  $D_{50}$  für manche Orthopteren (Heuschrecken) gegenüber *B. cereus* ca.  $10^4$  Bakterien/Insekt.

dagegen sofort zu einem Hämocytensturz, der vor allem die Plasmatoocyten betrifft. Die Anzahl der sog. spherule cells und der Prohämocyten war danach relativ erhöht. An der Phagoocytose waren nur Plasmatoocyten ( $\approx 50\%$  aller Hämocyten) beteiligt.

Einer Injektion in die Hämocoel entspricht auch die Übertragung von *B. thuringiensis* durch Parasitierung. K u r s t a k (1965) beschrieb im Zusammenhang mit der Parasitierung von *Anagasta kühniella*-Raupen durch eine (kontaminierte) Ichneumonide, *Nemeritis canescens*, eine *B. thuringiensis* Septikämie. Bevor aber noch eine merkbare Bakteriämie zu beobachten war, trat eine auffallende Zerstörung der Hämocyten (durch Vakuolosation und Degeneration des Cytoplasmas) ein. Erst nach diesem Hämocytensturz wurden septikämische Erscheinungen festgestellt.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Eine Infektion oder besser Septikämie tritt immer dann auf, wenn *B. thuringiensis* aus dem Darm in die freie Körperhöhle von Insekten gelangt. Das ist normalerweise bei intakter Darmschranke nicht der Fall. Wird aber der Darm von Lepidopterenraupen durch Endotoxin geschädigt, so kann sowohl *B. thuringiensis* als auch ein anderer Darmkeim eine prämortale Septikämie erzeugen. — Auch nach Parasitierung durch kontaminierte Vektoren wird gelegentlich eine *B. thuringiensis*-Septikämie beobachtet.

### 5. Virulenz und Toleranz

#### a) Pathogenität und Virulenz

Die pathogenetische Potenz einer Mikroorganismenart oder Varietät gegenüber einem bestimmten Wirtsgenotyp wird als Pathogenität bezeichnet, die pathogenetische Bedeutung eines bestimmten Stammes hingegen als Virulenz. Pathogenitätsunterschiede sind somit durch die Qualität, Virulenzunterschiede durch die Quantität der Pathogenitätsfaktoren (Toxine, Enzyme) bestimmt.

Am bekanntesten sind qualitative Unterschiede im Hinblick auf die Exotoxinproduktion. Wie bereits erwähnt (s. S. 34), produzieren nur bestimmte Genotypen („aktive Stämme“) von *B. thuringiensis* diese Toxinfraktion.

Etwas anders liegen die Dinge beim Endotoxin. Potentiell sind (per definitionem) alle Varietäten und Genotypen der Species *thuringiensis* zur Produktion von Endotoxin-Kristallen befähigt. Allerdings produzieren nicht alle Stämme das Endotoxin in gleicher Menge. Speziell berichtete S t e i n h a u s (1960), daß von 2 verschiedenen Stämmen der var. *thuringiensis* beim Virulenzvergleich an *Bombyx mori* sich der eine Stamm weniger, der andere dagegen stärker wirksam erwies als die beiden Vergleichsstämme, die anderen Varietäten (var. *sotto* und var. *entomocidus*) angehörten.

C o s e n z a und L e w i s (1966) verglichen die Virulenz von 4 frisch aus *Lymantria dispar* isolierten Stämmen von *B. t.* var. *thuringiensis* gegenüber dem gleichen Wirt und stellten signifikante Virulenzunterschiede fest. Die LD<sub>50</sub> betrug z. B. in einem Falle (Stamm 34)  $2,65 \times 10^6$  Sporen/ml bzw.  $2,0 \times 10^6$  Kristalle/ml und im anderen Falle (Stamm 1 A)  $17,5 \times 10^6$  Sporen/ml bzw.  $50 \times 10^6$  Kristalle/ml.

Eine unterschiedliche Pathogenität einzelner Varietäten von *B. thuringiensis* gegenüber einem oder mehreren Wirtsgenotypen wurde u. a. von Š v e c o v a (1959 a), V a n k o v á (1964), H e r f s (1963), B u r g e r j o n und B i a c h e

(1967a), Burges (1967), Ridet (1966) sowie Broersma und Buxton (1967) beschrieben.

Broersma und Buxton (1967) testeten 6 Varietäten von *B. thuringiensis* gegenüber Raupen von *Trichoplusia ni*. Dabei erwiesen sich var. *thuringiensis* und var. *galleriae* am wirksamsten; es folgten mit Abstand var. *alesti* und var. *sotto*, während var. *entomocidus* (*entomocidus*) und var. *finitimus* nur einen minimalen Effekt zeigten. Als Kriterien der Wirkung verwendeten die Autoren vergleichend: Fraßstop, Verpuppungsrate, Mortalität und histopathologische Veränderungen am Mitteldarm der Raupen.

Eine absolute Beurteilung der Pathogenität gegenüber einem Wirt ist aber nur dann möglich, wenn quantitativ (d. h. im Hinblick auf den Endotoxingehalt) gleichwertige Präparate an gleichartigem Wirtsmaterial verglichen werden. Ist dies nicht der Fall, so kann man mit Präparaten ganz verschiedener Varietäten gegenüber einer Wirtsart einen maximalen Effekt erzielen: Beispielsweise beurteilte Vaňková *B. t.* var. *galleriae*, Herfs *B. t.* var. *dendrolimus*, Ruperz *B. t.* var. *alesti* und Ridet *B. t.* var. *entomocidus* als maximal wirksam gegenüber Raupen von *Lymantria* (syn. *Porthetria*) *dispar*.

Werden jedoch Präparate verschiedener Varietäten gleichzeitig an mehreren (mindestens zwei) Wirtsarten getestet, so können (relative) Pathogenitätsunterschiede auch dann festgestellt werden, wenn die Präparate quantitativ verschieden sind, d. h. sie sich in ihrem Endotoxingehalt unterscheiden: Beispielsweise fanden Vaňková und Burges übereinstimmend, daß *Anagasta Kühniella* auf *B. t.* var. *thuringiensis* und *Galleria mellonella* auf *B. t.* var. *galleriae* maximal reagiert. Die auf solche Weise in verschiedenen Laboratorien erhaltenen Test-Ergebnisse werden allerdings nur dann übereinstimmen, wenn sie an Testtier-Stämmen von vergleichbarer Empfindlichkeit gewonnen wurden.

Burgerjon und Biache (1967a) testeten 7 Varietäten (bzw. 8 Stämme) an 24 Wirtsarten, wobei sie spezifische Aktivitätsspektren feststellten. Besonders interessant sind die Unterschiede innerhalb des Genus *Hyponomeuta*. Während z. B. *H. cognatellus* maximal auf *B. t.* var. *galleriae* ansprach und am wenigsten auf var. *sotto*, reagierte *H. malinellus* am stärksten auf var. *entomocidus* (einschließlich Subtoxicus-Stamm) und am schwächsten auf var. *alesti*; auf *H. padellus* schließlich wirkte am stärksten der Entomocidus-Stamm der var. *entomocidus* (gefolgt von var. *sotto*), dagegen gleichermaßen schwach die Varietäten *thuringiensis*, *dendrolimus*, *alesti* und der Subtoxicus-Stamm der var. *entomocidus*.

Ein Schlüssel zur Erklärung der unterschiedlichen Pathogenität einzelner Varietäten von *B. thuringiensis* gegenüber verschiedenen Wirten können die Beobachtungen von Lecadet und Martouret (1964) sein, wonach die Darm-Proteinasen einer Art (z. B. *Pieris brassicae*) die Endotoxin-Kristalle einer Varietät (z. B. *B. t.* var. *thuringiensis*) besser zu aktivieren vermögen als die einer anderen Varietät (z. B. *B. t.* var. *alesti*).

Für varietätsspezifische Unterschiede beim Endotoxin sprechen u. a. die von Vaňková und Králík (1966) gefundenen Unterschiede in der „Zellen“- bzw. Molekülgröße der Kristallproteine (s. S. 27).

Schließlich deuten serologische Untersuchungen von Krywiencyk und Angus (1966) darauf hin, daß in Lysaten von Endotoxin-Kristallen die toxischen Komponenten eine gewisse Varietäts-Spezifität aufweisen.

Abgesehen von primären Unterschieden in der Virulenz verschiedener Stämme scheinen auffallende Virulenz-Verluste etwa als Folge jahrzehntelanger Kultur auf optimalen künstlichen Nährböden normalerweise nicht aufzutreten. Doch kommen Ausnahmen von dieser Regel vor. Sie betreffen eine Reihe von Stämmen, die zur Zeit ihrer Isolierung ein für *B. thuringiensis* charakteristisches entomopathogenes Verhalten zeigten (wie z. B. *Bacillus gelechia* auct. — Metalnikov et Metalnikov 1933, *Bacillus cazaubon* auct. — Metalnikov 1930), dies aber nach neuen Untersuchungen von Vaňková (1965) heute ebenso verloren haben wie ihre Fähigkeit zur Kristall-Bildung (Vaňková 1966 b).

Es ist daher anzunehmen, daß von den genannten Stämmen heute nur noch Minus-Varianten hinsichtlich der Endotoxin-Produktion in Kultur sind. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, daß einer dieser Stämme (*Bacillus gelechia* auct.) zwar kein Endotoxin, aber noch Exotoxin zu produzieren vermag (Vaňková und Šebesta 1966).

Was den Einfluß des Kulturmediums auf die Produktion der einzelnen Toxine betrifft, so liegen Untersuchungen in dieser Hinsicht von Conner und Hansen (1967 b) am Exotoxin vor. In einem Zitrat-Mineral Salzmedium, das keine Aminosäuren enthält, produziert ein aktiver Stamm der var. *thuringiensis* nur eine minimale Menge von Exotoxin. Aminosäure-Zusatz wirkt sich verschieden auf die Ausbeute aus. Während beispielsweise Valin zu erheblicher Steigerung der Exotoxin-Produktion führt, reduziert die Leucin-Isoleucin-Gruppe die Ausbeute noch weiter. Maximal war die Exotoxin-Ausbeute nach Zusatz von 1 % Caseinhydrolysat (Casaminoacids) zu dem Zitrat-Grundmedium.

Über den Einfluß verschiedener Nährsubstrate auf die Sporenausbeute und die Endotoxinproduktion bei *B. t.* var. *thuringiensis* und *B. t.* var. *dendrolimus* haben Jalo vicin (1966) und bei *B. t.* var. *galleriae* Švecova und Zurbova (1966 b) berichtet. Die Ergebnisse der letztgenannten Autoren sind in gekürzter Form in Tab. 6 wiedergegeben.

Tab. 6. Einfluß des Nährmediums auf den Sporen- und Endotoxingehalt von *B. t.* var. *galleriae* (Stamm 63)  
(nach Švecova und Zurbova 1966 b, verändert)

Nährmedium	Sporen Titer 10 <sup>9</sup> /ml	Endotoxin- Kristalle (Größe)	Mortalität (%) im <i>Galleria</i> -Test
Fleisch-Pepton-Glucose	0,45	groß	100
Hefeautolysat	0,42	groß	95
Erbsenhydrolysat	0,57	groß	95
Kartoffel-Pepton-Glucose	1,20	groß	85
Maiskeim-Extrakt mit Melasse	1,00	klein	65
Erbsenextrakt	0,83	klein	45
Mais-Weizenkeim-Extrakt	0,28	klein	40
Malzextrakt	0,43	klein	20

Ebenfalls große Kristalle wie bei Verwendung von Fleisch-Pepton-Glucose erzielte (nach Švecova and Zurbova 1966 b) ein Hydrolysat aus *Galleria mellonella*-Raupen als Medium. Dagegen wurden nur kleine und irreguläre Kristalle bei der Kultur in einem Hydrolysat aus *Hadena sordida*-Raupen er-

halten. Entsprechend groß war der Unterschied in der Virulenz der erhaltenen Präparate: 85–100 % Mortalität (große Kristalle) und 15–65 % Mortalität (kleine Kristalle). Nach Švecova und Zurbova ist also die Ausbildung der Endotoxinkristalle und somit die Toxizität weitgehend abhängig von den Milieubedingungen unter denen das Wachstum von *B. thuringiensis* erfolgt.

Genetische Variationen in der Toxizität von *B. thuringiensis*-Präparaten mittels Mutagenen erzielten Mašanov (1966a, b) sowie Gukasjan und Mašanov (1966). Sie bestrahlten Kulturen von *B. thuringiensis* (var. *tuviensis* und var. *insectus*) mit Röntgen-Strahlen (Dosis  $5 \cdot 400 \times 10^3$  r) bzw. Gamma-Strahlen des  $\text{Co}^{60}$  (Dosis  $5 \cdot 200 \times 10^3$  r). Ein Teil der auf diese Weise gewonnenen und auf Kartoffelagar isolierten Mutanten wiesen eine erhöhte Toxizität (bis + 40 % Mortalität gegenüber *Dendrolimus sibiricus*) auf, ein Teil der Mutanten aber auch eine verminderte Toxizität (bis – 40 % Mortalität).

Über spontanen Kristallverlust bei *B. t.* var. *alesti* berichtete erstmals Toumanoff (1955). Durch Formaldehydbehandlung gelang es dann Fitz-James und Young (1959) bei *B. t.* var. *thuringiensis* und bei *B. t.* var. *sotto* Kristallverlust auch künstlich zu induzieren. In all diesen Fällen hatte der Kristallverlust keinen Einfluß auf charakteristische Daten des Stammes (speziell auf den Rest-P-Gehalt). Über den umgekehrten Vorgang, spontane Kristallbildung bei akristallophoren *B. cereus*-Stämmen, haben berichtet: Toumanoff (1956) (bei Stamm A-30) und LeCoroller (1958) (bei den Stämmen A-5 und 5237), und zwar als Folge einer Passage durch *Galleria mellonella*-Raupen. Den originären *B. cereus*-Stamm (A-30) und zwei seiner nach Tierpassagen kristallophor gewordener Subkulturen (später als B-30-1 und B-30-2 bezeichnet) haben Fitz-James und Young auf charakteristische biochemische Daten hin untersucht und dabei erhebliche Differenzen hinsichtlich des Rest-P-Gehaltes der Sporen festgestellt (2,1 bzw. 8,1 bzw.  $84,5 \text{ g} \times 10^{-16}$  pro Spore). Es besteht somit der Verdacht, daß in diesen Fällen aus den *G. mellonella*-Raupen (autochthone) Stämme von *B. thuringiensis* isoliert worden sind, die mit den eingepflichten *B. cereus*-Stämmen nicht identisch sind. Daß *G. mellonella*-Raupen gelegentlich *B. thuringiensis*-„carrier“ sind, konnte sowohl von Krieg und Franz (1959) als auch von Švecova (1958) und Norris (1961) nachgewiesen werden. — Im Gegensatz zu Toumanoff und LeCoroller gelang es Švecova und Zurbova (1966b) nicht, in avirulenten Sporenbildnern eine Kristallbildung dadurch zu induzieren, daß sie *G. mellonella*-Passagen einschalten. Gleichfalls bewirkten häufige Passagen (12 bzw. 21) von *B. t.* var. *dendrolimus* (Serotyp 4 a, b) und *B. t.* var. *galleriae* (Serotyp 5) durch Raupen von *Galleria mellonella* und *Pieris brassicae* keinerlei Virulenzänderungen bei den getesteten Stämmen. Nach Passagen (3 bzw. 6) durch *Barathra brassicae* und *Hadenia sordida* mußte sogar eine gewisse Abnahme der Virulenz registriert werden. Schließlich änderten sich nach 10 Passagen (von 4 Stämmen) von *B. t.* var. *alesti* durch *Galleria mellonella*-Raupen weder die Kristallform, noch die Virulenz, noch andere für die Varietät charakteristische Eigenschaften (Pigmentbildung, Agglutination mit  $\text{H}_3$ -Antiserum, Resistenz gegenüber einem spezifischen Phagen<sup>1</sup>).

#### b) Resistenz und Toleranz

Die Empfindlichkeit einer Wirtsart (gegenüber einem bestimmten Erreger-Genotyp) hängt von dem Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Sensibilitäts-

<sup>1</sup>) aus *B. t.* var. *galleriae* Stamm P 2.

faktoren (Aktivatoren und Rezeptoren) bzw. von Resistenzfaktoren (Inhibitoren und Immunitätsfaktoren) ab. Einige Aktivatoren der *B. thuringiensis*-Wirkung sind bereits bekannt: z. B. hohes Darm-pH, niedriges Darm-rH, geeigneter Proteinase-Status (im Zusammenhang mit der Aktivierung des Endotoxins). Über Existenz und Verbreitung von Rezeptoren für die Endotoxin- und Exotoxin-Wirkung existieren vorerst nur Vermutungen.

Da Immunitätsmechanismen<sup>1)</sup> offenbar keine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der *B. thuringiensis*-Wirkung spielen, dürften — soweit vorhanden — Resistenzfaktoren ebenso wie Sensibilitätsfaktoren streng an den Wirtsgenotyp gebunden sein.

Die Empfindlichkeit einer Wirtspopulation ist also in erster Linie abhängig von der potentiellen Empfindlichkeit der Art (s. Wirkungs-Spektren der einzelnen Toxine — Tab. 4 und Tab. 5 b) und zweitens von der aktuellen Empfindlichkeit des Wirtsstammes, von der sie sich ableitet. So beobachteten Aizawa und Mitarb. (1962), Krieg (1962) und Martouret (1963) bei bestimmten Stämmen von *Bombyx mori* eine auffallende Resistenz gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex im Vergleich zu anderen Stämmen des gleichen Wirtes. Diese Unterschiede könnten als Ergebnis einer selektiv bedingten Ausmerzung von Sensibilitätsfaktoren durch den Erreger selbst aufgefaßt werden, speziell, da *B. thuringiensis* in *Bombyx mori*-Zuchten enzootisch aufzutreten vermag.

Versuche von Yamvrias (1962) an *Anagasta kühniella* und von Sicker und Krieg (unpubl.) an *Plutella maculipennis*, bereits innerhalb von 7 Generationen einen selektionsbedingten Resistenzanstieg gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex zu erzielen, sind gescheitert. Sicker und Krieg stellten vielmehr fest, daß in der selektionierten Zucht Körpergröße und Fertilität auffallend reduziert waren.

Neuerdings beobachtete Matter (1966) bei *Anagasta kühniella* im Zusammenhang mit der Applikation subletaler Dosen von *B. thuringiensis* (in Übereinstimmung mit ähnlichen Beobachtungen von Yamvrias): Verlängerung der Entwicklungszeit, Tod im Puppen- oder Imaginal-Stadium, Mißbildung von Puppen oder Imagines, Reduktion der Fertilität, Reduktion der Schlüpfprozente und physiologische Schwächung der Folgegeneration.

Es scheint sogar nicht ausgeschlossen, daß als Folge einer fortlaufenden *B. thuringiensis*-Applikation in aufeinanderfolgenden Generationen eine Empfindlichkeitssteigerung auftreten kann, durch Summation von Spätwirkung und neuerlich appliziertem Agens.

Währendes Feigin (1963) nicht gelang, bei *Musca domestica* innerhalb von 27 Generationen einen Resistenzerwerb gegenüber dem Exotoxin zu erzielen, konnten Harvey und Howell (1965) inzwischen eine signifikante Resistenzsteigerung bei dem gleichen Testtier nach 30 Generationen Selektion erreichen. Dieser Resistenzerwerb gegenüber dem Exotoxin ging innerhalb von 20 Generationen bei fehlendem Selektionsdruck nur leicht zurück. —

Untersuchungen von Greenwood (1964) an *Lucilia sericata* (Macq.) und *Musca domestica* (L.) zeigten, daß auch Exotoxin-haltige Präparate von *B. thu-*

<sup>1)</sup> Eine Hämocyten-Reaktion (s. S. 43) ist zwar nachgewiesen, doch kann sie die prämortale Septikämie nicht verhindern. Da Insekten keine Antikörper zu bilden vermögen, ist eine entsprechende Immunreaktion nicht zu erwarten.



*ringiensis* auf Dipteren-Larven nachhaltig wirken können. Nach der Applikation subletaler Dosen wurde oft keine erhöhte Larvensterblichkeit beobachtet, dagegen in der folgenden Generation Puppenmortalität und Fertilitätsrückgang.

Die aktuelle Reaktion einer Population gegenüber *B. thuringiensis* wird weitgehend bestimmt durch den Entwicklungszustand ihrer Individuen. So greift der Bazillus bzw. seine Toxine besonders die Larvenstadien an. Ihre Empfindlichkeit nimmt im allgemeinen mit dem Alter ab. Diese sog. Alterstoleranz läßt sich nach Untersuchungen von Wiegand (1963 a) über die Wirkung des Sporen-Endotoxin-Komplexes auf Larven von *Hyponomeuta malinella* mit der Gewichtszunahme der Larven korrelieren. Die Beurteilung der Empfindlichkeit verschiedener Larvenstadien erfolgt zweckmäßigerweise anhand von Zeit-Dosis-Kurven. Mit zunehmendem Alter erhält man auf diese Weise immer ungünstiger liegende divergierende Regressionsgraden (Wiegand 1960, 1962, 1963 a, b; Krieg 1965 b).

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Verschiedene Varietäten (bzw. Genotypen) von *B. thuringiensis* können sich gegenüber bestimmten Wirtsgenotypen in ihrer Pathogenität unterscheiden. Die Virulenz (Toxizität) ist keine Eigenschaft der Varietäten, sondern verschiedener Stämme. Außerdem beeinflussen die Kulturbedingungen die Aktivität der Präparate. Minusvarianten (Mutationen) hinsichtlich der Pathogenitätsfaktoren (Toxine) sind bekannt. — Die Resistenz einer Wirtsart (bzw. eines Wirtsgenotypus) scheint streng genetisch determiniert, da Immunitätsmechanismen offenbar keine entscheidende Rolle spielen. Die aktuelle Toleranz ist u. a. eine Funktion des Raupenalters, da mit dem Wachstum der Raupen das Verhältnis Dosis pro Gewichtseinheit Tier immer ungünstiger wird. Resistenz als Folge konsequenter Selektion gegenüber dem Exotoxin wurde bereits beschrieben. Für den Sporen-Endotoxin-Komplex liegt noch kein entsprechender Befund vor. Gelegentlich konnte auch der umgekehrte Vorgang beobachtet werden, nämlich eine Empfindlichkeitssteigerung in der nächsten Generation infolge Nachwirkung.

### 6. U m w e l t - E i n f l ü s s e (Klimafaktoren)

Über den direkten Umwelteinfluß (speziell von Klimafaktoren) auf die Reaktion des Wirtes gegenüber *B. thuringiensis* liegt bisher nur verhältnismäßig wenig Daten-Material vor.

Ignoffo (1962) untersuchte den Einfluß von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit auf Raupen von *Pectinophora gossypiella*, denen er zuvor *B. t.* var. *thuringiensis* ( $7 \times 10^5$  Sporen/Larve) injiziert hatte. Die Optimaltemperatur (gemessen an der  $t_{50}^1$ ) betrug  $40,1^\circ \text{C}$ . Keine Septikämie konnte oberhalb  $51,2^\circ \text{C}$  und unterhalb  $8,6^\circ \text{C}$  beobachtet werden. Wie bei anderen Infektionen von Insekten ist auch die spezifische Reaktionsgeschwindigkeit (K) bei der *B. thuringiensis*-Infektion vor allem stark abhängig von der Temperatur (T). Der Temperaturkoeffizient  $Q_{10} = K_{T+10}/KT$  (gemessen in einem mittleren T-Bereich) betrug in diesem Falle  $3 \cdots 4$ . — Verschiedene relative Luftfeuchtigkeiten (7, 24, 67 und 100 %) hatten keinen Einfluß auf Raupen von *Pectinophora gossypiella*, denen *B. t.* var. *thuringiensis* (522 Sporen/Larve) injiziert worden war.

<sup>1</sup>)  $t_{50}$  bedeutet die Zeit, in der 50 %ige Mortalität erreicht wird nach Applikation einer bestimmten Dosis ( $D_{50}$ ).

Vasiljević (1957) untersuchte den Einfluß der Temperatur auf peroral mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex infizierte Raupen. Seine Ergebnisse entsprechen einem Temperaturkoeffizienten von  $Q_{10} = 2$ . Entsprechend den Beobachtungen von R a u n und Mitarb. (1966) beträgt der Temperaturkoeffizient  $Q_{10}$ , beurteilt nach der  $t_{50}$ , bei der peroralen Infektion von *Ostrinia nubilalis*-Raupen 3...4.

Auch auf die perorale Infektion scheint (nach eigenen Beobachtungen an *Pieris brassicae*) die Luftfeuchtigkeit im allgemeinen keinen direkten Einfluß zu haben. — Erwähnenswert ist jedoch ein Befund von G i b s o n und W o l f (1964), wonach eine hohe Luftfeuchtigkeit die Widerstandsfähigkeit der Larven von *Anagasta kühniella* gegenüber *B. thuringiensis* erhöhte. Es ist wahrscheinlich, daß in diesem Falle die hohe Luftfeuchtigkeit die Entwicklung der Larven beschleunigte und damit gleichzeitig auch die Entwicklung der Alterstoleranz.

Über die Wirkung außergewöhnlicher Belastungen s. Seite 84.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Die *B. thuringiensis*-Wirkung ist stark temperaturabhängig. Im mittleren Temperaturbereich ist bei einer Temperaturerhöhung um  $10^{\circ}\text{C}$  mit einer Beschleunigung des Wirkungseintrittes um das 2- bis 4fache zu rechnen. Das Wirkungsoptimum liegt oberhalb  $30^{\circ}\text{C}$ . Der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit auf der *B. thuringiensis*-Wirkung ist dagegen meist vernachlässigbar klein.

### D. Ungefährlichkeit

#### I. Allgemeines

Im Zusammenhang mit einer Anwendung von bakterienhaltigen Mitteln in der Schädlingsbekämpfung ergeben sich zunächst Probleme hygienischer Art. In der Bundesrepublik Deutschland ist im „Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung übertragbarer Krankheiten beim Menschen“ (1961) folgende Regelung getroffen: Zur Schädlingsbekämpfung dürfen Krankheitserreger, durch die übertragbare Krankheiten beim Menschen verursacht werden können, nicht verwendet werden (§ 27). Weiterhin verbietet der § 17 des noch gültigen Viehseuchengesetzes (1909) und die ebenfalls noch in Kraft befindliche Verordnung zur Ergänzung der Vorschriften über Krankheitserreger (1936) die Verwendung solcher bakterienhaltiger Mittel, die beim Menschen oder beim Vieh übertragbare Krankheiten hervorrufen.

Unter diesen Umständen war von den Befürwortern einer bakteriellen Schädlingsbekämpfung den Gesundheitsbehörden gegenüber zunächst der Nachweis zu erbringen, daß *Bacillus thuringiensis* ungefährlich ist und zwar

- a) für Mensch und Vieh und
- b) für Nutzinsekten, speziell für die Biene.

#### 2. Wirkung auf Mensch und Wirbeltiere

Zur hygienischen Beurteilung des Sporen-Endotoxin-Komplexes des *Bacillus thuringiensis* Berliner liegen umfangreiche experimentelle Ergebnisse vor, die von verschiedenen Seiten einschließlich dem U.S. Department of Agriculture angestellt wurden. Speziell geben die Untersuchungen von F i s h e r und R o s n e r (1959), B r i g g s und G o o d r i c h (1959), D u n n (1960), C o r l e t t (1961), S t u a r t (1961), S m i r n o f f und M c L e o d (1961) sowie A d a m s und H a r t m a n (1965) keinen Anhaltspunkt dafür, daß *B. thuringiensis* nach peroraler Applika-

tion oder Injektion gegenüber Säugetieren und Vögeln infektiös ist. Ausgedehnte Untersuchungen wurden auch am Menschen speziell durchgeführt (Fisher and Rosner 1959, ref. bei Krieg 1961).

Godovaribai und Mitarb. (1962) untersuchten histologisch Leber, Niere und Milz von Ratten (*Rattus rattus*), denen Dosen von 600–1000 ppm *B. thuringiensis* über eine Periode von 6 Monaten verfüttert wurden. Hierbei konnten keine pathologischen Veränderungen festgestellt werden. Zweijährige Fütterungsversuche mit den gleichen Dosen sollten angestrebt werden.

Soweit verfüttert, können *B. thuringiensis*-Sporen aus den Faeces re-isoliert werden (Smirnoff and McLeod, Adams and Hartman). Die Sporen bleiben somit durch die Verdauungssäfte unangegriffen.

Wird *B. thuringiensis* in so hohen Dosen verfüttert, daß eine erzwungene Bakteriämie auftritt, so folgt dieser ebensowenig wie der Injektion eine lokalisierte Infektion oder eine Septikämie. Die erzwungene Bakteriämie verschwindet 2–4 Tage, nachdem der Bazillus von der Diät abgesetzt wird (Stuart 1961).

Lamanna und Jones (1963) bestimmten die parentale LD<sub>50</sub> von *B. thuringiensis* für Mäuse (*Mus musculus*) zu  $4 \times 10^7$ – $1 \times 10^9$  Sporen nach i. p.-Injektion. Das ist etwa die gleiche Mäuse-LD<sub>50</sub>, die Sporen von *B. cereus* erzielen ( $6 \times 10^7$ – $3 \times 10^8$ )<sup>1</sup>). Aus diesen Ergebnissen geht auch hervor, daß das insektizide Endotoxin keine zusätzliche toxische Wirkung auf Säugetiere, speziell Mäuse, hat. Nach Untersuchungen von Holtmann (1960) sowie Watanabe (1967) wird das Endotoxin durch die Enzyme des Säuger-Darmes (Pepsin, Trypsin) nach kurzer Einwirkungszeit zerstört. Endotoxin in Form gereinigter Kristalle hatte selbst in peroralen Dosen von 770  $\gamma$  Kristalle/g Ratte keinerlei Wirkung auf die Versuchstiere (Fisher and Rosner 1959). Im Vergleich dazu beträgt die perorale D<sub>50</sub> nach Martouret und Mitarb. (1965) für *Pieris brassicae*-Raupen 0,25  $\gamma$  Kristalle/g Raupe.

Weitere Arbeiten betreffen die mögliche Toxizität von *B. thuringiensis*-Präparaten gegenüber anderen Wirbeltieren wie Vögel und Fische: Nach Briggs (1960 a) erhielten Hennen (*Gallina domestica*) über 23 Monate täglich 0,5 bis 10 g eines *B. thuringiensis*-Präparates, ohne daß Unterschiede bezüglich Gewicht, Allgemeinzustand und Eiablage gegenüber den Kontrollen auftraten. Legehennen, die aus 1-Wochen-Küken über eine Periode von 2 Jahren unter *B. thuringiensis*-Behandlung aufgezogen worden waren, zeigten keinerlei pathologische Befunde nach Autopsie. — Während *B. thuringiensis* keinerlei Toxizität gegenüber dem sog. Mosquito-Fisch (*Gambusia spec.*) und der Regenbogenforelle (*Trutta iridea*) zeigte (Cope 1960, Briggs and Goodrich 1960), war eine geringe Wirkung gegenüber Jungfischen des Coho-Salms (*Salmo spec.*) nachweisbar (Nedder 1960). Diese Wirkung auf Jungfische könnte jedoch auch eine indirekte gewesen sein und auf bakterielle Reduktion des O<sub>2</sub>-Partialdruckes im Wasser zurückzuführen sein.

Zwei Formulierungen von *B. thuringiensis* jedoch (Agritol und Baktthane), welche im Gegensatz zu anderen Präparaten (Thuricide und Biotrol) sich als toxisch gegenüber japanischen Wachteln (*Coturni spec.*) erwiesen hatten, waren nach Borgatti und Guyer (1962) und Stuart (1961) mit

<sup>1</sup>) Die Mäuse LD<sub>50</sub>-Werte (i. p.) für vegetative Zellen liegen größenordnungsmäßig um 1–2 Zehnerpotenzen niedriger.

chlorierten Kohlenwasserstoffen verunreinigt. Der Tod der Versuchstiere ging hier zu Lasten dieser Kontamination.

Werden Exotoxin-haltige Präparate (von „aktiven“ Stämmen des *B. t.* var. *thuringiensis*) z. B. Hühnern (*Gallina domestica*), Rindern (*Bos taurus*) und Schweinen (*Sus scrofa domestica*) verfüttert, so ist die Exotoxinwirkung noch in den Faeces nachweisbar (Briggs 1960 a und Dunn 1960, vgl. aus S. 84). Diese Präparate zeigten jedoch im Verlaufe der Passage durch den Darm keinerlei Wirkung auf die Tiere selbst; zum Teil liefen die Versuche (Briggs 1960 a) über 2 Jahre. — Neuerdings berichtete jedoch Galichet (1966) über eine Inappetenz und eine wohl damit zusammenhängende Gewichtsabnahme bei Schweinen, wenn sie mit hohen Dosen einer 24fach konzentrierten Exotoxinlösung behandelte Futtermittel erhielten. — Exotoxin in Lösung wird nach Gingrich und Eschle (1966) im Darmtraktus von Rindern größtenteils (> 50 %) absorbiert oder inaktiviert, nicht dagegen, wenn das Exotoxin mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex zusammen verfüttert wird.

Krieg und Herfs (1963 b) führten mit unverdünnter Exotoxin-Lösung Modell-Versuche an Mäusen durch. Sowohl nach peroraler (50 ml/10 Tage/Tier) als auch nach parenteraler Applikation (3 × 0,5 ml bzw. 3 × 1,0 ml/Tier intraperitoneal) konnte weder eine toxische noch eine allergische Reaktion bei den Versuchstieren beobachtet werden. Eine Nachbeobachtung fand 20 Tage lang statt.

Was die Möglichkeit einer Mutation von *B. thuringiensis* zu einer Art betrifft, die pathogen für Wirbeltiere wäre, so kann eine solche zwar theoretisch nicht ausgeschlossen werden; bereits 1959 (a) hat aber Steinhäus dieses Problem auf der Basis von Selektions-Experimenten diskutiert und die Wahrscheinlichkeit für eine solche Mutation als gering beurteilt. Nach Serienpassagen über ein Blut-Glucose-Medium fanden Brown und Mitarb. (1958) und Brown (1959) prä-existente pathogene Zellen nur in Klonen einiger *B. cereus*-Stämme, aber nicht in Klonen von *B. thuringiensis*-Stämmen. — Auch Passagen von *B. thuringiensis*, die Fisher und Rosner (1959) über Mäuse, sowie Corlett (1961) über Mäuse, Ratten und Meerschweinchen durchführten, hatten keinerlei Virulenzsteigerungen zur Folge.

Die Gefahr einer Mutation des harmlosen *B. thuringiensis* zu einer wirbeltierpathogenen Art ist viel unwahrscheinlicher als eine mögliche Reversion von Virulenz-abgeschwächten Bakterien- oder Virus-Stämmen in die hochvirulente Stammform. Die Gefahr eines Auftretens von Revertanten hat jedoch nie zu so ernsten Befürchtungen Anlaß gegeben, daß man die Milzbrand-Schutzimpfung von Tieren sowie Pocken-, Gelbfieber- oder Poliomyelitis-Schutzimpfungen beim Menschen mit Lebendvakzinen unterlassen hätte.

Nach Ignoffo (1967) ist *B. thuringiensis* für Mensch und Säuger nicht nur kein Pathogen, kein Toxin und kein Allergen, sondern besitzt auch keinerlei onkogene oder teratogene Potenzen.

Bei der Behandlung des gesamten Komplexes einer hygienischen Beurteilung von *B. thuringiensis* muß außerdem berücksichtigt werden, daß der Mensch ständig im Bereich natürlicher *Bacillus cereus*-Populationen lebt. Keine Erdprobe dürfte frei von ihnen sein. Diesen Stämmen kann der Mensch nicht ausweichen, und sie sind oft potentiell gefährlicher als *B. thuringiensis*.

Speziell über die potentielle Pathogenität von *B. cereus* sind neuerdings einige bemerkenswerte Arbeiten erschienen z. B. Nikodémusz und Gonda (1963). Hiernach dürften die Fleischfresser stärker gefährdet sein als die Pflanzenfresser. Von *B. cereus* beim Menschen verursachte Vergiftungserscheinungen (Abdominalschmerz, Diarrhoe, Nausea) sind jedoch im allgemeinen nach 24 Std. wieder verschwunden. — Nikodémusz und Bouquet (1961) fanden, daß *B. cereus*-Stämme, die als Lebensmittelvergifter auftraten, auch nach intraperitonealer Injektion in Mäusen wirksam waren: Von 10 derartig behandelten Mäusen starben 7 innerhalb 24 Std. Im Blut und in der Milz der Versuchstiere wurden reichlich Bakterien gefunden.

Nach Hauke (1961) liegt die für Menschen wirksame perorale *B. cereus*-Dosis bei  $10^4 \cdots 10^5$  Sporen/g Lebensmittel. Im Vergleich dazu wurde bei der Applikation von *B. thuringiensis* in Dosen von  $3 \times 10^9$  Sporen/Tag keine toxische Wirkung auf den Menschen festgestellt, auch wenn diese Dosis über 5 Tage in der gleichen Höhe gegeben wurde (Fisher and Rosner 1959).

Um jedoch in jedem Einzelfall auszuschließen, daß *B. thuringiensis*-Präparate auf Säuger toxisch wirkende Bazillen enthalten, wird eine Prüfung jeder industriellen Charge im Mäusetest für unumgänglich gehalten (Harvey 1960, Krieg 1961).

### Zusammenfassung

*B. thuringiensis* besitzt für Menschen und Vieh keine höhere Virulenz (oder Toxizität) als der mit *B. thuringiensis* nahe verwandte, ubiquitär vorkommende *B. cereus*; er ist deshalb als ungefährlich zu betrachten. Die Wahrscheinlichkeit einer positiven Mutation zu einer wirbeltierpathogenen Form wird bei *B. thuringiensis* für minimal gehalten, jedenfalls für geringer als bei Lebendvakzinen in der Human- und Veterinärmedizin. — Das Endotoxin besitzt keine Giftwirkung auf Wirbeltiere. Auch das Exotoxin dürfte nach den bisher vorliegenden Ergebnissen für Wirbeltiere ungefährlich sein. Stark konzentrierte Kulturfiltrate können jedoch, in extrem hohen Dosen angeboten, auf Säugetiere (Schweine) eine Repellent-Wirkung ausüben.

### 3. Wirkung auf Bienen (*Apis mellifera*)

Erste Untersuchungen über die Bienenunschädlichkeit von *B. thuringiensis* wurden von Kaeser (1957) angestellt (vgl. Krieg und Franz 1959). Auch eine 1959 von Lecomte und Martouret publizierte Arbeit stellte fest, daß übliche Anwendungskonzentrationen von *B. thuringiensis* adulte Bienen nicht gefährden. Im Gegensatz dazu berichtete Gukasjan (1958 a), daß Kulturen von *B. thuringiensis* Bienen zu einem hohen Prozentsatz abzutöten vermögen. Krieg und Herfs (1963 a) wiederholten die Versuche von Gukasjan auf breiter Basis, wobei sie anstelle von Gesamtkulturen verschiedene Fraktionen von *B. thuringiensis*-Kulturen testeten. Es stellte sich heraus, daß speziell die Exotoxin-haltige Kulturflüssigkeit von *B. thuringiensis*-Kulturen in unverdünntem Zustand gegenüber Bienen eine Giftwirkung zeigte, wenn sie über einen längeren Zeitraum (5–10 Tage) im Futtersaft verfüttert wurde. Aber auch der Sporen-Endotoxin-Komplex zeigte eine Wirkung, wenn er in extrem hohen Dosen dem Futtersaft beigemischt war. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten Martouret und Euvette (1964). Auch Cantwell und Mitarb. (1964 b) konnten

die Befunde von K r i e g und H e r f s über die Wirksamkeit von *B. thuringiensis-Exotoxin* auf Bienen bestätigen. Nach C a n t w e l l und Mitarb. liegt die perorale  $D_{50}$ <sup>1)</sup> (Zeitparameter  $t_{50} = 7$  Tage) für Flugbienen bei etwa 0,63 mg Exotoxin/Biene.

Die Wirkung des Sporen-Endotoxin-Komplexes auf Brut verschiedener Bienen-Stämme wurde von S h i m a n u k i und Mitarb. (1963) untersucht. Sie testeten vergleichend *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* und den Erreger amerikanischer Faulbrut, *Bacillus larvae* (Dosis  $1,7 \times 10^3$  Sporen/Larve) an Bienenlarven aus einem gegenüber der amerikanischen Faulbrut sensiblen (S) und einem resistenten Stamm (R). Kein Unterschied im Verhalten (Beseitigung von Larven) konnte gefunden werden zwischen 24 Std. alten R-, 32 Std. alten S- und 32 Std. alten R-Larven, ganz gleich, ob sie Wasser, *B. thuringiensis*- oder *B. larvae*-Sporen erhielten. Bei 24 Std. alten S- und 16 Std. alten R- und S-Larven traten dagegen erwartungsgemäß signifikante Ausfälle (durch Beseitigung von Larven 13 Tage post infectionem) nur nach Behandlung mit *B. larvae*-Sporen auf; dagegen entstanden keine Ausfälle nach *B. thuringiensis*-Behandlung. Ein noch nicht erklärbarer Effekt (signifikante Erhöhung der Selbstreinigungsrate 1 Tag (!) post infectionem) wurde nach *B. thuringiensis*-Applikation im Gegensatz zu *B. larvae*-Applikation bei 16 und 24 Std. alten S-Larven registriert. Dessen ungeachtet beobachteten die Autoren jedoch keine *B. thuringiensis*-bedingte Mortalität.

Über den Einfluß von Exotoxin der var. *thuringiensis* auf die Bienenbrut berichteten erstmals C a n t w e l l und Mitarb. (1964 b). Sie fanden, daß Exotoxin in einer Konzentration von 10 mg/ml in 5 Tagen die Imagines zwar zu 100 % abzutöten vermag, die Larven des letzten Stadiums jedoch nur zu 30 %. Von den mit der genannten Dosis behandelten Larven entwickelten sich noch 11 % zu Imagines. Hiernach wirkt also das Exotoxin erstaunlicherweise weniger stark auf (ältere) Bienenlarven als auf die Flugbienen.

In einer neueren Arbeit berichteten C a n t w e l l und Mitarb. (1966) über die Testung von verschiedenen Fraktionen eines technischen *B. t.* var. *thuringiensis*-Präparates (P a r a s p o r i n e). Die pro Biene applizierten Dosen betragen  $0,67 \times 10^9$  Sporen,  $1,67 \times 10^9$  Sporen,  $4,0 \times 10^6$  Kristalle,  $8,0 \times 10^6$  Kristalle,  $16,0 \times 10^6$  Kristalle und 2,5 mg Exotoxin-haltiger Überstand (trocken gewogen). Außerdem wurden Endotoxin-Kristalle der var. *alesti* ( $0,5 \times 10^6$ /Biene) und der var. *sotto* ( $0,5 \times 10^6$ /Biene) geprüft. Bis zum 7. Tag war weder eine durch die Kristallfraktionen noch durch die Sporenfraktionen bedingte Mortalität registrierbar. Erst nach 8 Tagen trat bei der höchsten Sporenkonzentration eine signifikante Mortalität auf. Nur die Exotoxinfraktion bewirkte nach 7 Tagen eine 100 %ige Mortalität. Ebenfalls eine fast 100 %ige Mortalität brachte das nicht fraktionierte Gesamtpräparat nach 11 Tagen, wenn es in einer Konzentration von  $0,06 \times 10^9$  Sporen/Biene verfüttert wurde.

Weitere Befunde über die Unbedenklichkeit von industriellen *B. thuringiensis*-Präparaten für Bienen liegen von F i s h e r und R o s n e r (1959), E c k e r t (1959), A y y a r (1961) und J o h a n s e n (1962) vor.

L e s k o v a und K u l i k o v (1963) fanden einen toxischen Effekt, wenn Honigbienen technische Präparate oder entsprechende Kulturen in Dosen von

<sup>1)</sup>  $D_{50}$  bedeutet die Dosis, die 50 %ige Mortalität bewirkt innerhalb einer bestimmten Zeit ( $t_{50}$ ).  $LD_{50}$  bedeutet demgegenüber 50 %ige Endmortalität (ohne Zeitparameter).

$3 \times 10^9$  Sporen/ml Futtersaft 9 Tage lang verfüttert wurden. Dabei erwies sich *Thuricide* (*B. t.* var. *thuringiensis*) etwa doppelt so wirksam wie *Entobakterin-3* (*B. t.* var. *galleriae*)<sup>1)</sup>. Bei Herabsetzung der Dosis auf  $1 \times 10^9$  Sporen/ml wurden unter sonst gleichen Bedingungen keine Ausfälle mehr beobachtet.

Stute (1963) testete *Biospor* (*B. t.* var. *thuringiensis*) in 1 %iger Suspension durch Einzelfütterung an Bienen ( $D = 0,01$  ml). In eigenen Untersuchungen (Krieg 1964 a) wurden ebenfalls technische Präparate (*Biospor*, *Biotrol*, *Thuricide*) getestet und zwar 0,2 %ig (also wie in der Spritzbrühe üblich) 9 Tage lang ( $D \approx 0,3$  ml). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß diese Dosen für Bienen völlig unschädlich sind.

Die Wirkung von *Bacthane* (*B. t.* var. *thuringiensis*) auf Bienen untersuchten Celli und Giordani (1965/66). Dabei fanden sie bei viel geringeren Dosen (nämlich bereits bei  $8,4 \dots 13,8 \times 10^5$  Sporen/Biene/Tag) als andere Autoren eine 100 %ige Mortalität nach 7–8 Tagen, wenn das Präparat direkt im Futtersaft appliziert worden war. Die histopathologischen Veränderungen waren: Verschwinden der peritrophischen Membran, Reduktion des Epithels und Erosion der Darmwand.

Nach Borgatti und Guyer (1962) und Stuart (1961) waren Chargen von *Bacthane* mit chlorierten Kohlenwasserstoffen verunreinigt. Die beobachtete hohe Bienenmortalität dürfte auch hier zu Lasten dieser Kontamination gehen.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß Fraßgifte, deren  $LD_{50}$  oberhalb 0,1 mg/Biene liegt, für diese als unschädlich anzusehen sind, so trifft dies nicht nur für die Sporen-Endotoxin-Präparate, sondern auch für Exotoxin-haltige Präparate zu. Wo hier die Grenzen der Unbedenklichkeit liegen, zeigt ein Versuch von Cantwell und Mitarb. (1966). Diese Autoren führten Prüfungen über längere Zeit (3 Monate) an Versuchsvölkern durch und zwar mit einem technischen Gesamtpräparat (Sporen-Endotoxin plus Exotoxin) und einer Exotoxin-Anreicherung. Die verabreichten Dosen betragen pro Volk  $50 \times 10^9$  Sporen-Äquivalent Gesamtpräparat in 200 ml Zuckersirup suspendiert bzw. 2 g (getrockneter) Exotoxin-haltiger Überstand in 200 ml Zuckersirup gelöst. Während nach Exotoxin-Behandlung die Bienen innerhalb von 2 Wochen größtenteils abgestorben waren, konnte noch nach 3 Monaten keine merkliche Reduktion (im Vergleich zu unbehandelten Völkern) beobachtet werden, wenn das Gesamtpräparat verfüttert worden war. Hieraus ergibt sich, daß das Gesamtpräparat ohne Bedenken angewandt werden kann, d. h. es kann auch in die Blüte gespritzt werden, ohne daß ein nachteiliger Einfluß auf die Bienen als wichtigstem Blütenbestäuber zu befürchten wäre. Bei Verwendung von Exotoxin-Konzentrat sollte man jedoch etwas vorsichtiger verfahren. Die Gefahr einer Vergiftung ist aber auch hier gering, weil Spritzmittel im allgemeinen schnell antrocknen und weder *B. thuringiensis* noch eine seiner Toxin-Fractionen eine Kontakt- oder eine Atemgift-Wirkung besitzt.

Außer Laborversuchen stellten Lecomte und Martouret (1959) auch Gewächshaus-Versuche an: Nach Beflug von *Brassica napus*-Pflanzen, die mit Sporen und Endotoxin von *B. t.* var. *alesti* (in einer Anwendungskonzentration von  $6 \times 10^3$  UT<sup>2)</sup>) und einer Aufwandmenge von 1 400 l/ha) behandelt worden

1) Diese Varietät produziert kein Exotoxin.

2) UT = Unite toxicologique nach Burgerjon 1962.

waren, wurde bei den Versuchs-Bienen weder eine Intoxikation noch eine anomal hohe Sterblichkeit registriert. — *Stute* behandelte (1963) Bienentracht-Pflanzen (*Phacelia tanacetifolia*) im Zeltversuch mit 0,2 %iger Spritzbrühe (*Biospor*). Bei gutem Beflug konnte er keinerlei Schäden bei den Versuchsvölkern feststellen. — *Celli* und *Gior dani* (1965/66) besprühten im Freiland und im Gewächshaus blühende Trachtpflanzen (*Daucus carota* bzw. *Medicago spec.*) mit einer 0,25 %igen Spritzbrühe von *Bacthane* (*B. t.* var. *thuringiensis*). An den die Blüten befliegenden Bienen, die in *Gary*-Fallen gefangen wurden — konnten (innerhalb von 5 Tagen Beobachtungszeit) (im Gegensatz zu den oben zitierten Laborversuchen mit *Bacthane*) keine Ausfälle beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen liegen von *Wilson* (1962) vor: Er behandelte Bienenstöcke durch Spritzen mit einer *B. thuringiensis*-Suspension (5·15 g Spritzpulver/Stock) oder durch Stäuben (30 g Staub/Stock). Im Verlaufe der 2 Monate dauernden Versuche zeigten Bienen, Puppen und Larven ein normales Verhalten und keinerlei Krankheitssymptome. Die Honigausbente blieb unbeeinflusst. Ähnliche Versuche führten auch *Leskova* und *Kulikov* (1963) vergleichend mit technischen Präparaten aus: 10·50 g/qm wurden von *Thuricide* (*B. t.* var. *thuringiensis*) oder *Entobakterin-3* (*B. t.* var. *galleriae*) auf Bienenwaben gestäubt oder gespritzt, ohne daß eine Schädigung von Bienen oder Brut zu beobachten gewesen wäre.

In diesem Zusammenhang soll nicht unerwähnt bleiben, daß *Toumanoff* (1963) *B. thuringiensis* aus dem Darmtraktus von gesunden Bienen isolieren konnte. Er nimmt daher an, daß Bienen sogar als Vektor für *B. thuringiensis* fungieren können<sup>1)</sup>. — Nach *Plurad* und *Hartman* (1965) werden allerdings Sporen von *B. thuringiensis* im Darm von Bienen (speziell im Vorderdarm) sehr schnell abgetötet: So waren von  $7 \times 10^4$  peroral applizierten *B. thuringiensis*-Sporen nach 15 min nur noch weniger als 3 % lebensfähig. (Im Gegensatz dazu erwiesen sich *B. cereus*-Sporen als relativ resistent: Von  $6 \times 10^4$  verfütterten Sporen konnten nach 15 min noch 30·50 % aus dem Bienendarm re-isoliert werden.) Die Inaktivierung von *B. thuringiensis*-Sporen im Darm erwachsener Bienen dürfte durch einen bakteriziden Faktor von solcher Art bewirkt werden, wie er im Königinnen-Futtersaft vorkommt.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g

Der Sporen-Endotoxin-Komplex von *B. thuringiensis* ist sowohl für die Bienenbrut als auch für die Flugbienen ungefährlich. Präparate auf der Basis des Sporen-Endotoxin-Komplexes können daher unbedenklich in die Blüte gespritzt werden, ohne daß eine Gefahr für die Blütenbestäuber zu erwarten wäre. Das Exotoxin von *B. thuringiensis* wirkt zwar unverdünnt im Futtersaft appliziert auf Bienen schädlich. Bei den zur Schädlingsbekämpfung im Freiland verwendeten Dosen ist jedoch die Gefahr einer Vergiftung von Bienen selbst bei Verwendung von exotoxinhaltigen Präparaten nicht zu erwarten.

<sup>1)</sup> *Sekariah* und *Seth* isolierten 1959 aus „Faulbrut-kranken“ Honigbienen (*Apis indica*) einen kristallophoren Sporenbildner, den sie als *B. thuringiensis* ansprachen. Daß *B. thuringiensis* als Erreger der Krankheit in Frage kommen könnte, ist jedoch weder anhand der Koch'schen Postulate noch durch andere pathologische Untersuchungen überprüft worden und somit nichts als ein unbewiesener Verdacht.



#### 4. Wirkung auf Entomophagen und Biozönose

Die Wirkung von *B. thuringiensis* auf Rote Waldameisen (*Formica rufa*-Gruppe) interessiert einerseits wegen der Möglichkeit, diese Raubinsekten direkt zur biologischen Bekämpfung von gewissen Forstschädlingen oder zur Steigerung der Waldhonigtracht anzusiedeln (Übersicht bei Franz 1961a). Andererseits sind auch die Naturkolonien schonenswert. Sie können zugleich als Indikator für eine Gesamtwirkung auf die Waldbiozönose dienen. — Lange (1966) konnte keine Wirkung von *B. thuringiensis* (Biospor) gegenüber *Formica polyctena* nachweisen: In Formicarien wurden Versuchsvölker (1 Königin plus 1500 Arbeiterinnen) behandelt, und zwar entweder durch Fütterung (mit einer Dosis von 2,5 ml/d einer Suspension von 0,02 g in 1 ml Honig-Sirup) oder durch Besprühen (mit 0,2 g/15 ml Wasser/0,1 m<sup>2</sup>). In den behandelten Völkern entwickelte sich im Vergleich zu den unbehandelten die Brut normal<sup>1</sup>). Die angebotenen Aufwandmengen lagen weit über den in der Praxis üblichen. — Nach Vorversuchen im Laboratorium behandelte Kneitz (1966) 20 Nester der Arten *Formica polyctena*, *Formica rufa* und *Formica pratensis/nigricans* im Freiland mit Aufwandmengen von 250 ml einer 0,2...0,4 %igen Suspension Biospor auf 5 m<sup>2</sup> bzw. 10...20 g Biospor- bzw. Bactospeine-Staub auf 5 m<sup>2</sup>. Im Verlauf von 4 Wochen konnten keinerlei Schädigungen an den Ameisen-Kolonien beobachtet werden.

Über die Unempfindlichkeit von Raupenparasiten wie Ichneumoniden (*Anilastus ebenius*), Braconiden (*Apanteles glomeratus*) und Pteromoliden (*Pteromalus puparum*) gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex berichteten Biliotti (1956) bzw. Isakova (1958). Nach Untersuchungen von Ayyar (1961) sind auch die Eulopide *Trichospilus pupivora*, die Braconiden *Apanteles* spec., *Microbracon* spec. und die Coccinellide *Scymnus* spec. unempfindlich.

Die Wirkung von *B. thuringiensis*-Präparaten (Biospor) auf die Apfelbaum-Biozönose wurde erstmals von Steiner (1960) geprüft<sup>2</sup>). — Neuere Untersuchungen hierüber veröffentlichten Oatman (1965) und Jacques (1965). Oatman behandelte Apfelbäume 7mal innerhalb einer Saison mit einer 0,2 %igen Suspension von *B. thuringiensis* (Thuricide WP). Der Versuch lief über 2 aufeinanderfolgende Jahre und die Beobachtung erstreckte sich über 10 Arten von schädlichen Arthropoden und 4 Gruppen nützlicher Insekten. Während die schädlichen Lepidopteren-Arten durch *B. thuringiensis* nachhaltig reduziert wurden, waren die Aphiden (*Aphis pomi*) etwas vermehrt. Die Aphiden-Räuber (Syrphidae, Chrysopidae, Coccinellidae) blieben jedoch zahlenmäßig unbeeinflusst. Während die phytophagen Milben, speziell *Panonychus ulmi*, zunahm, sank die Anzahl der räuberischen Milben (Phytoseiidae) ab. Diese Wirkung des verwendeten *B. thuringiensis*-Präparates auf die Milben ist noch nicht geklärt, wenn auch der Verf. dazu neigt, den beobachteten Effekt den Trägerstoffen im Präparat anzulasten.

Jacques brachte *B. thuringiensis* (Thuricide WP und Thuricide T 90) wiederholt (5- bis 7mal) in 4 aufeinanderfolgenden Jahren auf Apfelbäume aus. Die Konzentrationen betragen 0,1 % und 0,4 %. Registriert wurden in der Anlage 11 schädliche Arthropoden-Arten (darunter 6 Lepidopteren-Arten) und

<sup>1</sup>) bis auf zwei Fälle, in denen sich keine Brut entwickelte; diese „Ausreißer“ werden auf die Verwendung von zu alten Königinnen zurückgeführt.

<sup>2</sup>) ref. bei Krieger 1961.

7 Arten von Entomophagen. Als Folge der Behandlung traten die empfindlichen Lepidopteren-Arten merklich zurück. Von den anderen Arthropoden-Arten war die Raubwanze *Atractotomus mali* etwas reduziert, während eine andere Raubwanze, *Pilophorus perplexus*, und die Raubmilbe *Anystis agilis* etwas häufiger auf den *B. thuringiensis*-behandelten Flächen anzutreffen war als in den unbehandelten Kontrollen. Das Auftreten von phytophagen Milben wie z. B. *Panonychus ulmi* und *Bryobia arborea* kann als Indikator für die Aktivität räuberischer Arthropoden in der Apfelbaum-Biozönose benutzt werden. Der geringe Milbenbefall als solcher als auch der geringe Unterschied im Befall zwischen *B. thuringiensis*-behandelten Bäumen und unbehandelten deuten darauf hin, daß die Wirksamkeit der Prädatoren durch *B. thuringiensis* nicht eingeschränkt war. Jaques zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß *B. thuringiensis* keinen signifikanten Effekt auf die Nützlings-Fauna der Apfelbaum-Biozönose hatte und kommt zu ähnlichen Ergebnissen wie Steiner und Oatman.

Auch Franz und Mitarb. (1967) beobachteten keine nachteilige Wirkung auf die Nützlingsfauna bei einer großflächigen Anwendung von *B. thuringiensis*<sup>1)</sup> gegen *Tortrix viridana*: Die Garnitur von Puppenparasiten der Tortriciden, war im behandelten Gebiet die gleiche wie in der unbehandelten Kontrolle.

In diesem Zusammenhang sei auch die mögliche Funktion von Parasiten als Vektoren für *B. thuringiensis* erwähnt; näheres hierüber s. S. 80.

Neben diesen Untersuchungen über die Wirkung des Sporen-Endotoxin-Komplexes auf die Biozönose liegt neuerdings auch eine Arbeit von Burgerjon und Biache (1966 a) über die Wirkung des Exotoxins der var. *thuringiensis* auf eine Raubwanze vor. Den Autoren war es möglich, *Perillus bioculatus* 7 Tage lang an solchen Larven von *Leptinotarsa decemlineata* zu füttern, die infolge Exotoxin-Applikation im Absterben begriffen waren. Dieses Experiment überlebte *P. bioculatus* ungeschädigt. Das Versuchsergebnis demonstriert, daß Exotoxin trotz seines breiteren Wirtsspektrums nicht notwendigerweise über den Wirt auch auf Parasiten und Räuber schädlich wirken muß.

#### Zusammenfassung

Die Wirkung von *B. thuringiensis* auf Parasiten und Raubinsekten (einschließlich der *Formica rufa*-Gruppe) ist vernachlässigbar klein, so daß neben dem Einfluß der *B. thuringiensis*-Behandlung die volle Wirkung der natürlichen Feinde erhalten bleibt.

#### 5. Wirkung auf Wasser- und Bodenfauna

Doane und Hitchcock (1964) registrierten den Artenreichtum von Gewässern an Wasserinsekten vor und nach dem Ausbringen von *B. thuringiensis* (Thuricide 90 T) mittels Helikopter im Feldversuch. Die angewandten Dosen betragen etwa 2,5–10 l/ha. Von 35 aquatisch lebenden Arten (zugehörig den Ordnungen Isopoda, Odonata, Plecoptera, Megaloptera, Coleoptera, Trichoptera) waren im behandelten Gebiet nach einer Woche noch 24 Arten nachweisbar, in der unbehandelten Kontrolle 19 Arten. Hiernach kann von einem schädlichen Einfluß von *B. thuringiensis* auf aquatisch lebende Insekten nicht die Rede sein.

<sup>1)</sup> angewendet wurden 4 Präparate: Biospor 2802, Thuricide 90 T, Plantibac und Bactospeine, die in Dosen von max. 2 kg/ha bzw.  $130 \times 12^{12}$  Sporen/ha die Schädlingspopulation bis zu 80–90 % abtöteten.

Erstmals stellte White (1960) Versuche über die Wirkung von *B. thuringiensis* (Thuricide) auf Oligochäten (*Lumbricus terrestris*) an. Bei Dosen von etwa 3,6 kg/ha und 360 kg/ha erzielte der Autor innerhalb 7 Wochen weder eine auffallende Mortalität noch eine Veränderung im Verhalten. Im Gegenteil schien die Reproduktion in den behandelten Parzellen sogar noch etwas erhöht zu sein.

Erstaunlich war deshalb die Mitteilung von Smirnoff und HeimpeI (1961) über eine pathogene Wirkung von *B. thuringiensis* auf den Großen Regenwurm (*Lumbricus terrestris*). Bei extrem hohen Dosen (1...10 % Zumischung zum Substrat) beobachteten sie eine Septikämie als Folge der Applikation. Neuerdings (1966) wurde von HeimpeI auch *B. thuringiensis* aus Läsionen der „blister disease“ des Kleinen Regenwurms (*Eisenia foetida*) isoliert. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß *B. thuringiensis* hier als Erreger der Krankheit wirkt, da speziell die Koch'schen Postulate nicht erfüllt werden konnten.

Bei eigenen Untersuchungen (Krieg, unpubl.) wurde eine 0,2 %ige Suspension des Sporen-Endotoxin-Komplexes (Biospor) in der üblichen Anwendungskonzentration) benutzt: 0,2 l wurden in Bodenproben von 1,5 l eingeschwemmt, die je 45 Regenwürmer (*Eisenia foetida*) enthielten. Nach einmonatiger Versuchszeit konnte in dem Versuch keinerlei Mortalitätszunahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Befunden von White.

Neben Versuchen mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex liegen auch solche mit Exotoxin an Oligochäten vor: Benz (1966 b) konnte keinen Effekt gegenüber dem Bachröhrenwurm (*Tubifex tubifex*) nachweisen.

#### Zusammenfassung

Ein schädlicher Einfluß von *B. thuringiensis* auf die Fauna in natürlichen Gewässern und im Boden (Wasser-Arthropoden, Anneliden) konnte bisher nicht überzeugend nachgewiesen werden.

#### E. Prüfmethode zur Standardisierung von Präparaten

An Bekämpfungsmittel auf der Basis von *B. thuringiensis* müssen bestimmte Anforderungen bezüglich Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gestellt werden.

In den letzten Jahren wurde die Frage, welche Kriterien und Maßstäbe bei einer Standardisierung anzulegen seien, auf verschiedenen Symposien eingehend behandelt<sup>1)</sup>. Diese Erörterungen führten im wesentlichen zu dem Ergebnis, daß *B. thuringiensis*-Präparate vornehmlich nach ihrer Toxizität gegenüber empfindlichen Modell-Insekten zu beurteilen seien und zwar hinsichtlich der beiden wichtigsten Pathogenitätsfaktoren: Sporen-Endotoxin-Komplex und Exotoxin.

Diese Untersuchungen auf Hauptwirkung sollen aber ergänzt werden durch Prüfungen auf Nebenwirkungen. Der zusätzlichen Forderung, auch mikrobiologische Daten (wie Sporenzahl und Identität) zu bestimmen, liegen vor allem hygienische Gesichtspunkte zugrunde.

<sup>1)</sup> Symposium über die Prüfung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten, Paris — La Minière, 5. bis 7. März 1964.

International Symposium on the identification and assay of viruses and *Bacillus thuringiensis* used for insect control. London, 13. Juli 1964.

Second International Symposium on the standardisation of *Bacillus thuringiensis*. Wageningen, 7. September 1966.

## 1. Feststellung von Sporen- und Keimzahl

Die Festlegung von maximalen und minimalen Sporen-Konzentrationen muß sich nach der potentiellen Wirksamkeit des benutzten Bakterien-Stammes richten. Aus hygienischen Gründen dürfte die Höchstgrenze für den Sporengehalt eines Spritzmittels mit  $250 \times 10^9$  lebenden Sporen pro Gramm festzulegen sein. (Dies gilt für Präparate, die nach einer peroralen Dauerapplikation von  $10^8$  Sporen pro ml bei Bienen oder nach einer intraperitonealen Einzeldosis von  $10^6$  Sporen bei weißen Mäusen keine Schäden verursachen) (vgl. S. 55 bzw. S. 51).

Spritzmittel auf der Basis derzeit verfügbarer Stämme von *B. t.* var. *thurin-giensis* müssen andererseits mindestens  $25 \times 10^9$  lebende Sporen (und entsprechend viele Toxinkristalle) pro Gramm enthalten, um 0,1 oder 0,2 %ig angewendet, eine erfolgreiche Bekämpfung von empfindlichen Lepidopteren zu gewährleisten. Stäubemittel enthalten je Gewichtseinheit entsprechend weniger Sporen (z. B. 5 oder 10 %). In dem genannten Bereich von min.  $25 \times 10^9$  und max.  $250 \times 10^9$  Sporen/g liegen alle bisher von uns geprüften in- und ausländischen Industrie-Präparate (Spritzmittel).

Für die Bestimmung von Sporenzahl und Keimzahl sind möglichst homogene und stabile Suspensionen erforderlich, damit die Fehler beim Pipettieren (Verdünnen) möglichst gering sind. Probate Methoden, um dies zu erreichen, sind: Homogenisieren und Zusatz von unschädlichen Detergentien (z. B. Tween).

Die Bestimmung der Sporenzahl (total spore count) erfolgt mikroskopisch (zweckmäßigerweise im Phasenkontrast) unter Verwendung von Zählkammern (Hämocytometer) von  $0,100 \pm 0,001$  mm. Nach Untersuchungen von Cook und Lund (1962) sind die mit diesen Kammern erhaltenen Werte besser reproduzierbar als bei Verwendung von  $0,020 \pm 0,001$  mm-Kammern. Die auszählende Verdünnung soll so gewählt werden, daß die Sporen in den kleinsten Quadraten deutlich zählbar sind. Oft ist die Bestimmung der Gesamt-Sporenzahl in technischen Präparaten nicht möglich, da geformte Bestandteile anderer Art (z. B. des Trägermaterials) direkt oder indirekt (z. B. durch Adsorption oder Agglomeration) stören.

Der Tatsache, daß nicht alle Sporen zu keimen vermögen, sondern nur ein gewisser Prozentsatz, trägt die zusätzliche Bestimmung der Keimzahl (viable spore count) Rechnung. Ihre Bestimmung erfolgt entweder mit dem Platten-Verfahren (dilution plate method) oder mit dem Filter-Kultur-Verfahren. — Wird für das Ausplatten die sog. Schichtmethode verwendet, so gießt man auf eine untere erstarrte Agar-Schicht (2,5 %ig) in einer Petrischale eine obere zweite auf (1 %ig), mit der die Keimsuspension (1 ml) vorher vermischt wurde. — Beim Filter-Kultur-Verfahren werden auf die Oberfläche eines geeigneten Entkeimungsfilters (Membranfilter, millipore filter ggf. mit aufgedrucktem Gitternetz) die in der Verdünnung enthaltenen Keime durch (Saug-) Filtration angereichert. Dann wird das ansonsten sterile Filter in eine Petrischale auf diffundables Nährsubstrat (z. B. imbibierte Nährkarton-Scheibe) aufgelegt und bebrütet. Die Kolonien wachsen auf dem Filter an (vgl. Thon und Belling 1958). — Die Verdünnung der Ausgangssuspension soll in jedem Falle so gewählt werden, daß die Keime einzeln liegen und die aus ihnen hervorgehenden Kolonien deutlich zählbar sind (100...300 Kolonien/Schale). Zusatz eines Redox-Indikators (z. B. Tetrazoliumchlorid) erleichtert das Erkennen der Kolonien. Um eine Hemmwirkung zu vermeiden, soll die Endkonzentration des Redox-Indikators im Nährsubstrat nur 0,001 % betragen.

Über die statistische Auswertung der Ergebnisse von Sporen- und Keimzahl-Bestimmung siehe Cavalli-Sforza (1964).

Diese analytischen Methoden dürfen jedoch nicht mechanisch angewendet werden. Unzweckmäßige Lagerung oder Aufbereitung kann z. B. den Keimgehalt stark absinken lassen. Andererseits können Änderungen im Fabrikations-Verfahren (etwa eine Anreicherung von Endotoxin-Kristallen oder Belassen von sog. Exotoxin in der Aufbereitung) ebenfalls die Relation von Gehalt an lebenden Sporen und Wirkung beeinflussen.

Grundsätzlich muß außerdem darauf hingewiesen werden, daß (im Gegensatz zur Wirkung nach parenteraler Injektion) die Sporenzahl für die perorale Wirk-

samkeit verschiedener *B. thuringiensis*-Präparate auf Lepidopteren-Raupen kein adäquates Maß darstellt. Nur beim Vergleich identischer Präparate besteht eine solche Proportionalität zwischen Sporenzahl und Wirksamkeit. Diese Tatsache läßt sich daher umgekehrt für einen Nachweis der Wirkungsgleichheit von Referenzpräparat und Probe ausnutzen: Trägt man nämlich die Wirkungs-Indizes als Funktion der Sporenzahl graphisch auf, so liegen sie nur bei qualitativ gleichwertigen (homologen) Präparaten auf einer einzigen Geraden (M e c h a l a s and A n d e r s o n 1964).

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Obwohl die Sporen- und Keimzahl nicht ohne weiteres mit der in der Schädlingsbekämpfung vornehmlich genutzten Fraßgift-Wirkung des Endotoxins (oder auch des Exotoxins) korreliert werden kann, ist sie jedoch ein Maßstab für die zu erwartende Infektiosität des Sporenpräparates.

#### 2. P r ü f u n g a u f I d e n t i t ä t b z w . A u s s c h l u ß v o n F r e m d k e i m e n

Eine Gefahrenquelle für die Praxis besteht, wie bereits diskutiert, nicht etwa in einer möglichen Mutation von *B. thuringiensis* in eine wirbeltier-pathogene Art, sondern vielmehr in einer möglichen Infektion von Fermentern durch Fremdkeime. Deshalb dürfen von den Herstellern nur *B. thuringiensis*-Präparate aus Reinkulturen in den Handel gebracht werden. Zur Kontrolle dieser Forderung mußten Verfahren entwickelt werden, die eine Prüfung der lebensfähigen Keime in einem Präparat auf ihre Identität mit *B. thuringiensis* gestatten.

Eine besondere Schwierigkeit, die hier auftrat, war die Differenzierung von *B. thuringiensis* gegenüber dem ubiquitären *Bacillus cereus*. Es stehen zwar drei Verfahren zur Typendifferenzierung zur Verfügung: Die Analyse biochemischer Leistungen, die elektrophoretische Esterase-Analyse und die serologische Analyse. Leider eignen sich jedoch die beiden erstgenannten Verfahren nur zur Identifizierung monotypischer Isolate. Außerdem liegen noch keine ausreichenden Untersuchungen über die Verteilung brauchbarer biochemischer Unterscheidungsmerkmale bei verschiedenen Varietäten von *B. cereus* vor. Da aber (nach allem was wir bisher wissen) mit einem weitgehenden Parallelismus zwischen den biochemischen Eigenschaften von *B. cereus*- und *B. thuringiensis*-Varietäten zu rechnen ist, verlieren diese Techniken weiter an diagnostischem Wert.

Demgegenüber sind die Geißel-Antigene von *B. thuringiensis* typenspezifisch. Bei Anwendung des Röhrchen-Agglutinations-Tests sind heterologe und unspezifische Reaktionen minimal. Diese Methode ist aber höchst unpraktisch für eine Identifizierung von vielen Einzelkolonien auf einer Agarplatte. Die hierzu oft benutzte Objektträger-Agglutination ist aber unsicher, da Kolonien von *B. thuringiensis* Rauh-Charakter besitzen und deshalb zur Spontan-Agglutination neigen. Es wurde deshalb auf der Basis der von D e B a r j a c und B o n n e f o i (1962) inaugurierten serologischen Analyse der Geißel-Antigene (s. S. 16) eine mikroskopische Differenzierungs-Technik entwickelt, die es gestattet, auch in Bakterien-Mischpräparaten Zellen eines einzigen Serotyps von *B. thuringiensis* zu identifizieren (K r i e g 1965 a). Auf diese Weise ist es möglich, (nach Vorkultur) *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* nicht nur von *B. cereus*, sondern auch von anderen Varietäten des *B. thuringiensis* sicher abzutrennen. Es handelt sich bei dem von

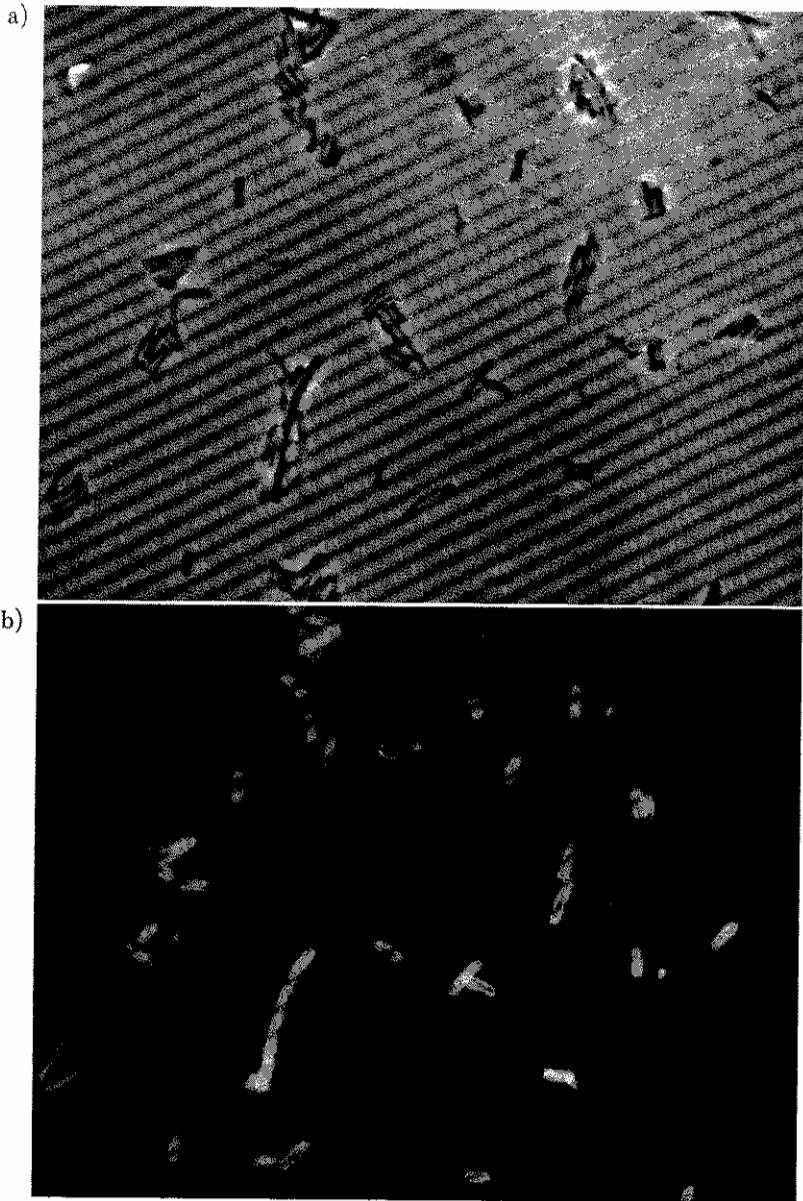


Abb. 3. Mischpräparat der Serotypen  $H_1$  und  $H_3$  mit indirekt markiertem Anti- $H_1$ -Serum behandelt

- a) Im Phasenkontrast: unspezifische Darstellung aller vegetativen Zellen  
 b) Im Fluoreszenzlicht: spezifische Darstellung der vegetativen Zellen des Serotyp 1  
 Abb.-Maßstab  $\sim 1250 : 1$

Krieg angewandten Verfahren um eine Kombination von Immunfluoreszenz- und Phasenkontrast-Technik (vgl. Abb. 3). Für die Immunfluoreszenz-Technik werden H-Antisera (von Kaninchen) benutzt, die indirekt mit Fluoreszeinisothiocyanat (gekoppelt an Anti-Kanin- $\gamma$ -Globulin vom Schaf) markiert sind.

Die von Penleton und Morrison (1966 a) eingeführte Identifizierung von *B. thuringiensis*-Stämmen durch Kristallantigen-Analyse hat für eine Differenzierung gegenüber *B. cereus* (da kein Kristallbildner) keine Bedeutung. Ob sie zu Identitätstesten innerhalb der Species *thuringiensis*, und zwar unterhalb des Varietäts-Spiegels, herangezogen werden wird, bleibt abzuwarten. Auch diese Methode (Gel-Präzipitation) eignet sich nur zur Identifizierung monotypischer Isolate, und zwar auch meist nur dann, wenn zuvor bereits eine Typisierung nach H-Antigenen und/oder Esterasemustern durchgeführt wurde.

Den Hygieniker interessiert neben der Identität aller Sporenbildner in einem Präparat mit *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* auch der Ausschluß von Fremdkeimen aus anderen Bakterien-Gruppen, speziell aus der Familie der Enterobacteriaceen.

*Escherichia coli* gilt als Indikator für faekale Verunreinigungen in der Wasserversorgung, und in die Genera *Shigella* (Ruhr) und *Salmonella* (Typhus-, Paratyphus-, Enteritis-Gruppe) gehören die wichtigsten Erreger von Darmerkrankungen bei Tier und Mensch. Zur Isolierung und Zählung dieser gram-negativen Bakterien im Plattenguß-Verfahren eignet sich Leifson-Nähragar, der einen Zusatz von 0,05 % Natriumdesoxycholat und 0,2 % Natriumacetat besitzt. Dieser Zusatz unterdrückt das Wachstum gram-positiver Bakterien einschließlich *B. thuringiensis*. Zweckmäßigerweise setzt man dem Agar noch Lactose und einen pH-Indikator zu, um *E. coli* sofort erkennen zu können: Bei Verwendung von Neutralrot wächst dieses Bakterium in deutlich roten Kolonien im Gegensatz zu den nicht lactosespaltenden Enterobacteriaceen, die farblose Kolonien bilden.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Ein wichtiger Punkt für die hygienische Sicherheit bei der Anwendung von *B. thuringiensis*-Präparaten in der Schädlingsbekämpfung ist der Nachweis der Identität aller lebenden Keime in den Präparaten mit *B. thuringiensis* bzw. der Ausschluß von Fremdkeimen. Brauchbare Methoden zur mikrobiologischen Identifizierung werden besprochen.

### 3. P r ü f u n g a u f H a u p t w i r k u n g

Sie bezieht sich auf die Wirksamkeit von *B. thuringiensis*-Präparaten gegenüber schädlichen Insekten und wird nicht regelmäßig an den Insekten ausgeführt, die bekämpft werden sollen, sondern an Modell-Insekten.

Die Wirkung eines Pathogens oder Toxins läßt sich als Dosis-Zeit-Funktion erfassen. Die graphische Darstellung dieser Beziehung erfordert ein 3-dimensionales Koordinatensystem. Wählt man zur Vereinfachung eine Parameter-Darstellung, so ergeben sich auf diese Weise 3 Typen von Wirkungskurven: Wirkungs-Zeit-Kurven (mit Dosis-Parameter), Wirkungs-Dosis-Kurven (mit Zeit-Parameter) und Zeit-Dosis-Kurven (mit Wirkungs-Parameter). Meist werden Wirkungs-Zeit-Kurven oder Wirkungs-Dosis-Kurven zum Pathogenitäts- oder Toxizitätsvergleich herangezogen. Durch Verwendung einer Ordinate, die nach dem G a u s s - Integral oder nach der Probit-Skala geteilt ist, gelingt es die sigmoiden Wirkungskurven in gerade Linien zu transformieren. Aus Umrechnungstabellen lassen sich die den Summenprozentwerten entsprechenden Ordinatenwerte entnehmen. Oft gelingt es jedoch nur dann eine Regressions-Gerade zu erhalten, wenn man auch noch die Abszisse nicht linear, sondern logarithmisch teilt. Den Einfluß der natürlichen Mortalität auf das Testergebnis wird meist nach der

Abbott'schen Formel korrigiert<sup>1)</sup>.— Obwohl es sicher die verlässlichste Methode ist, verschiedene Präparate nach ihren Regressions-Gleichungen zu beurteilen, ist es unter gewissen Voraussetzungen auch möglich, quantitative Vergleiche mit einer vereinfachten Prüfmethode durchzuführen, und zwar beispielsweise anhand von 50 %-Mortalitätswerten. Wiegand (1962) hat eine Klärung und z. T. eine Neudefinition der Begriffe  $LD_{50}$  und  $D_{50}$  einerseits sowie  $Lt_{50}$  und  $t_{50}$  andererseits vorgeschlagen<sup>2)</sup>. Hiernach ist die  $LD_{50}$  ein Maximalwert, die  $D_{50}$  dagegen der Wendepunkt einer Sigmoid-Kurve (mit dem Maximalwert 100 %). Entsprechendes gilt von den Zeitwerten. Der Vergleich von 50 %-Werten erfolgt zweckmäßigerweise anhand eines Wirkungs-Quotienten (Sun 1950, Wiegand 1962).

Eine 50 %-Beurteilung ist jedoch nur dann unanfechtbar, wenn die Anwendung der Präparate auch in diesem Bereich liegt. Liegt aber der Anwendungsbereich wie bei *B. thuringiensis* (und anderen nicht-persistenten Pathogenen<sup>3)</sup>) im 75 bis 100 %-Bereich, so lassen sich Präparate nur dann im 50 %-Bereich vergleichen, wenn sie komplett homolog sind, d. h. ihre Regressionsgeraden den gleichen Slope aufweisen. Nicht homologe Präparate erfahren bei 100 % Mortalität eine ganz andere Gütebeurteilung als bei 50 % Mortalität, wie folgendes Schema zeigt:

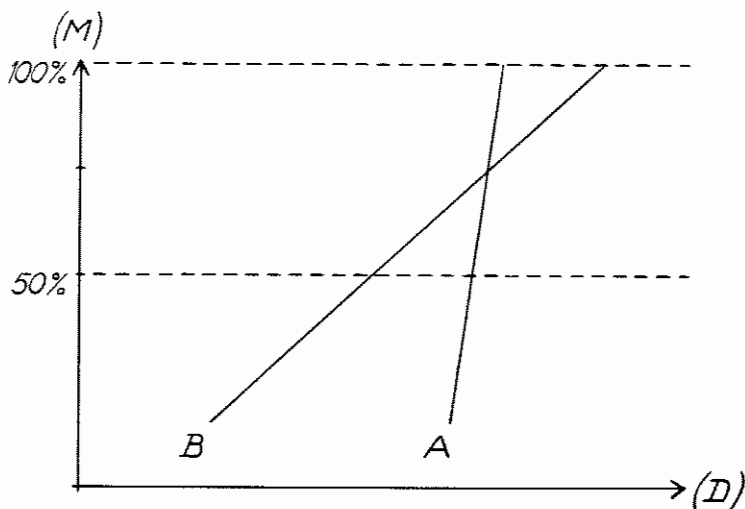


Abb. 4. Vergleich nicht-homologer Präparate im Dosis-Mortalitäts-Diagramm (durch Transformation der Koordinaten werden Regressionsgeraden erhalten)

Bei einer 50 %-Beurteilung erweist sich Präparat A schlechter als B. Bei der 100 %-Beurteilung dagegen ergibt sich, daß A hier besser wirkt als B.

Um zu einer praxisnahen Beurteilung zu kommen, die auch nicht-homologe Präparate einschließt, empfiehlt deshalb Wiegand (1966) neben 50 %-Werten

<sup>1)</sup> Die Grenzen dieses Korrektur-Verfahrens werden in einer Arbeit von Wiegand (1967) aufgezeigt.

<sup>2)</sup>  $D_{50}$  bedeutet die Dosis, die 50 %ige Mortalität bewirkt innerhalb einer bestimmten Zeit ( $t_{50}$ ).  $LD_{50}$  bedeutet dagegen 50 %ige Endmortalität (ohne Zeitparameter).

<sup>3)</sup> Unter biologisch nicht persistenten Insekten-Pathogenen werden solche verstanden, die sich in der Wirtspopulation nicht halten bzw. vermehren, sondern ihr wie ein Insektizid nachgeführt werden müssen.



auch noch 75 %-Werte miteinander zu vergleichen. Im folgenden Beispiel werden die Quotienten für 50 % und 75 % Mortalität für inkomplett homologe *B. thuringiensis*-Präparate verglichen:

	Biotrol BTB (var. <i>thuringiensis</i> )	Bathurin R-55 (var. <i>thuringiensis</i> )	Entobakterin-3 (var. <i>galleriae</i> )
(D <sub>50</sub> ; t <sub>50</sub> )	(als Standard =) 1 : 1	1 : 2,85	1 : 2,25
(D <sub>75</sub> ; t <sub>75</sub> )	(als Standard =) 1 : 1	1 : 3,09	1 : 1,92

(nach Wiegand 1966, verändert)

Einem Vergleich von Präparaten anhand des Schwellenwertes 100 % Mortalität steht z. Z. noch als Hauptschwierigkeit entgegen, daß sich (D<sub>100</sub>; t<sub>100</sub>)-Werte [im Gegensatz zu (D<sub>50</sub>; t<sub>50</sub>)-Werten] mit Hilfe der Probit-Funktion nur ungenügend genau kalkulieren lassen. Besser eignet sich hierfür (nach Wiegand 1966) die Arcus-Sinus p<sup>0,5</sup>-Funktion. Mit dieser Winkelfunktion dürfte eine Extrapolation der Regression auf 100 % Mortalität (= 90°) leicht möglich sein. In diesem Zusammenhang ist es nach Wiegand (1966) jedoch ratsam, die sog. Abbott-Korrektur durch die Bildung von Mortalitätsdifferenzen (zwischen der natürlichen und der zusätzlich durch Toxin-Wirkung bedingten) zu ersetzen.

Es sind neuerdings auch Anstrengungen unternommen worden, Biotests an *B. thuringiensis*-Präparaten unter Verwendung von Radioisotopen als Indikator durchzuführen (Maas-Geesteranus et al. 1967 sowie Rogers et al. 1967). Die Markierung erfolgte dabei nicht durch Einbau der Isotope in die wirksamen Bestandteile, sondern einfach durch Beimischung von P<sup>32</sup> zu den fertigen Präparaten. Auf diese Weise wurde es möglich, die Wirkung in Abhängigkeit von der individuell aufgenommenen Dosis zu bestimmen. Die Isotopen-Methode hat zweifellos gegenüber der photometrischen Fraßmessung Vorteile. Während letztere nur im Falle von flächig ausgebreitetem Substrat (Blätter) erfolgreich angewendet werden kann, eignet sich die Isotopen-Methode auch zur Fraßmessung in voluminösem Substrat. Ob und in welcher Form diese Methode Eingang in routinemäßige Biotest-Serien finden wird, kann noch nicht beurteilt werden.

#### a) „Absolute“ Wirksamkeits-Bestimmung

Ähnlich wie in der Digitalis-Standardisierung zwei Wege beschritten worden sind [(a) Bestimmung des Wirkungsgrades mittels „Frosch-Einheiten“ und (b) Vergleich mit einem konventionellen Standardpräparat von 1 Internat. Digitalis-Einheit/0,1 g], so existieren diese Alternativen auch prinzipiell für die Wirksamkeitsbeurteilung von *B. thuringiensis*-Toxinen.

1961 hat Krieg vorgeschlagen, absolut definierte „Pieris-Einheiten“ für die Wirksamkeits-Bestimmung des Sporen-Endotoxin-Komplexes einzuführen. Mit Hilfe solcher oder entsprechender spezifischer Einheiten ist es grundsätzlich möglich, die Wirksamkeit von *B. thuringiensis*-Präparaten unabhängig von jeglichem Internationalen Standard zu bestimmen.

Wiegand hat (1966) neben der von Krieg vorgeschlagenen „Pieris-Einheit“ P<sub>50/3</sub> (50 % Mortalität nach 3 Tagen) aus bereits genannten Gründen noch eine „Pieris-Einheit“ P<sub>75/2</sub> (75 % Mortalität nach 2 Tagen) in seinen Wirksamkeits-Testen verwendet. Die folgende Zusammenstellung führt die Konzen-

trationswerte (umgerechnet in  $\gamma/100$  ml) für beide Einheiten bei 3 Präparaten an:

	Biotrol BTB (var. <i>thuringiensis</i> )	Bathurin R-55 (var. <i>thuringiensis</i> )	Entobacterin-3 (var. <i>galleriae</i> )
PE <sub>50/3</sub>	2,77	1,056	6,216
PE <sub>75/2</sub>	172,5	35,—	331,25

(nach Wiegand 1966, verändert)

Im Gegensatz zu den willkürlichen Einheiten, die zur relativen Wirksamkeits-Bestimmung benutzt werden (siehe b), sind die spezifischen Einheiten der Absolutmessung von der Empfindlichkeit des Wirtes funktionell abhängig. Da diese aber nicht nur bei verschiedenen Stämmen (Genotypen) verschiedene Werte annehmen kann, sondern auch von Generation zu Generation u. U. erheblich fluktuiert, hat die Methode der Absolut-Messung z. Z. noch mit großen praktischen Schwierigkeiten zu kämpfen. Erst das Vorhandensein homogener Versuchstier-Populationen und die experimentelle Überwindung physiologisch bedingter Empfindlichkeits-Schwankungen wird diese Methode der relativen Wirksamkeitsbestimmung ebenbürtig machen.

#### b) Relative Wirksamkeitsbestimmung

Soweit die Prüfung von *B. thuringiensis*-Präparaten als Wirksamkeitsvergleich mit einem Standardpräparat erfolgt, kann man ein von der aktuellen Empfindlichkeit des Tiermaterials unabhängiges Testergebnis erhalten. Eine zusammenfassende Darstellung dieses Verfahrens hat u. a. Krieg (1965 b) gegeben.

Für Wirksamkeitsangaben ist es letzten Endes gleichgültig, ob man hierfür einfach das Wirksamkeitsverhältnis (potency ratio), entsprechende Index-Werte (Sun 1950, Wiegand 1962) oder entsprechende willkürliche Einheiten (Burgerjon 1962) benutzt. Ausgehend von dem Wirksamkeitsquotienten erhält man durch Multiplikation mit 100 den entsprechenden Wirksamkeitsindex des Testpräparates nach Sun. Durch Multiplikation mit der Anzahl konventioneller (d. h. willkürlicher) Einheiten pro Gewichtseinheit Standard schließlich wird die Wirksamkeit des Testpräparates in Einheiten/Gewichtseinheit ausgedrückt. Die Verwendung konventioneller Einheiten setzt jedoch die Anerkennung von (internationalen) Standard-Referenzpräparaten (kurz Standardpräparate genannt) voraus, die homolog, stabil und reproduzierbar sein müssen.

Auf dem 2. Internationalen Symposium über die Standardisierung von *B. thuringiensis*-Präparaten (Wageningen 1966) wurde empfohlen, vorerst das Präparat E-61 [Institut Pasteur] als Standard für den Sporen-Endotoxin-Komplex von *B. t.* var. *thuringiensis* zu benutzen. Ein Exotoxin-Standardpräparat (*B. t.* var. *thuringiensis* [Institut Pasteur]) ist in Vorbereitung (Bonnefoi, pers. Mittlg.).

Die Wirkung soll anhand eines Vergleiches (potency ratio) durchgeführt und das Ergebnis in Einheiten/g angegeben werden. Da der Index von Sun alles Wissenswerte über das Testergebnis aussagt und da er am besten in Prozentwerten angegeben wird, besteht bei der Festlegung von 100 Einheiten pro Gramm Standardpräparat (Burgess 1966) auch eine zahlenmäßige Übereinstimmung, also:

$$\text{Wirksamkeit des Testpräparates} = \frac{\text{Effekt des Standards}}{\text{Effekt des Testpräparates}} \times 100 \text{ [Einheiten/g]}$$

Demgegenüber wurden von Burgerjon (1962) für das Standard-Präparat E-61 [Institut Pasteur] 1000 UT/mg festgelegt. 100 Einheiten (units) von Burges entsprechen also  $10^6$  UT von Burgerjon. Eine einfache Maßzahl für die Güte von Wirksamkeitsvergleichen (potency ratios) ist der Quotient zwischen oberer und unterer Konfidenzgrenze (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,5\%$ ). Der Quotient sollte möglichst keine Werte über 3 annehmen. Zur Zeit liegen die besten Werte für den Sporen-Endotoxin-Komplex im *Anagasta kühniella*-Test unter 1,5 (Burges et al. 1967).

Schwierigkeiten für eine sinnvolle Standardisierung können dadurch auftreten, daß Standard und Testpräparat bezüglich ihrer Wirkung nur unvollständig homolog sind. Das kann der Fall sein, wenn Präparate auf der Basis verschiedener Varietäten (bzw. Genotypen) miteinander verglichen werden. Per definitionem (s. o.) besitzt der Standard E-61 (*B. t.* var. *thuringiensis*)  $1,0 \times 10^3$  UT/mg für alle Testinsekten. Vergleicht man mit ihm ein homologes Präparat z. B. Bakthane (*B. t.* var. *thuringiensis*), so wird der Test auch bei Verwendung verschiedener Testtiere vergleichbare Ergebnisse liefern, z. B.  $0,3 \times 10^3$  UT/mg getestet mit *Anagasta kühniella* und  $1,1 \times 10^3$  UT/mg getestet mit *Galleria mellonella*. Vergleicht man hingegen mit dem Standard E-61 (*B. t.* var. *thuringiensis*) ein inkomplett homologes Präparat wie z. B. Thuricide S 4-275 (*B. t.* var. *gal-leriae!*), so werden für den Probanden erhebliche Wirkungs-Unterschiede gefunden, z. B.  $3,6 \times 10^3$  UT/mg getestet mit *Anagasta kühniella* und  $89,3 \times 10^3$  UT/mg getestet mit *Galleria mellonella* (Burges 1967 b). Das bedeutet, daß „Anagasta“-Einheiten nur dann mit „Galleria“-Einheiten identisch sind, wenn ein Präparat mit einem homologen Standard verglichen wird. Zur Vereinfachung der Verhältnisse empfiehlt es sich daher, nur komplett homologe Präparate zum Wirksamkeitsvergleich heranzuziehen (adäquater Vergleich). Hierfür sprechen auch auswertungs-statistische Überlegungen; denn nach den bisher angewandten Auswertungsmethoden ( $D_{50}$ ;  $t_{50}$ ) sind nur Regressions-Geraden von gleichem Slope exakt miteinander vergleichbar (s. S. 64).

Tab. 7. Modell-Insekten für Prüfung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten auf Hauptwirkung

a) Sporen-Endotoxin-Prüfung (peroral)

Wirt (Larven)	Literatur
<i>Lepidoptera</i> :	
<i>Anagasta kühniella</i>	Yamvrias 1962
<i>Bombyx mori</i>	Aizawa and Sato 1961
<i>Estigmene acrea</i>	Fisher 1963, Mechalas and Anderson 1964
<i>Galleria mellonella</i>	Švecova and Zurabova 1966 b, Burges 1966 b
<i>Hyponomeuta malinellus</i>	Wiegand 1960
<i>Pieris brassicae</i>	Burgerjon 1959, 1962, 1965
<i>Plodia interpunctella</i>	Burges 1964
<i>Plutella maculipennis</i>	Menn 1960, Sicker 1965
<i>Trichoplusia ni</i>	Splittstoesser and McEwen 1961

## b) Exotoxin-Prüfung (peroral)

Wirt (Larven)	Literatur
L e p i d o p t e r a :	
<i>Barathra brassicae</i>	Burgerjon et De Barjac 1964
<i>Plutella maculipennis</i>	Sicker und Krieg 1966
D i p t e r a :	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Benz 1966 b, Krieg 1966
<i>Musca domestica</i>	Cantwell et al. 1964 a

Eine Zusammenstellung bewährter Modell-Insekten für den Test des Sporen-Endotoxin-Komplexes und des Exotoxins bringt die Tabelle 7. Einige dieser Tests seien kurz beschrieben:

- a 1) Prüfung des Sporen-Endotoxin-Komplexes an *Anagasta kühniella*: 1 g Weizenmehl wird mit 0,2 ml wäßriger Präparatverdünnung<sup>1)</sup> angerührt und dieser Brei in einer Petrischale ausgestrichen. Anschließend wird das Material unter vermindertem Druck (200...400 mm Hg) bei etwa 25° C getrocknet. Jede Petrischale wird mit je 25 Eilarven von *A. kühniella* besetzt. Nur wenige Stunden alte Larven werden verwendet. Einem Entweichen der Raupen kann dadurch vorgebeugt werden, daß man ein sie überdeckendes Uhrgläschen fest in das Substrat eindrückt. Die Mortalität wird nach bestimmten Zeitabständen (z. B. 48 h) abgelesen. Versuchstemperatur 25° C.
- a 2) Prüfung des Sporen-Endotoxin-Komplexes an *Plutella maculipennis*: Blätter vom Chinakohl (*Brassica pekinensis*) werden mit einer bestimmten Präparat-Verdünnung unter konstanten Bedingungen beiderseitig besprüht<sup>2)</sup> oder in die Verdünnung getaucht (weniger zu empfehlen). 1 bis 2 Blätter kommen in je eine Neubauer-Schale (oder größere Petrischale) und werden mit 30 frischgehäuteten L<sub>3</sub>-Larven (die zuvor 6 h gehungert haben) besetzt. Die Mortalität wird nach bestimmten Zeitabständen (z. B. 72 h) abgelesen. Versuchstemperatur 20° C; relative Luftfeuchtigkeit 70...90 %; Dauerbeleuchtung.
- b 1) Prüfung des Exotoxins an *Plutella maculipennis*: Die Raupen dieser Art eignen sich auch zum Test auf Exotoxin. Da das Endotoxin im Gegensatz zum Exotoxin hitzelabil ist, testet man die Endotoxin-Wirkung an einem nativen Präparat (s. o.), die Exotoxin-Wirkung dagegen an einer autoklavierten Probe. Im letzten Falle wird die Endmortalität registriert (übrige Versuchsbedingungen wie unter a 2).
- b 2) Prüfung des Exotoxins an *Drosophila melanogaster*: Zu diesem Test dienen *D. melanogaster*-Larven, die sich auf einem künstlichen Medium (u. a. bestehend aus Maismehl, Rübensirup, Agar und Wasser) in Glasbechern entwickeln. In den Versuchs-Ansätzen wird das Wasser des Standard-Mediums jeweils durch Exotoxin-Verdünnung ersetzt. Gleichzeitig im Präparat anwesender Sporen-Endotoxin-Komplex stört nicht, da *D. melanogaster* ihm gegenüber unempfindlich ist. Eingesetzt werden pro Becher 20 frisch abgelegte Eier. Die Endmortalität ergibt sich aus der Differenz zwischen der Anzahl angesetzter Eier und der geschlüpften Imagines. Versuchstemperatur 20° C.

Im Sinne einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte für den Bioassay eine Temperaturkonstanz von möglichst  $\pm 1^\circ \text{C}$  gefordert werden (Thermostat). Bei der t-Auswertung wird das Datenmaterial direkt durch die Temperatur beeinflusst, bei der D-Auswertung nimmt die Temperatur formal Einfluß über den t-Parameter. — Obwohl meist die Mortalität als Wirkungskriterium für den Biotest verwendet wird, ist es auch möglich, die Wirkungsweise auf andere Art zu messen, z. B. beim Test auf Endotoxin durch Messung der Fraßreduktion (Burgerjon 1962, 1965).

<sup>1)</sup> Gleichzeitige Anwesenheit von Exotoxin im Präparat stört kaum, weil das Endotoxin ein schnelles Absterben der Tiere bewirkt, während sich die Exotoxin-Wirkung frühestens bei der nächsten Häutung manifestiert.

<sup>2)</sup> Geeignete Sprühapparaturen wurden von Burgerjon (1956) und Herfs (1963) beschrieben.

### Zusammenfassung

Die Prüfung auf Hauptwirkung an Modell-Insekten im Biotest (bioassay) erstreckt sich einmal auf den Sporen-Endotoxin-Komplex (vgl. Tab. 7 a). Da einer absoluten Wirksamkeitsbestimmung noch erhebliche Schwierigkeiten, besonders durch Inhomogenität des Testtier-Materials bedingt, entgegenstehen, wird zur Zeit die relative Wirksamkeitsbestimmung durch Vergleich mit Standard-Präparaten bevorzugt. Eine einfache und meist auch ausreichende Maßzahl für die Güte einer Probe ist der Wirkungsindex nach Sun. Andere Möglichkeiten sind Angaben in konventionellen Einheiten pro Gewichtseinheit; einem Sun-schen Index = 100 entsprechen 100 units/g (Burges) bzw. 1000 UT/mg (Burgerjon) im Vergleich mit einem internationalen Standardpräparat (E-61; Basis: *B. t.* var. *thuringiensis*). Diese Methoden lassen sich sinngemäß auch auf eine Prüfung von Exotoxin im Biotest (vgl. Tab. 7 b) übertragen. Die derzeitig praktizierten Auswertemethoden gestatten allerdings nur einen exakten Wirksamkeitsvergleich von homologen, d. h. qualitativ gleichwertigen Präparaten.

#### 4. Prüfung auf Nebenwirkungen

Während die Biotests auf Hauptwirkung meist als Toxizitätsvergleich laufen, wurden für die Tests auf Nebenwirkungen absolute Sicherheitsgrenzen hinsichtlich Toxizität bzw. Pathogenität festgelegt, die nicht überschritten werden dürfen.

##### a) Test an Mäusen (*Mus musculus*)

Die Sicherheitsprüfung gegenüber Säugetieren umfaßt einen Modell-Test an weißen Mäusen, wie er von dem U.S. Department of Agriculture ausgearbeitet wurde:

5 Laboratoriumsmäuse (17...23 g) erhalten eine Einzeldosis entsprechend  $10^8$  Sporen/Tier subkutan injiziert. In der sich an diese Injektion anschließenden Beobachtungszeit von 7 Tagen dürfen die Tiere keine Reaktion an der Injektionsstelle oder gar Zeichen einer allgemeinen Infektion zeigen (Harvey 1960).

##### b) Test an Bienen (*Apis mellifera*)

Für die Prüfung gelten die Richtlinien für Laboratoriumsuntersuchungen, welche vom „Arbeitskreis für die Beurteilung der Einwirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Bienen“ ausgearbeitet worden sind (vgl. Stute 1963):

Bienen werden vor dem Flugloch abgefangen und zu je 10 in genormte Kästchen gegeben. In jeden Versuch kommen 30 Bienen. Als Futter dient 50 %ige Zuckerlösung. 20...25° C Versuchstemperatur und ca. 40 % relative Luftfeuchtigkeit (Brutschrank).

Da *B. thuringiensis* keine Kontaktgift- und Atemgift-Wirkung besitzt, kann sich die Prüfung auf Fraßgiftwirkung beschränken. Zur Beurteilung wird bei einer Beobachtungszeit von  $t = 24$  Std die  $D_{50}$  benutzt. Die Applikation erfolgt durch Einzelfütterung mit 0,01 ml-Suspension (ggf. Bienen vorher hungern lassen). Die Test-Suspension wird zweckmäßigerweise 1 %ig verfüttert, d. i. unter den genannten Versuchsbedingungen 0,1 mg/Biene. Größere Mengen oder höhere Konzentrationen werden nicht verfüttert. Das Präparat gilt als Bienen-unschädlich, wenn seine perorale  $D_{50} > 0,1$  mg/Biene ist.

### Zusammenfassung

Der Prüfung auf Nebenwirkung sind absolute Sicherheitsgrenzen zugrundegelegt:  $10^6$  Sporen werden pro Maus injiziert; Bienen wird 0,1 mg Präparat pro Tier verfüttert. Diese Dosen müssen symptomlos vertragen werden.

## F. Die Anwendung von *B. thuringiensis* in der Schädlingsbekämpfung

### 1. Herstellung von *B. thuringiensis*-Präparaten

#### a) Produktion

Die Wirtschaftlichkeit des Einsatzes von *B. thuringiensis*-Präparaten hängt weitgehend von den Präparatkosten ab<sup>1)</sup>. Diese werden u.a. bestimmt von dem Vorhandensein von Fermentations-Anlagen, der Höhe ihrer Betriebskosten, der Wahl des zu verwendenden Nährsubstrats, der Ausbeute des Ansatzes und dem Besitz von Stämmen hoher Virulenz. Für die Massenkultur von *B. thuringiensis* wird heute fast durchweg das Tankverfahren verwendet bei nicht-kontinuierlichem Produktionsprozeß (sog. batch-Verfahren). Abb. 5 gibt eine schematische Darstellung dieses Verfahrens wieder.

Die Verfahrenstechnik ist z. T. patentiert. Das Nährsubstrat enthält neben geeigneten C- und N-Quellen Wachstumsstoffe und Spurenelemente (V a n k o v á a W e i s e r 1962, B o n n e f o i 1960, Z u r a b o v a 1960, B r i g g s 1963, Č e r n o v 1965). Ausgehend von dem halbsynthetischen Nährboden von L e m o i g n e und Mitarb. (1956) (enthaltend  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ , Pepton und Saccharose) hat Z u r a b o v a (1963) den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen von Pepton und Saccharose auf die Fermentationsprodukte bei *B. t.* var. *galleriae* untersucht. Optimal erwies sich in Submerskulturen eine Peptonkonzentration von 0,5–2,0 ‰ und eine Saccharose-Konzentration von 2,0–3,0 ‰. Die optimalen physikalischen Daten waren: pH 6,0–7,2, Temperatur von 29–30 °C und Belüftung 0,8–1,0 l/min pro 1 l Substrat. Diese Werte stimmen gut überein mit denen anderer Autoren wie z. B. V a n k o v á (1958). Sie hatte empfohlen: 0,75 ‰ Pepton, 2–8 ‰ gärfähiges Kohlehydrat, pH 7,0, Temperatur 29–30 °C und Belüftung 0,5 l/min pro 1 l Substrat. Allerdings hatte V a n k o v á noch 2 ‰ Hefeautolysat ihrem Nährsubstrat zugesetzt. — D r a k e und S m y t h e (1963) empfehlen als brauchbares Nährsubstrat für die Submerskultur u. a. Maisstärke 6,8 ‰, Rohrzucker 0,64 ‰, Casein 1,94 ‰, Corn steep liquor 4,70 ‰, Hefe 0,60 ‰ und Phosphatpuffer 0,60 ‰.

Die Impfsuspension soll 1,5–2,5 ‰ des Volumens des Nährsubstrats betragen; dies bedeutet eine stufenweise Erhöhung des Fermentervolumens. — Bei 29–30 °C kann unter sonst günstigen Bedingungen der Fermentationsprozeß, d. h. Sporulation und Kristallbildung, nach 30–60 Std. beendet sein. Zur Verhinderung von Schaumbildung eignet sich z. B. ein Zusatz von Silikon-Öl. Die Ausbeute an solidem Material im Fermentationsgut beträgt im allgemeinen < 1 ‰. — Um eine Abtrennung der soliden Anteile (Sporen plus Endotoxinkristalle) von dem Kulturmedium (das ggf. noch Exotoxin enthält) zu erreichen, bedient man sich der Entkeimungsfiltration (Kieselgur-Filter) oder der Zentrifugation (Separator). Eine Trocknung des feuchtnassen Rohpräparates erfolgt zweckmäßigerweise im Vakuum oder durch Zusatz inerte wasserabsorbierender Stoffe (z. B. Bentonit). Ist dagegen keine Trennung in Fraktionen erwünscht, so kann das Fermentationsgut auch mittels Sprühverdampfer aufgearbeitet werden.

Eine andere Produktionsmethode als das Submers-Verfahren hat M e c h a l a s (1963) entwickelt. Hierbei wird das infizierte halbfeste Substrat mit Trägerstoff in einer Gärkammer inkubiert und durch ein Diaphragma von einer unterhalb

<sup>1)</sup> Sie liegen z. Z. bei 20–40 DM/kg für Spritzpulver und 3–6 DM/kg für 10 ‰iges Stäubemittel.

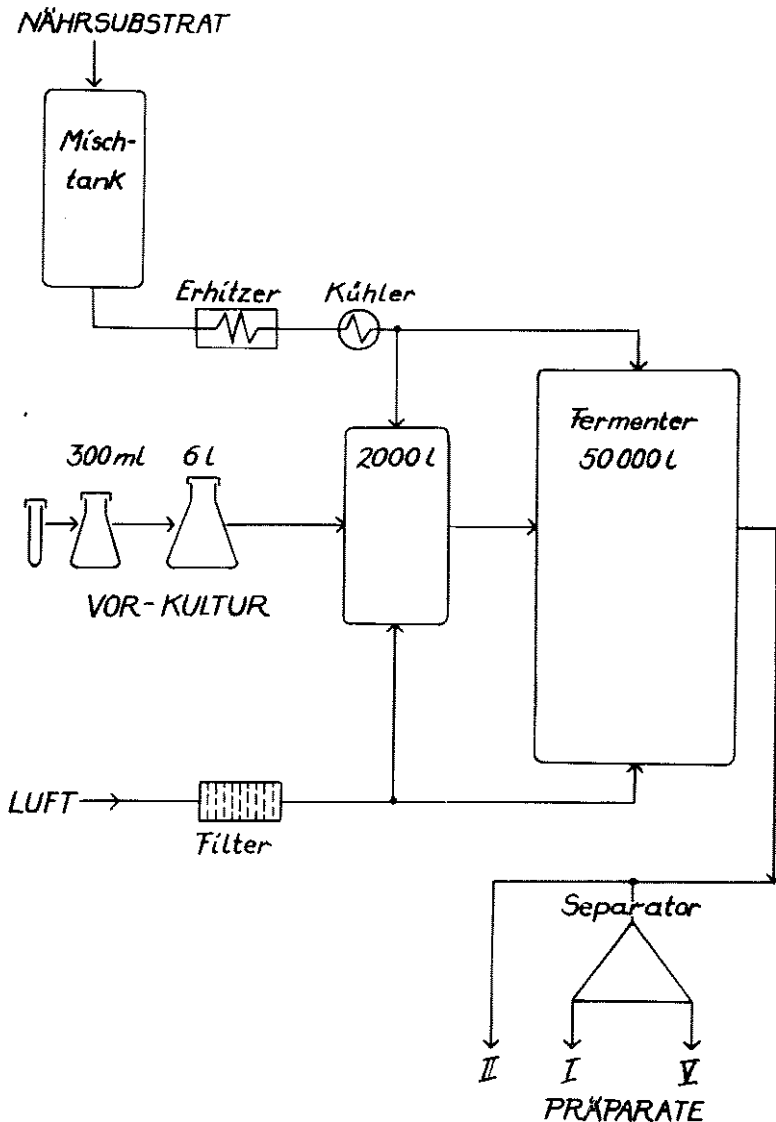


Abb. 5. Produktion technischer Präparate von *B. thuringiensis*  
(Submers-Verfahren)  
(nach Briggs 1960 b, verändert)

der Gärkammer gelegenen Luftkammer aus belüftet. Lufttemperatur und Luftfeuchtigkeit werden während des Fermentationsprozesses durch Rückkoppelung (feed back) konstant gehalten. Eine Vorkultur erfolgt zunächst in 500 ml-Flaschen und dann in einem 400 lt-Fermenter in Submerskultur. Das Medium hierzu enthält 97 % Wasser, 1,5 % Rohrzucker, 0,5 % Corn steep liquor, 0,5 % Hefeautolysat und 0,4 %  $K_2HPO_1$  (auf pH 7,2 mit NaOH eingestellt). Zur Haupt-

Fermentation wird folgendes halb feste Medium (ca. 1000 kg) als Nährkammerfüllung (das mit 400 lt Vorkultur beimpft wird) empfohlen: 37 % expandierter Perlit (inertes Trägerstoff), 53 % Weizen-Kleie, 6 % Sojabohnen-Mehl, 3,52 % Rohrzucker, 0,35 % Kalk, 0,088 % NaCl, 0,023 % CaCl<sub>2</sub> und 160 l Wasser. Die Lufterneuerung beträgt anfänglich 0,4–0,6 l/min pro 1 l Substrat und später 1,0–1,2 l/min. Die relative Luftfeuchte des Luftstromes ist auf 95–100 % eingestellt, die Temperatur auf 30–34° C. Das pH des Nährsubstrates beträgt anfangs etwa 6,9 und steigt im Verlauf des Fermentationsprozesses auf etwa 7,5 an. Durch Einblasen von Trockenluft von 50–55° C wird der Fermentationsprozeß (nach etwa 36 Std.) beendet und anschließend der Inhalt der Gärkammer zum Endprodukt zermahlen. Diese Methode gestattet nicht die Herstellung verschiedener Fraktionen.

Burgerjon (1964) hat zur Charakterisierung technischer Präparate vorgeschlagen, Qualitätstypen einzuführen. Die wichtigsten sind: I = Endotoxin-Sporen-Komplex, II = Endotoxin-Sporen-Komplex plus Exotoxin, V = Exotoxin.

Vor der Weiterverarbeitung werden die technischen Konzentrate standardisiert, d. h. ihre mikrobiologischen und toxikologischen Daten ermittelt (s. Abschn. E). Sie stellen die Unterlagen für den Formulierungs-Prozeß dar.

#### b) Formulierung

Der erste Schritt in der Verarbeitung des Fermentationsgutes zum fertigen Mittel besteht darin, daß das hinsichtlich seiner biologischen Aktivität getestete technische Konzentrat durch Verdünnen bzw. Strecken (mit inertem Material) auf eine bestimmte Endaktivität eingestellt wird.

Neben den biologischen Qualitäten sind jedoch auch die physikalischen Eigenschaften eines Mittels wichtig für seine erfolgreiche Applikation. Das gilt vor allem für die Homogenität und Suspendierbarkeit (vgl. Herfs und Krieg 1963) sowie für die Netzfähigkeit und Haftfähigkeit (vgl. Burgerjon 1964). Soweit die Rohpräparate diese Eigenschaften noch nicht in ausreichendem Maße besitzen, können sie durch mechanische Bearbeitung (Vorsicht vor zu starker Erwärmung!) und Zusätze von Chemikalien bei der Formulierung entscheidend verbessert werden.

Methoden zur Prüfung der physikalischen Eigenschaften von Insektiziden wurden durch das "Chemical Pesticides Analytical Committee" (CPAC) ausgearbeitet und in den "FAO Plant Protection Bulletin" veröffentlicht. Diese Techniken sind auch anwendbar auf mikrobiologische Präparate wie *B. thuringiensis*, wobei die Bestimmung der Sporenzahl und/oder des Toxingehalts (mittels Biotest) im Überstand oder im Rückstand als Indikator dienen kann, falls volumetrische oder gravimetrische Messungen nicht zu brauchbaren Ergebnissen führen.

*B. thuringiensis*-Präparate können als Flüssigkeit (z. B. stabilisierte Öl-Wasser-Emulsion) oder als Pulver formuliert werden. Ihre Anwendungsformen in der Praxis sind Spritzbrühen (hergestellt am Einsatzort durch Suspension eines Spritzpulvers (wetable powder) oder Verdünnung eines flüssigen Spritzmittels (flowable) in Wasser) bzw. (anwendungsfertig gelieferter) Haftstaub (dust).

#### c) Stabilität

Es ist bekannt (Steinhaus 1960, Heitor 1961), daß Trocken-Präparate von *B. thuringiensis* über 10 Jahre lang haltbar sind. Neuerdings hat Burgerjon (1966) den Verlauf des Wirkungstiters beim Standard-Präparat E-61 verfolgt und dabei innerhalb von 5 Jahren keine signifikante Änderung feststellen



können. Wichtig ist in jedem Falle eine kühle und trockene Lagerung des Präparates und Schutz vor Inaktivierung durch Chemikalien oder Strahlung (s. S. 10). Über die Stabilität von flüssigen Präparaten liegen allerdings noch keine so langfristigen Beobachtungen vor.

### Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Produktion von *B. thuringiensis*-Präparaten erfolgt heute meist im Tank-Verfahren (Abb. 5), und zwar in einfachen künstlichen Nährmedien bei reichlicher Belüftung. Die Wahl des Nährsubstrates beeinflusst die biologische Qualität (Toxizität) des Fermentationsgutes. — Durch den Formulierungsprozeß wird das Präparat auf eine bestimmte biologische Aktivität (Titer) eingestellt und seine physikalischen Eigenschaften (Homogenität, Suspendierbarkeit, Netzfähigkeit, Haftfähigkeit usw.) verbessert. Geeignet aufbereitete und gelagerte Präparate sind lange (10 Jahre) haltbar.

### 2. Z u l a s s u n g , A n e r k e n n u n g u n d K e n n z e i c h n u n g

Die Kommission für Insektenpathologie der O.I.L.B.<sup>1)</sup> hat 1964 eine weltweite Umfrage angestellt, um eine Übersicht darüber zu gewinnen, wie die Zulassung von bakterienhaltigen Schädlingsbekämpfungsmitteln in verschiedenen Staaten geregelt ist.

In der Bundesrepublik Deutschland besteht z. Z. weder ein Zulassungs- noch ein Anerkennungszwang für Pflanzenschutzmittel (s. aber D 1). Das in Vorbereitung befindliche neue Pflanzenschutzgesetz, das neben der Sicherstellung eines umfassenden Pflanzenschutzes auch einen verbesserten Schutz der Gesundheit von Mensch, Haustier und Biozönose gewährleisten soll, wird jedoch klare Vorschriften über die Kennzeichnung von Pflanzenschutzmitteln sowie eine amtliche Prüfung und Zulassung enthalten (L e i b 1965).

Gegenwärtig wird eine Anerkennung für *B. thuringiensis*-Präparate von der Biologischen Bundesanstalt dann ausgesprochen, wenn die biologische Wirksamkeitsprüfung (Vor- und Hauptprüfung) mit Erfolg durchgeführt, die Unschädlichkeit des Präparates durch eine amtliche Prüfung erwiesen ist, und wenn der Hersteller sich zu folgenden Auflagen verpflichtet:

1. das Präparat nur aus Reinkulturen von *B. thuringiensis* herzustellen, die frei sind von säugerpathogenen Mikroorganismen,
2. das Präparat stets von gleicher Wirksamkeit und mit einem gleichbleibenden Mindest- und Höchstgehalt an Sporen je Gramm Präparat herzustellen,
3. das Präparat nur in der anerkannten Konzentration und Aufwandmenge und gegen die in die Anerkennung einbezogenen Schädlinge zu empfehlen.

Die für ein Anerkennungsverfahren wichtigen Vorprüfungen des Präparates bestehen demnach im wesentlichen aus den unter E angeführten Tests (vgl. S. 59 ff.).

- a) Feststellung der Sporen bzw. Keimzahl
- b) Prüfung auf Identität bzw. Ausschluß von Fremdkeimen
- c) Prüfung auf Hauptwirkung gegenüber Modell-Insekten
- d) Feststellung der Unschädlichkeit (gegenüber Säugern und Bienen).

Die Hauptprüfung selbst wird, wie bei anderen Pflanzenschutzmitteln, unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt. In Ermangelung besserer Methoden werden hierbei die *B. thuringiensis*-Präparate in ihrer Wirkung mit chemischen

<sup>1)</sup> Internationale Organisation für Biologische Schädlingsbekämpfung (= Organisation internationale de lutte biologique).

Insektiziden (z. B. DDT) verglichen, d. h. also nicht unter Verwendung eines homologen, sondern eines heterologen Standards. Dabei sind allerdings noch spezielle Maßstäbe anzulegen, die sich aus den günstigen Eigenschaften des *B. thuringiensis* ergeben: Nützlings-Schonung (Blüenspritzung möglich), gesundheitliche Unbedenklichkeit (keine Karenzzeiten vor der Ernte), keine Förderung polyvalenter Insektizid-Resistenz, usw.

Es soll angestrebt werden, daß die Hersteller von *B. thuringiensis*-Präparaten alle wichtigen Daten hinsichtlich Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in ein Zertifikat aufnehmen, das gleichzeitig zur Kennzeichnung des betreffenden Präparates dienen kann. Burgess (1966) hat ein Formular entworfen, das diese Bestrebungen berücksichtigt:

Abb. 6. Formular zur Kennzeichnung von technischen Präparaten von *B. thuringiensis* (Entwurf von Burgess 1966, geändert)

Hersteller . . . . .	
Handelsbezeichnung . . . . .	
Charge . . . . .	
Datum . . . . .	
Wirksamer Bestandteil: <i>Bacillus thuringiensis</i> Serotyp . . .	
. . . . Einheiten Sporen-Endotoxin-Wirkung	*) /g (Testinsekt . . .)
. . . . Einheiten Exotoxin-Wirkung	*) /g (Testinsekt . . .)
. . . . Sporen/g	
*) Verglichen mit dem homologen Internationalen Standardpräparat gleich 100 Toxin-Einheiten/g.	
Das Präparat enthält keine Fremdkeime. Es ist im Mäusetest geprüft und harmlos für Säugetiere. Es ist ungefährlich für Bienen in den angegebenen Aufwandmengen.	
Empfohlene Aufwandmengen	
. . . . kg/ha gegen . . . . .	(10 <sup>0</sup> /oiges Stäubemittel)
. . . . l /ha gegen . . . . .	in 0,2 <sup>0</sup> /oiger Suspension (Spritzmittel)

### 3. Grundlagen der Anwendung

#### a) Die Präparate

Die Mehrzahl der Handels-Präparate von *B. thuringiensis* hat die var. *thuringiensis* zur Basis. Lediglich zwei in der UdSSR hergestellte Präparate und eines aus den USA gehen von anderen Varietäten aus. Die wichtigsten Präparate sind in Tab. 8 aufgeführt.

#### b) Anwendung gegen Lepidopteren-Larven

Die Qualitätstypen I und II von *B. thuringiensis*-Präparaten enthalten den gegen Lepidopteren wirkenden Sporen-Endotoxin-Komplex. Da dieser gewissermaßen als Fraßgift wirkt, kann er nur gegenüber solchen Raupen verwendet werden, bei denen die entsprechenden physiologischen Voraussetzungen für eine Bekämpfung mittels Fraßgiften gegeben sind. Es ist daher wenig sinnvoll, *B. thuringiensis* gegen minierende Raupen einzusetzen, da diese beim Einbohren im allgemeinen nicht genügend Bakterien aufnehmen oder gegen Raupen und Imagines. Die Liste der empfindlichen Lepidopteren umfaßte 1960 etwa 100 Arten (vgl. Krieg 1961). Ihre Zahl hat sich bis heute auf etwa 150 erhöht. Wichtig dürfte auch der Hinweis sein, daß viele Noctuiden gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Kom-

plex völlig unempfindlich sind wie z. B. *Barathra brassicae*, *Agrotis ypsilon*, *Agrotis segetum*, *Peridroma saucia*, *Feltia subterranea*, *Pseudaletia unipuncta* (M a r t o u r e t 1961, W h i t e a n d B r i g g s 1964).

Wichtig für die Beurteilung des Behandlungserfolges ist auch, daß die meisten der empfindlichen Raupen erst nach einer gewissen Zeit, meist 1...5 Tagen (oder noch später), eingehen. Trotzdem tritt jedoch bereits wenige Stunden (meist 8...24) nach der Aufnahme der tödlichen Dosis ein Fraßstopp ein, so daß der Schaden bei empfindlichen Arten trotz der etwas längeren Absterbezeit letztlich gering bleibt.

Tab. 8. Übersicht über im technischen Maßstab erzeugte Präparate von *Bacillus thuringiensis*

Bezeichnung	Hersteller	Qualitäts-Typ	Serotyp	10 <sup>9</sup> Sp/g	Zubereitung <sup>1)</sup>
Agritol	Merck & Co. Rahway, N. J. — USA	II	1	65	WP
Bactospeine	Lab. Roger-Bellon Neuilly s. Seine — RF	I/II	1	25	WP
Bacthane L-69	Rohm & Haas Philadelphia, Pa. — USA	II	1	75	WP D
Bathurin	Chemapol/Biokrma Prag — ČSSR	I/II	1	250	WP
Biospor 2802	Farbwerke Hoechst Frankfurt/M. — BRD	I/II	1	70	WP D
Biotrol BTB	Nutrilite Products Inc. Buena Park, Calif. — USA	II	1	25 2,5	WP D
Dendrobazillin	(Allruss. Inst. f. Veterinärvirologie) Moskau — UdSSR	I	4 a, b	3,5	WP
Entobakterin 3	(Allruss. Inst. f. Pflanzenschutz) Leningrad — UdSSR	I	5	70	WP
Parasporine	Grain Process. Corp Muscatine, Iowa — USA	II	1	50 10	WP WP
Plantibac	Procida Paris — RF	II	1	50	WP
Thuricide	Bioferm Corp. Wasco, Calif. — USA	I/II	1	30 5	WP D
Thuricide 90 TS	Bioferm Corp. Wasco, Calif. — USA	I	5	30	F

<sup>1)</sup> WP = (wetable powder) Spritzmittel fest  
F = (flowable) Spritzmittel flüssig  
D = (dust) Stäubemittel

Wie bereits erwähnt, ist (ähnlich wie bei chemischen Insektiziden) bei *B. thuringiensis* die Toleranz der Raupen vom Entwicklungsstadium in der Weise abhängig, daß mit zunehmendem Alter bzw. Gewicht ihre Empfindlichkeit abnimmt. Bei relativ unempfindlichen Wirten empfiehlt es sich daher, das Substrat zu behandeln, auf das die Eiablage erfolgt, so daß der Bazillus durch die besonders anfälligen Eiraupen aufgenommen wird. Dieses Vorgehen bewährt sich speziell bei bestimmten Vorratsschädlingen (Wachsmotten, Mehlmotten), wie im folgenden ausgeführt.

Eine besondere Bedeutung gewinnt *B. thuringiensis* für die Bekämpfung von Wachsmotten (*Galleria mellonella*, *Achroia grisella*), da der Sporen-Endotoxin-Komplex spezifisch auf Lepidopteren wirkt und für Bienen ungefährlich ist. Erste erfolgreiche Versuche wurden von K r i e g und F r a n z (1959) an der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) durchgeführt. Weitere Ergebnisse liegen an dem gleichen Wirt vor von I s a k o v a (1964), J o h a n s e n (1962), M o r r i s s o n und P e r r o n (1963), M a r t o u r e t und E u v e r t e (1964), H e r f s (1964), B u r g e s und C a m m e l (1965 a), V a ň k o v á (1966 a) und K u l i k o v (1966). Über die Empfindlichkeit auch der Kleinen Wachsmotte (*Achroia grisella*) berichteten H e i t o r (1962) sowie v. d. L a a n und W a s s i n k (1964). Als Applikations-Methoden kommen in Frage: Bestäuben, Besprühen, Imprägnieren und schließlich Einschmelzen in das Wachs der Waben. Nach J o h a n s e n kann durch Imprägnierung von Waben mit einer 0,2 %igen Suspension eine Mortalität von 100 % erzielt werden.

Über die Bekämpfung von Mehlmotten (*Anagasta kühniella*, *Plodia interpunctella* u. a.) liegen eine ganze Reihe von Arbeiten vor, beginnend mit den grundlegenden Arbeiten von B e r l i n e r (1915) und M a t t e s (1927) bis zu den neueren Arbeiten von G o l e b i o w s k a (1964), Y a m v r i a s (1962), K r i e g (1964b), v. d. L a a n und W a s s i n k (1964) sowie B u r g e s (1964). Nach diesen Untersuchungen genügt eine 0,2...0,3%ige Zumischung von *B. thuringiensis* zum Mehl, um eine 100 %ige Mortalität der hochempfindlichen Eiraupen zu erreichen.

Über die Erfolgsaussichten der Anwendung von *B. thuringiensis* in Form eines Sporen-Endotoxin-Komplexes (Industriepreparate) in der Land- und Forstwirtschaft berichteten zusammenfassend K r i e g (1961), H a l l (1963), V a ň k o v á (1964), F r a n z und K r i e g (1967).

Wichtige Arbeiten in den USA veröffentlichten: H a l l und A n d r e s (1959), M c E w e n und Mitarb. (1960), H a l l und S t e r n (1962), C r e i g h t o n und Mitarb. (1964), B e g g (1964), D o a n e (1966), J a q u e s (1965), O a t m a n (1965). Über die in der UdSSR gemachten Erfahrungen berichteten u. a. Š v e c o v a (1959 b), L e s k o v a (1960), T a l a l a e v (1963), G u k a s j a n (1963), F e d o r i n č i k (1964 a, b), K o m j a g i n und Mitarb. (1965).

Speziellere Ergebnisse publizierten in Europa u. a. M a r t o u r e t (1959), A n d r o i ć (1961), K r i e g und S c h m i d t (1962), V a ň k o v á (1962), F a n k h ä n e l (1962), v. d. L a a n und W a s s i n k (1962), M a r t o u r e t und M i l a i r e (1963), H e r f s (1965 a), K ü t h e (1965), S z m i d t und Š l i z i ň s k i (1965), F r a n z und Mitarb. (1967).

Nach Labor- und/oder Freilandversuchen erwiesen sich u. a. folgende in Europa heimische land- und forstwirtschaftliche Schädlinge als empfindlich gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex von *B. thuringiensis* (vgl. auch K r i e g 1961):

## a) im Forst:

Eichenwickler (*Tortrix viridana*), Kleiner Frostspanner (*Operophtera* [syn. *Cheimatobia*] *brumata*), Großer Frostspanner (*Hibernia* [syn. *Erannis*] *defoliaria*), Ringelspinner (*Malacosoma neustria*), Prozessionsspinner (*Thaumetopoea processionea*, *Thaumetopoea pityocampa*), Buchenrotschwanz (*Dasychira pudibunda*).

## b) im Obstbau:

Gespinstmotten (*Hyponomeuta* spp.), Baumweißling (*Aporia crataegi*), Frostspanner, Ringelspinner, Goldafter (*Euproctis chrysorrhoea* [syn. *Nygmia phaeorrhoea*]), Weißer Bärenspinner (*Hyphantria cunea*), Knospenswickler (*Tmetocera ocellana*, *Argyroplote variegana*), Schwammspinner (*Lymantria dispar*).

## c) im Feldbau:

Rapsweißling (*Pieris rapae*), Kohlweißling (*Pieris brassicae*), Kohlschabe (*Plutella maculipennis*).

Die Dosis für die Anwendung von Spritzmitteln (entsprechend  $100 \cdots 150 \times 10^9$  Sporen/g) in der Landwirtschaft beträgt z. B.  $1 \cdots 2$  kg/ha; bei einer 0,2 %igen Suspension in Wasser bedeutet das eine Aufwandmenge von  $500 \cdots 1000$  l/ha. Bei Flugzeug-Besprühungen im Forst ist die ökonomische Aufwandmenge auf  $30 \cdots 100$  l/ha begrenzt. Deshalb empfiehlt sich eine Konzentration des Spritzmittels von  $3 \cdots 1$  ‰, um wieder auf eine Dosis von  $1 \cdots 2$  kg/ha zu kommen. Bei Verwendung von 10 %igen Stäubemitteln rechnet man mit 20 kg/ha. — Auf diese Weise beträgt unter der Voraussetzung von  $100 \cdots 150 \times 10^9$  Sporen/g Präparat die Belagsdichte  $200 \cdots 300 \times 10^{12}$  Sporen/ha oder  $200 \cdots 300 \times 10^4$  Sporen/cm<sup>2</sup>. Das ist pro cm<sup>2</sup> etwa die 100fache perorale D<sub>50</sub> für normal empfindliche Raupen.

Zur Erfolgskontrolle bei Bekämpfungsmaßnahmen gegen Insekten in der Land- und Forstwirtschaft stehen verschiedene Kriterien zur Verfügung: Mortalität bzw. Restbefall (Zahl der toten bzw. lebenden Raupen z. B. in 50 Blattbüscheln) oder Erfassung der (von den zu Imagines weiterentwickelten Tieren abgelegten) Eimassen, Kotfall (Gewicht oder Anzahl der Kotkrümel pro Flächeneinheit), Bonitierung der Restbelaubung (nach subjektiven Güteklassen). Zur Bestimmung des Wirkungsgrades auf der Versuchsfläche nach Mortalität bzw. Restbefall, bezogen auf die Verhältnisse auf einer unbehandelten Null-Fläche, wird meist die sog. Formel nach A b b o t t oder eine entsprechende Modifikation benutzt, um die wechselnde Anzahl von Schädlingen (z. B. infolge natürlicher Sterblichkeit) im unbehandelten Kontrollgebiet während der Versuchszeit zu berücksichtigen. Über die Grenzen der A b b o t t-Korrektur im allgemeinen liegt eine Arbeit von W i e g a n d (1967) vor und hinsichtlich ihrer Anwendung auf Probleme der Erfolgskontrolle von biologischen Bekämpfungsversuchen hat F r a n z (1967 b) berichtet.

Soweit gelegentliche Mißerfolge bei der Anwendung von *B. thuringiensis*-Präparaten im Freiland auftraten, so sind diese meist zurückzuführen auf (a) unsachgemäße Anwendung (Zeitpunkt!), (b) auf Verwendung gegen nicht frei fressende bzw. unempfindliche Schädlinge oder (c) auf technische Mängel der Präparate (s. u.). — Auch die Temperatur spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle. Nach F e d o r i n ě i k (1964 b) sollte man bei Temperaturen unter 15° C in der Fraßperiode nicht mit *B. thuringiensis* arbeiten. Die beste Wirkung wird bei 20°–30° C erzielt. Ein gewisser Ausgleich suboptimaler Temperaturen kann durch Höherdosierung erreicht werden. So empfiehlt F e d o r i n ě i k für nördlichere

Gegenden (der UdSSR) mittlere Konzentration bis 1 %, dagegen für südlichere Regionen (der UdSSR) Konzentrationen bis herab zu 0,1 %.

Zu Mißerfolgen durch Unterdosierungen kann es dadurch kommen, daß Spritzmittel schnell sedimentieren: Das Präparat setzt sich im Tank des Spritzapparates ab, und ausgebracht wird eine verdünnte Suspension. Herfs hat hierüber kürzlich (1966) anhand von Beispielen eingehender berichtet. Zur groben Beurteilung von *B. thuringiensis*-Präparaten als Spritzmittel kann man einen einfachen Sedimentationsversuch (vgl. Herfs und Krieg 1963) anstellen. Genauere Unterlagen liefern die unter Standardbedingungen ermittelten physikalischen Konstanten (s. S. 72). — Eine andere Ursache mangelnder Wirksamkeit kann in der zu geringen Netz- oder Haftfähigkeit von Präparaten liegen. Im ersten Falle wird der notwendige Kontaminationsgrad erst gar nicht erreicht. Im zweiten Fall wird das aufgebrauchte Material zu schnell wieder verdünnt.

Schwebefähigkeit, Netzfähigkeit und Haftfähigkeit sind physikalische Eigenschaften, die zwar schon dem Fermentationsgut zukommen, aber erst beim Formulierungsprozeß auf ihren endgültigen Wert eingestellt werden (s. S. 72). Unter Berücksichtigung der Fraßgift-Wirkung sollten die Präparate so formuliert werden, daß vorschriftsmäßig aufgebrauchte Beläge mindestens eine Woche lang wirksam bleiben. Prüfung auf Netz- und Haftfähigkeit können mittels mikrobiologischer Tests oder Biotests als Indikator durchgeführt werden. Spezielle Untersuchungen zu diesem Problem im Zusammenhang mit Rückstands-Untersuchungen liegen von Holtmann (1960) und im Zusammenhang mit der praktischen Anwendung von Burgerjon (1964) vor. Burgerjon verglich die Haftfähigkeit von Stäubemitteln mit der von Spritzmitteln auf der Basis des Sporen-Endotoxin-Komplexes. Bereits 22 mm Regen bewirkten eine starke Reduktion der Wirksamkeit auf bestäubten Blättern, während selbst 54 mm Regen noch keinerlei Einfluß auf gespritzte Blätter hatte.

Während im allgemeinen empfohlen wird, angerührte Spritzbrühen möglichst umgehend zu verwenden, um einem Wirkungsabfall vorzubeugen, konnten jedoch Raun und Mitarb. (1966) zeigen, daß im Kühlschrank über Monate aufbewahrte Spritzbrühen eine zunehmende Toxizität gegenüber *Spodoptera frugiperda*-Raupen zeigten. Die Toxizitätszunahme bleibt an die festen Bestandteile gebunden und war nicht im Überstand nachweisbar.

Bei Anwendung von *B. thuringiensis* gegenüber Schädlingen in der Land- und Forstwirtschaft bestehen zum Teil große Differenzen zwischen den Ergebnissen von Labor- und Feldversuchen. Bei Franz und Mitarb. (1967) findet sich eine Analyse der Faktoren, die solche Diskrepanzen verursachen können: Differenten Temperaturverhältnisse, Behandlungsunterschiede (die sich in Dosisunterschieden am Wirkungsort manifestieren) und „Verdünnung“ der Beläge auf dem wachsenden Substrat (Knospen, Blätter).

Auch an eine inaktivierende Wirkung durch Chemikalien ist beim Einsatz von *B. thuringiensis*-Präparaten zu denken: Sie kann z. B. von dem zur Herstellung von Spritzbrühen verwendeten Wasser ausgehen. Bestimmte Ionen (Fe, Cu, Al) können schädlich auf den Bazillus wirken. Unvergleichbar stärker ist jedoch der Effekt von Oxydantien, z. B. Ozon oder freiem Chlor (bzw. Hypochlorit), wie sie zur Leitungswasser-Desinfektion benützt werden: Diese Mittel greifen Sporen und Endotoxin-Kristalle an. Schließlich können sich noch pH-Werte  $> 7,5$  nachteilig auf die Persistenz der Endotoxinkristalle auswirken.

Nach Untersuchungen von Cantwell und Franklin (1966) werden im direkten Sonnenlicht nahezu 50 % der Sporen von *B. thuringiensis* nach 30 min Exposition inaktiviert und 80 % nach 60 min Exposition. Soweit lebende Bazillen als Erreger (und nicht nur das Endotoxin) an der Wirkung beteiligt sind, ist es durchaus möglich, daß auch ein Teil der Erfolgs-Differenzen zwischen Labortests und Freilandversuchen einer durch solare UV-Strahlung bedingten Inaktivierung von *B. thuringiensis*-Sporen zuzuschreiben ist. — Bereits Yamvrias (1962) beschrieb eine reduzierte Wirkung von *B. thuringiensis* auf *Anagasta kühniella* nach UV-Bestrahlung. Neuerdings berichten Raun und Mitarb. (1966) nach 72stündiger UV-Bestrahlung von *B. thuringiensis* über eine vollständige Aufhebung der Pathogenität gegenüber *Ostrinia nubilalis* und *Spodoptera frugiperda*. Nach dieser Bestrahlungszeit waren keine lebensfähigen Sporen mehr nachweisbar. — Sonnenbestrahlung bringt jedoch außer UV auch einen Temperaturanstieg. Beide wirken offenbar entgegengesetzt: Hohe Temperatur im Feld bedingt eine hohe Fraßintensität und damit eine verringerte Exposition des Bakteriums gegenüber dem schädlichen UV.

c) Infektionen nicht-larvaler Stadien von  
Lepidopteren; Vektoren; Epizootien

Neben den toxischen Wirkungen des *B. thuringiensis* wird seine infektiöse Natur gern übersehen. Es sollte aber nicht vergessen werden, daß der Bazillus immer wieder als Erreger von Epizootien aus Insekten isoliert wurde, erstmals aus Raupen von *Anagasta kühniella* und *Bombyx mori*. — Im Zusammenhang mit *B. thuringiensis*-bedingten Epizootien spielt die Art der Übertragung eine wichtige Rolle. Normalerweise wird *B. thuringiensis* von Individuum zu Individuum horizontal übertragen. Das Infektionsmaterial stammt dabei von Faeces infizierter Raupen oder deren zersetzter Leichen und wird peroral aufgenommen. Trotzdem ist gelegentlich die Frage gestellt worden, ob nicht auch eine vertikale Übertragung von Generation zu Generation existiere, derart, daß *B. thuringiensis* von den Eltern auf die Nachkommen z. B. via ovo weitergegeben wird. Speziell Toumanoff (1960) nahm auf Grund von Beobachtungen an infizierten *Bombyx mori*-Populationen eine solche vertikale Übertragung an.

Krieg (1963) fand in infizierten Populationen von *Anagasta kühniella* stets einen gewissen Prozentsatz von Eiern äußerlich infiziert. Burges und Cammell (1965 b) gelang es durch Waschen in Formalin oder Hypochlorit solche Eier wirksam zu desinfizieren. Sie konnten auf diese Weise eine Übertragung von *B. thuringiensis* durch innerlich infizierte Eier ausschließen.

Beobachtete Übertragungen von Generation zu Generation, besonders in Insektarien, dürften daher fast ausschließlich durch äußerliche Kontamination erfolgen.

Norris (1961) fand eine inapparente Verseuchung bei Laborstämmen von *Galleria mellonella* und isolierte wiederholt *B. thuringiensis* aus Faeces von Raupen, die keinerlei Anzeichen einer Krankheit erkennen ließen. Neuerdings berichteten Bucher und Mitarb. (1966) über eine latente *B. thuringiensis*-Infektion in Zuchten der Wachsmotte *Vitula edmandsae*. Die geringe Keimdichte verhindert hier die Anwendung von Routinemethoden zum kulturellen Nachweis von *B. thuringiensis* in den Zuchten. Jedoch zeigt das gelegentliche plötzliche Auftreten von Bazillus-Toten die Verseuchung der Zuchten an. Es konnte gezeigt werden, daß Imagines aus latent infizierten Zuchten äußerlich mit Sporen infiziert

sind und somit als „carrier“ zu betrachten sind. Der „carrier“-Status von Tieren mit inapparenter Infektion, bei denen sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Wirt und Erreger eingestellt hat, kann sowohl für die Ausbreitung der Infektion als auch speziell für eine Übertragung von Generation zu Generation bei nicht-synchronisierter Entwicklung der Wirte von Bedeutung sein.

Auch zu der Frage, ob *B. thuringiensis* mechanisch durch Vektoren verbreitet werden kann, liegen bereits einige Beobachtungen vor. Erste Erfolge in diesem Zusammenhang erzielte T o u m a n o f f (1959). Ihm gelang der Nachweis, daß die Braconide *Apanteles glomeratus* *B. thuringiensis* auf *Pieris brassicae* überträgt. — Auch I s a k o v a (1965) stellte erfolgreiche Übertragungsversuche mit Parasiten an: Den Parasiten wurden mit *B. t.* var. *galleriae* infizierte und gesunde Raupen nacheinander angeboten. Als Parasiten verwendete sie *Ageniaspis fuscicollis*, *Angitia fenestralis*, *Anilastus ebeninus*, *Apanteles glomeratus*, *Meteorus versicolor*, *Microplitis tuberculifera*, *Pimpla instigator*, *Pteromalus puparum*, *Theronia atalantae*, als Wirtstiere *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, *Barathra brassicae* und *Plutella maculipennis*. Die Übertragungsrate betrug in den Laborversuchen 50–80 %. *B. t.* var. *galleriae* erwies sich gegenüber allen geprüften Parasiten als unschädlich. — K u r s t a k (1964) untersuchte eingehend die Übertragung von *B. thuringiensis* auf *Anagasta kühniella* durch die Ichneumonide *Nemeritis canescens*. Er fand dabei einerseits, daß *B. thuringiensis* keinen Einfluß auf die Lebensdauer von Imagines dieses Parasiten hat. Andererseits wirkte sich aber die Vektor-Eigenschaft für den Parasiten gelegentlich ungünstig aus; nämlich dann, wenn seine Eier und Larven sich in der Wirtslarve nicht mehr weiterentwickeln konnten, weil diese an *B. thuringiensis* starben. Dessen ungeachtet kann nach F l a n d e r s und H a l l (1965) durch das Zusammenwirken von Schlupfwespe (*N. canescens*) und *B. thuringiensis* eine dichteabhängige Epizootie bei *Anagasta kühniella* induziert werden, selbst dann, wenn *B. thuringiensis* unter ungünstigen Verhältnissen (z. B. infolge zu geringer Empfindlichkeit der Wirtspopulation) allein nicht wirtsregulativ wirken kann. Die Übertragung von *B. thuringiensis* durch *N. canescens* wird dadurch gefördert, daß der Ovipositor bei der Suche nach Wirten offen getragen wird und so mit Sporen im Substrat in Berührung kommen kann (K u r s t a k 1964).

*B. thuringiensis* wirkt vor allem pathogen gegen Larvenstadien. Es sind jedoch auch Infektionen und Schädigungen postlarvaler Stadien bekannt, insbesondere, wenn die Larven mit einer subletalen Dosis infiziert worden sind. Als Folge einer inapparenten Verseuchung (K r i e g unpubl.) oder einer subletalen Infektion (Y a m v r i a s 1962, M a t t e r 1966) mit *B. thuringiensis*, beobachtet man speziell bei *Anagasta kühniella* eine Verlängerung der Entwicklungszeit, Absterben im Puppen- oder Imaginalstadium, Mißbildung von Puppen oder Imagines, Reduktion der Fertilität, Reduktion der Schlüpfprozente und physiologische Schwächung der Folgegeneration. Bei Selektionsexperimenten mit *B. thuringiensis* an *Plutella maculipennis* wurde ebenfalls von S i c k e r und K r i e g (unpubl.) Reduktion von Körpergröße und Fertilität in den Folgegenerationen festgestellt. Ähnliche Beobachtungen liegen bei anderen Arten vor. So berichteten O a t m a n und L e g n e r (1964) über eine verzögerte Entwicklung, eine hohe Mortalität während der Überwinterungsphase und eine Schwächung der Folgegeneration bei *Spilonota ocellana* nach einer *B. thuringiensis*-Behandlung im Freiland. T a l a l a e v (1958) und T j u m e n z e v (1963) fanden, daß als Altraupen infizierte



*Dendrolimus sibiricus* als Puppen starben. — Schließlich beschrieb Angus (1965) ähnliche Verhältnisse bei *Malacosoma disstria*, *Sarothrips cinereana* und *Nymphalis antiopa*, Klein und Lewis (1966) bei *Choristoneura fumiferana* und Bucher und Mitarb. (1966) bei *Vitula edmandsae*. Solche im postlarvalen Stadium gestorbenen Lepidopteren erwiesen sich als hochgradig mit *B. thuringiensis* infiziert, so daß sie in der Natur als Bazillen-Reservoir wirken können.

Nach Talalae v (1958, 1959, 1961, 1963) soll es durchaus möglich sein, durch Applikation von *B. thuringiensis* im Freiland auch Epizootien künstlich zu erzeugen, speziell bei *Dendrolimus sibiricus*. Die räumliche Ausbreitung und der zeitliche Fortbestand der Seuche soll dabei auf dreierlei Weise zustande kommen: (1) dadurch, daß tote Altlarven oder Puppen in den Gespinsten hängenbleiben und so als Bazillen-Reservoir wirken, (2) daß infizierte Raupen überwintern und für die Folgegeneration zur Infektionsquelle werden, (3) daß kontaminierte Falter den Bazillus über größere Strecken verbreiten helfen. — Ausgehend von dieser Überzeugung empfahl Talalae v, die Arvenbestände in Sibirien und im Fernen Osten der UdSSR (die zwischen 1953 und 1956 in einer Ausdehnung von über 5 Mio. ha von einer *D. sibiricus*-Kalamität betroffen worden waren), in Zukunft wie folgt zu bekämpfen: Am Ende des Sommers von Zwischenflugjahren werden die gefährdeten Bestände mit einem geeigneten *B. thuringiensis*-Präparat (*Dendrobazillin* oder *Entobakterin*) nur streifenweise (mit Intervallen von 100–300 m) behandelt. Erwartet wird, daß der Bazillus eine künstliche Epizootie hervorruft und sich auf diese Weise die Behandlungslücken von selbst schließen (vgl. auch Kulagin i Lebedeva 1965). Indessen konnten Vorončichina und Poltev (1964) keine induzierten Epizootien nach Behandlung mit *B. t.* var. *dendrolimus* und *B. t.* var. *galleriae* bei *D. sibiricus* nachweisen. Um die Brauchbarkeit der Streifenmethode nach Talalae v zu erproben, wurde bereits 1961 von der Hauptverwaltung für Forstwirtschaft und Forstschutz der RSFSR im Juni 1961 eine Staatliche Prüfungskommission unter Prof. A. A. Cimek eingesetzt. Auf Grund ausgedehnter Untersuchungen (Komjagin et al. 1965) kam die Kommission zu der Schlußfolgerung, daß das Setzen von Infektionsherden nicht empfohlen werden kann, da die Erzeugung einer künstlichen Epizootie experimentell nicht verifizierbar war. Bisher stehen sich somit die Ansichten der verschiedenen Bearbeiter noch diametral gegenüber. Es wird sich zeigen, ob auch im Falle der Bekämpfung von *D. sibiricus* mit *B. thuringiensis* in den Flug- und Fraß-Jahren eine totale Behandlung durchzuführen sein wird, wie sie bei anderen Lepidopteren üblich ist.

Für das Überleben von *B. thuringiensis* ist die Frage der Persistenz in einem Wirt nicht so entscheidend wie bei monovalenten bzw. obligaten Pathogenen, da der Bazillus nicht nur ein relativ weites Wirtsspektrum besitzt, sondern auch eine saprophytische Phase und schließlich in den Sporen noch eine Dauerform.

Bemerkenswert ist, daß *B. thuringiensis* nicht nur in Lepidopteren vorkommt, sondern auch aus Homopteren (*Cicada plebeia*), aus Hymenopteren (*Pristiphora erichsonii*), aus Coleopteren (*Melolontha melolontha*) und sogar aus Nicht-Insekten isoliert werden konnte. Da sich diese Tiere gegenüber *B. thuringiensis* weitgehend refraktär verhalten, können sie als Vektoren oder Reservoir dienen.

*B. t.* var. *thuringiensis* ist fast über die ganze Erde verbreitet. Andere Varietäten scheinen auf ganz bestimmte Regionen beschränkt zu sein, so z. B. var. *alesti* und var. *galleriae* auf Zentraleuropa und Westasien. Die var. *sotto* / *dendrolimus*-

Gruppe scheint nur in Zentral- und Ostasien vorzukommen und die var. *kenyae* nur in Südafrika. Stämme der var. *entomocidus* ohne Befähigung zur Acetyl-methylcarbinol-Produktion sind bisher nur aus Nordamerika bekannt; in Europa hingegen wurden bisher nur Acetylmethylcarbinol-positive Stämme dieser Varietät isoliert (N o r r i s and B u r g e s 1965). Die var. *aizawai* kommt nicht nur in Ostasien (Japan) vor, sondern auch in Europa (K r i e g, unpubl.). Über die Verbreitung der Varietäten *morrisoni* (erstmal isoliert in Schottland), *tolworthi* (erstmal isoliert in England) und *caucasicus* (erstmal isoliert in Armenien) ist noch nichts Näheres bekannt. Weitere insektenpathogene Kristallbildner, die *B. thuringiensis* zugerechnet werden müssen, wurden kürzlich in der UdSSR isoliert: *Bacillus tuviensis* und *Bacillus insectus*. In Australien konnte trotz eifrigen Suchens *B. thuringiensis* noch nicht gefunden werden. — Diese Zonierung der natürlichen Verbreitung ist aber heute durch die weltweite Anwendung bestimmter Varietäten, speziell der var. *thuringiensis*, zu Zwecken der mikrobiologischen Bekämpfung bereits durchbrochen.

#### d) Anwendung gegen Nicht-Lepidopteren<sup>1)</sup>

Es ist bekannt, daß manche technischen Zubereitungen von *B. thuringiensis* (sog. Qualitätstyp II) Exotoxin enthalten und deshalb eine über den Wirkungsbereich der Lepidopteren hinausgehende Wirkung besitzen. Trotzdem verwendete man bisher Exotoxin-haltige Präparate noch nicht in größerem Maßstabe, auch nicht gegen jene Lepidopteren, die sich gegen den Sporen-Endotoxin-Komplex unempfindlich verhalten. Die Hauptschwierigkeit für die Verwendung von Exotoxin-Lösungen im Pflanzenschutz ist die Tatsache, daß der Wirkstoff wasserlöslich ist und daher von den Blättern sehr leicht abgewaschen wird. Untersuchungen über die Haftfähigkeit von Exotoxin-Belägen liegen von B u r g e r j o n (1964) vor. Hiernach genügen bereits 0,66 mm Regen, um etwa  $\frac{2}{3}$  des Wirkstoffes abzuwaschen. — Bessere Resultate dürften von Zumischungen von Exotoxin-haltigen Präparaten zu einem Substrat zu erwarten sein, z. B. im Vorratsschutz oder bei der Bekämpfung von gewissen human- oder veterinär-medizinisch wichtigen Insekten.

Vergleichende Laborversuche zur möglichen Anwendung von *B. thuringiensis*-Industriepräparaten (*Bacthane*, *Thuricide* WP und *Biotrol*) gegen Dipteren-Larven liegen u. a. von G i n g r i c h (1965) vor; *Haematobia irritans* reagierte am empfindlichsten, *Stomoxys calcitrans* am schwächsten. Auf *Musca domestica* wirkten die Präparate mittelstark ein. Die angewandten Dosen lagen zwischen 1–100 mg Präparat/100 g Rinder-Faeces. — G i n g r i c h und E s c h l e (1966) untersuchten die Wirkung eines technischen *B. thuringiensis*-Original-Präparates (*Bacthane*) und die eines wäßrigen Extraktes davon auf *Haematobia irritans*-Larven. Die Anwendungsdosen lagen zwischen 0,5 und 4,0 mg Präparat/100 g Rinder-Faeces. Die Wirkung von Originalpräparat und Extrakt gegenüber den Eilarven war nicht signifikant verschieden; die LD<sub>50</sub> betrug etwa 1,5 mg Präparat/100 g Rinder-Faeces. Hiernach handelt es sich bei dem als „fly factor“ wirksamen Stoff um Exotoxin, das quantitativ mit Wasser extrahierbar war.

Schon früher wurden pilot-experiments zur „systemischen“ Bekämpfung von *Musca domestica*, in Fäkalien mittels *B. thuringiensis*-Präparaten angestellt. D u n n (1960) sowie H a r v e y und B r e t h o u r (1960) verfütterten *B. thuringiensis*-Präparate an Rinder und stellten einen starken Rückgang in der Besied-

<sup>1)</sup> Hinsichtlich der Ungefährlichkeit von *B. thuringiensis* gegenüber Nützlingen s. S. 57.

lung der Fäkalien durch Fliegen fest. Als wirksame perorale Dosis nennt D u n n 500 g Präparat<sup>1)</sup>/Rind/Tag. Ähnliche Versuche mit Hühnern wurden von B r i g g s (1960 a), H a r v e y und B r e t h o u r (1960), B u r n s und Mitarb. (1961) sowie W i l l i a m s und P i c k e r i n g (1962) durchgeführt. B r i g g s gibt als wirksame perorale Dosis an 3 g Präparat<sup>2)</sup>/Huhn/Tag. B o r g a t t i und G u y e r (1963) arbeiteten mit japanischen Wachteln. Bei Zumischung von 0,77 bis 3,1 ‰ Industriepräparat zum Futter (Thuricide, Biotrol, Agritol, B a c t h a n e) wurde die Entwicklung von *Musca domestica* zu 64–96 ‰ unterdrückt. Die benutzten Industriepräparate enthielten zwar alle Sporen und Endotoxin-Kristalle, doch dürfte ihre Dipteren-Wirksamkeit auf den wechselnden Gehalt an Exotoxin zurückzuführen sein (B r i g g s 1960 a). Bei weiteren Versuchen applizierten G i n g r i c h und E s c h l e (1966) Rindern 10 g eines Industriepräparates (B a c t h a n e) bzw. 10 g eines wäßrigen Extraktes peroral und testeten die Faeces über eine Zeitspanne von 60 Std. auf ihre Wirksamkeit gegenüber Eilarven von *Haematobia irritans*. Dabei zeigte nur das applizierte Gesamtpräparat eine bemerkenswerte Toxizität (100 ‰ Mortalität nach 25 Std.), jedoch nicht der Extrakt (40 ‰ Mortalität nach 25 Std.). Ob das Exotoxin im Darmtrakt absorbiert oder partiell inaktiviert wurde, ist noch nicht geklärt.

Nach L e s k o v a war E n t o b a k t e r i n - 3 im Gegensatz zu den Präparaten T h u r i c i d e und B i o t r o l gegenüber *Musca domestica* unwirksam; es enthält also keine nennenswerten Mengen Exotoxin.

Bei neueren Untersuchungen verfütterte G a l i c h e t (1966) 24fach konzentrierte exotoxinhaltige Kulturflüssigkeit (Qualitätstyp V nach B u r g e r j o n) an Rinder. Dieses Exotoxinpräparat (der Firma Soc. Laborat. R. Bellon, FR) unterdrückte in einer täglichen Dosis von 50–85 ml (entsprechend 1,2–2,0 l Kulturflüssigkeit) pro Tier (100–400 kg Körpergewicht) eine Entwicklung von *Musca domestica* in den Faeces. Die Toxizität in den Faeces verschwand 24–48 Std. nach Absetzen des Exotoxins. Für Schweine (*Sus scrofa domesticus*) waren größere Exotoxinmengen notwendig, um in den Faeces die Entwicklung von *Musca domestica* zu unterdrücken: 110 ml Exotoxinkonzentrat (entsprechend 2,6 l Kulturflüssigkeit) täglich pro Tier (30 kg Körpergewicht). Auffallend war die zunehmende Inappetenz und das abnehmende Körpergewicht der behandelten Schweine auf die Exotoxin-Behandlung hin. Es ist noch nicht sicher, ob die hohe Exotoxin-Konzentration selbst oder ein anderer Bestandteil der Kulturflüssigkeit für diese ernährungsphysiologische Störung verantwortlich zu machen ist.

Die Wirksamkeit von *B. thuringiensis*-Präparaten auf Nicht-Lepidopteren hat jedoch nicht immer eine Exotoxinwirkung als Ursache. Nach S h a i k h und M o r r i s o n (1966) reagierten die Dipteren (Larven) *Aedes aegypti* und *Aedes stimulans* sowie die Coleopteren (Imagines) *Oryzaephilus surinamensis* und *Sitophilus granarius* mit einer relativ hohen Mortalität gegenüber B a c t h a n e. Nach der von den Autoren gegebenen Darstellung, war diese Wirkung auf das „inerte“ Streckmittel Kieselgur zurückzuführen und nicht etwa auf eine Wirkung des Bazillus selbst oder seiner Toxine.

#### Z u s a m m e n f a s s u n g

Entsprechend ihrem Gehalt an wirksamen Bestandteilen unterscheidet man bei den im Handel befindlichen Präparaten (vgl. Tab. 8) zweckmäßigerweise zwischen

<sup>1)</sup> Biotrol.

<sup>2)</sup> Thuricide WP.

2 Qualitätstypen, I: Sporen-Endotoxin-Komplex, II: Sporen-Endotoxin-Komplex plus Exotoxin. Präparate des Qualitätstyps I wirken spezifisch auf Larven von Lepidopteren mit Ausnahme einiger Noctuiden. Präparate des Qualitätstyps II wirken zusätzlich auf Noctuiden und auch auf Insekten anderer Ordnungen, z. B. Dipteren. — Es wird speziell auf Anwendungsmöglichkeiten von *B. thuringiensis*-Präparaten im Vorratsschutz, im Forst, im Obstbau, im Feldbau und im Bereich der Human- und Veterinärhygiene eingegangen. — Neben Dosierung, Erfolgskontrolle und Klärung von Mißerfolgen werden auch Probleme der Persistenz, möglicher Übertragung und Ausbreitung sowie von Spätwirkungen des *B. thuringiensis* diskutiert.

#### 4. Kombination und Wechselwirkungen

##### a) Stressoren und Inhibitoren

Die Wirksamkeit von *B. thuringiensis* gegenüber einer Population ist weitgehend abhängig von ihrem physiologischen Allgemeinzustand. Wechseln die ihn bedingenden Voraussetzungen, so kann sich die Toleranz bzw. Disposition in den vom Wirtsgenotyp gesetzten Grenzen ändern (s. S. 48). Besonders auffällig ist die Änderung der Disposition unter Stress. Hierunter werden außergewöhnliche Belastungen verstanden, wie sie durch schädliche Reize bedingt werden. Als Stressoren sind bekannt: Extreme Klimafaktoren, suboptimale Ernährung, Strahlenwirkung, Giftwirkung und u. U. auch Überbevölkerung (crowding).

Von diesen Stressoren läßt sich für praktische Zwecke lediglich die Zumischung von Giften zu *B. thuringiensis* ausnützen. Es hat daher auch nicht an Versuchen gefehlt, *B. thuringiensis* mit subletalen Dosen von Insektiziden (z. B. DDT) zu kombinieren. Die erzielten Ergebnisse sind widersprüchlich (s. a. Herfs 1965 b): Während Petruchina (1959) und Leskova (1961) beispielsweise über Erfolge in dieser Richtung berichteten, fanden Kudler und Lysenko (1963), sowie Fedorinčik (1964 b) keine Steigerung der Wirksamkeit. — Interessant sind Ergebnisse von Doane und Wallis (1964) über die Stressor-Eigenschaft von Borsäure. Während 1%ige Borsäure allein appliziert keinerlei Effekt gegenüber Raupen von *Lymantria dispar* besitzt, bewirkte sie als Additiv bei einer *B. thuringiensis*-Applikation eine signifikante Erhöhung der Wirksamkeit. Organische Säuren (wie Essigsäure, Ascorbinsäure, Zitronensäure, Pektinsäure und  $\gamma$ -Aminobenzoesäure) erwiesen sich demgegenüber als wirkungslose Zusätze.

Über die Verträglichkeit von *B. thuringiensis*-Präparaten mit Chemikalien, speziell Additiven (Netzmittel, Haftmittel u. a.) und Pflanzenschutzmitteln (Fungizide, Insektizide, Akarizide) hat kürzlich Herfs (1965 b) referiert.

Inwieweit Bakterizide, die auch in der natürlichen Nahrung vorkommen können, die Wirkung von *B. thuringiensis* beeinträchtigen, ist davon abhängig, welche Bedeutung dem lebenden Erreger im pathogenetischen Geschehen zukommt. Speziell Gukasjan (1958 b), Kushner und Harvey (1962) sowie Smirnov und Hutchinson (1965) fanden gegen *B. thuringiensis* gerichtete bakterizide Wirkstoffe bei verschiedenen Phanerogamen, speziell Coniferen. Ihr hemmender Effekt auf *B. thuringiensis* ist nach Kushner und Harvey im Inhalt des Raupendarmes noch nachweisbar.

Der Versuch, Antibiotika (Aureomycin, Streptomycin, Terramycin) therapeutisch gegen *B. thuringiensis* in infizierten Zuchten von *Bombyx mori* einzusetzen, blieb bisher auf einen Teilerfolg beschränkt (African 1960).

## b) Wechselwirkungen mit Mikroorganismen

## b 1) Mischinfektionen mit anderen Bakterien

Die Bedeutung von Doppelinfektionen für die *B. thuringiensis*-Wirkung kann nicht eindeutig beantwortet werden. Einerseits zeigten frühere Versuche von Steinhäus (1959 b) an *Galleria mellonella* und *Bombyx mori* keine Steigerung der effektiven Wirkung von *B. thuringiensis* durch Kombination mit insektenpathogenen Entobacteriaceen (*Serratia marcescens*). — Andererseits lassen Untersuchungen von Isakova (1964) diesen Komplex in einem neuen Licht erscheinen. Speziell scheinen hinsichtlich der *B. thuringiensis*-Pathogenese wesentliche Unterschiede zwischen Insekten mit geringer und solchen mit reichlicher Darmflora zu existieren. Die genannte Autorin beobachtete nämlich, daß nur bei Raupen mit minimaler Darmflora wie *Galleria mellonella* nach Applikation von *B. t.* var. *galleriae* auf die klassische Darmtoxikose eine *B. thuringiensis*-Septikämie folgt. Bei *Pieris brassicae* mit reicher Darmflora dagegen beobachtete sie in Abhängigkeit von der Dosis einen anderen Krankheitsverlauf: Bei niederen bis mittleren Dosen ( $Lt_{50} > 1$  d) trat anstelle einer typischen Darmtoxikose eine Septikämie auf, die durch autochthone Darmbakterien (Entobacteriaceen) hervorgerufen wurde. Nur bei hohen Dosen von *B. thuringiensis* ( $Lt_{50} < 1$  d) trat eine Darmtoxikose auf. — Neuerdings konnten auch Martouret und Mitarb. (1965) bei *Pieris brassicae* eine starke Vermehrung der (vornehmlich aus *Aerobacter aerogenes* bestehenden) autochthonen Darmflora nach *B. thuringiensis*-Kontamination feststellen. — Die Untersuchungen von Steinhäus an *Galleria mellonella*, bei denen gleichzeitig *B. t.* var. *thuringiensis* und *Serratia marcescens* appliziert wurden, gewinnen in diesem Zusammenhang eine neue Aktualität: Auch in diesem Fall einer artifiziellen Mischinfektion trat *B. thuringiensis* als Septikämie-Erreger ganz hinter *Serratia marcescens* zurück. Während die vegetative Vermehrung des ersteren offenbar gehemmt wurde, hatte umgekehrt *B. thuringiensis* auf die Wirksamkeit von *Serratia marcescens* einen steigernden Effekt.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß es Vaňková (1957, 1965) gelang, einen gegen grampositive Bakterien gerichteten Antagonismus bei bestimmten Stämmen von *B. thuringiensis* nachzuweisen. Krassilnikov und Gukasjan (1964) fanden außerdem eine Hemmung zwischen bestimmten Varietäten von *B. thuringiensis* selbst (s. S. 17). Demnach kann nicht nur die kombinierte Anwendung von *B. thuringiensis* mit anderen grampositiven Bakterien problematisch sein, sondern auch die Vereinigung von verschiedenen Biotypen von *B. thuringiensis* in einem Präparat.

## b 2) Mischinfektion mit Bakteriophagen

Virulente *B. thuringiensis*-Phagen wurden aus Därmen verschiedener Insekten isoliert (Afrikian 1960, Švecova 1964, Raun et al. 1966). Der Versuch einer Phagentherapie von *B. thuringiensis*-Infektionen blieb jedoch bisher ohne überzeugenden Erfolg. Das gilt sowohl für die Untersuchungen von Afrikian an *Bombyx mori* als auch für die von Raun und Mitarb. (1966) an *Ostrinia nubilalis*. Der Phagen-Einfluß beschränkte sich lediglich auf eine Verzögerung der *B. thuringiensis*-Wirkung; die Höhe der Endmortalität dagegen blieb unbeeinflusst. Sowohl Afrikian wie auch Raun und Mitarb. führen die Mißerfolge ihrer Phagentherapie auf die Entwicklung von resistenten *B. thuringiensis*-Klonen innerhalb von 24–48 Std. zurück<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Außerdem haben die Phagen ja keinerlei Einfluß auf die applizierten Toxine.

## b 3) Mischinfektionen mit insektenpathogenen Viren

Während also von Viren, die beim pathogenetischen Prozeß auf den Erreger einwirken, bisher nur wenig bekannt ist, liegen einige interessante Beobachtungen über jene Viren vor, die zugleich mit *B. thuringiensis* den Wirt angreifen:

S e m e l (1961) versuchte erstmals, *B. thuringiensis* mit einem Kernpolyeder-Virus kombiniert einzusetzen, und zwar gegen *Trichoplusia ni*, eine gegen den *B. thuringiensis*-Sporen-Endotoxin-Komplex weniger empfindliche Art. Eine Wirkungssteigerung gegenüber einer Behandlung der Raupen mit dem Virus allein konnte er nicht feststellen. Neuerdings berichtete S t e l z e r (1965) über einen ähnlichen Versuch bei *Malacosoma fragile*. Während er in einigen Versuchen keinerlei Wirkungssteigerung fand, registrierte er in anderen jedoch einen Syntagmus bis zu 39 %.

Über die Wirkung von *B. thuringiensis* auf latent mit Virus infizierte Raupen liegen bereits mehrere Beobachtungen vor. Eine provozierende Wirkung von *B. thuringiensis* zeigte sich bei der Kernpolyedrose von *Hyphantria cunea* (V a s i l j e v i č 1957), bei der Kernpolyedrose von *Aporia crataegi* und der Plasma-polyedrose von *Dasychira pudibunda*, bei der Granulose von *Pieris brassicae* (K r i e g 1962) und bei der Granulose von *Hyphantria cunea* (K r i e g und S c h m i d t 1962). Aber auch antagonistische Effekte sind bekannt: So berichteten S i c k e r und Mitarb. (1965), daß viruskranke (kernpolyedrose) Raupen von *Malacosoma neustria* schneller abstarben, wenn sie unbehandelt blieben, im Vergleich zu viruskranken Raupen, die mit *B. thuringiensis* behandelt worden waren.

Bei all diesen Versuchen handelt es sich um die Kombination von *B. thuringiensis* mit einem spezifischen Virus gegen ein und dieselbe Wirtsart. Es besteht aber auch die — meines Wissens noch nicht genutzte — Möglichkeit, *B. thuringiensis* mit Viren gegen *B. thuringiensis*-refraktäre Schädlinge zu kombinieren, um dadurch mit einer einzigen Behandlung *B. thuringiensis*-empfindliche und -unempfindliche Arten zu treffen. So ist es z. B. denkbar auf Kohlfeldern, *B. thuringiensis* Sporen-Endotoxin (wirksam gegen *Pieris brassicae*, *Pieris rapae* und *Plutella maculipennis*) zusammen mit einem spezifischen Virus gegen *Barathra brassicae* (eine gegenüber dem *B. thuringiensis*-Sporen-Endotoxin-Komplex refraktäre Art) einzusetzen und auf diese Weise die mikrobiologische Bekämpfung von Kohlschädlingen zu vereinfachen (vgl. auch F r a n z 1966 b). Nach eigenen Vorversuchen im Labor verhält sich *B. thuringiensis* in vivo völlig indifferent gegenüber der Kernpolyedrose von *Barathra brassicae*, so daß der vorgeschlagene Weg durchaus gangbar erscheint.

## Z u s a m m e n f a s s u n g

*B. thuringiensis* kann mit vielen Pflanzenschutzmitteln kombiniert angewendet werden. Soweit diese spezifisch wirken (Fungizide, Akarizide, Insektenpathogene) ist gegen eine kombinierte Anwendung nichts einzuwenden. Dagegen müssen Versuche, *B. thuringiensis* mit solchen Breitbandinsektiziden (in reduzierten Dosen) zu kombinieren, die sein Wirkungsspektrum überschneiden, zurückhaltender beurteilt werden. Vor allem ist es nicht ratsam, *B. thuringiensis* mit anderen Mitteln einschließlich Pathogenen ohne wohlbegründete Indikation zu kombinieren.

### G. Ausblick

Neben der Sicherstellung eines wirksamen Pflanzenschutzes steht die Forderung nach einem weitgehenden Schutz der Gesundheit von Mensch, Haustieren und der Biozönose. Diese an sich widerstrebenden Tendenzen von Pflanzenschutz, Gesundheitsschutz und Naturschutz sinnvoll zu koordinieren, wird einerseits von dem Erlaß neuer Verordnungen für den Gebrauch der bisher üblichen relativ unspezifischen Bekämpfungsmittel erhofft (Leib 1965). Andererseits dürfte die Entwicklung neuer spezifisch wirkender Methoden von vornherein eine Gefahrenminderung einschließen. Im *Bacillus thuringiensis* steht uns bereits heute ein solches weitgehend spezifisch wirkendes Präparat zur Verfügung (vgl. auch Franz 1966 b).

Es besteht auch durchaus die Möglichkeit, die Toxine von *B. thuringiensis* isoliert als spezifisch biogene Insektizide zu verwenden. Dies ist beim Exotoxin relativ leicht präparativ möglich, etwas schwerer beim Endotoxin.

Ganz andere Aspekte ergeben sich aber aus der Möglichkeit, durch Mutation und Auslese eine Produktion von Endotoxin- und Exotoxin-Derivaten mit neuen Eigenschaften zu erzielen. Eine Abwandlung des Wirtsspektrums kann in diesem Zusammenhange ebenso erstrebenswert sein wie eine Toxizitäts-Erhöhung.

Endlich kann das Auffinden der toxisch wirkenden Konfiguration in den Molekülen der *B. thuringiensis*-Toxine Arbeiten zur chemischen Synthese neuer Gruppen von spezifisch wirkenden Insektiziden (auf Polypeptid- bzw. Nucleotid-Basis) einleiten.

Nach dem vorliegenden Datenmaterial ist *B. thuringiensis* den „nicht-persistenten“ Pathogenen zuzurechnen, d. h. er muß, ähnlich wie chemische Insektizide, dem zu bekämpfenden Schädling ständig nachgeführt werden. Dies bedeutet einen laufenden Bedarf und demzufolge auch eine laufende Produktion. Alle Eigenschaften, die an ein „nicht-persistentes“ Pathogen zu stellen sind, erfüllt *B. thuringiensis*: Hohe Virulenz gegenüber einer beschränkten Anzahl von Schädlingsarten, die Möglichkeit einer wenig aufwendigen Produktion, die Fähigkeit, ohne Aktivitätsverlust über längere Zeit lagerungsfähig zu sein; schließlich lassen sich diese Präparate mit den im Pflanzenschutz üblichen Sprüh- und Stäubegeräten ausbringen. Mit einer stärkeren Verwendung von Präparaten auf der Basis des *B. thuringiensis* wird in Zukunft zu rechnen sein.

### H. Literatur

- Adams, J. C., and Hartman, P. A., Longevity of *Bacillus thuringiensis* Berliner in the rumen. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 245—247.
- Afrikan, E. G., Causal agents of bacterial diseases of the silkworm and the use of antibiotics in their control. *J. Insect Path.* 2. 1960, 299—304.
- Aizawa, K., and Fujiyoshi, N., The growth of *Bacillus thuringiensis* in dead larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. sericult. Sci.*, Tokyo, 33. 1964, 399—402.
- , Kawarabata, T., and Sato, F., (Response of the silkworm, *Bombyx mori*, to *Bacillus thuringiensis* Berliner). *J. sericult. Sci.*, Tokyo, 31. 1962, 253—267. [Jap.]
- , and Sato, F., (Effect of bacterial insecticides upon the silkworm, *Bombyx mori*). *Sansi-Kenkyû* (Acta Sericol.) 39. 1961, 38—41. [Jap.]

- Androić, M., (The experimental combating of the pine procession-moth (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.) with the application of bacterial preparations (*Bacillus thuringiensis*)). Šumarski List, Zagreb, (3-4). 1961, 108-124. (Serb.-kroat.)
- Angus, T. A.: Extraction, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Canad. J. Microbiol.* 2. 1956, 416-426.
- , Separation of bacterial spores and parasporal bodies with a fluorocarbon. *J. Insect Path.* 1. 1959, 97-98.
- , Properties of silkworm digestive juices with respect to paralytic effects. *J. Insect Path.* 6. 1964, 254-257.
- , Mortality due to *Bacillus thuringiensis* in postlarval stages of some Lepidoptera. *Proc. ent. Soc. Ontario* 95. 1964 (1965), 133-134.
- , Comparative toxicity of the parasporal inclusions of three entomogenous bacteria. *J. Invertebrate Path.* 9. 1967, 256-260.
- , and Heimpe, A. M., An effect of *Bacillus sotto* on the larvae of *Bombyx mori*. *Canad. Entomologist* 88. 1956, 138-139.
- , and —, Inhibition of feeding, and blood pH changes, in lepidopterous larvae infected with crystallforming bacteria. *Canad. Entomologist* 91. 1959, 352-358.
- Aronson, J. N., Bowe, P. A., and Swafford, J., Mesosomes in m-Tyrosine-inhibited *Bacillus thuringiensis*. *J. Bact.* 93. 1967, 1174-1176.
- Ayyar, G. R., Preliminary trials with an entomogenous bacterium, *Bacillus thuringiensis* Berl., new to India. *Curr. Sci., Bangalore*, 30. 1961, 29-30.
- Baillie, A., and Norris, J. R., Antigen changes during spore formation in *Bacillus cereus*. *J. Bact.* 87. 1964, 1221-1226.
- De Barjac, H., et Bonnefoi, A., Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis*. *Entomophaga* 7. 1962, 5-31.
- , et —, Classification des souches de *Bacillus thuringiensis*. *Compt. rend. Acad. Sci., Paris*, 264. 1967, 1811-1813.
- , Burgerjon, A., and Bonnefoi, A., The production of heat-stable toxin by nine serotyps of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 537-538.
- , et Dedonder, R., Isolement d'un nucléotide identifiable à la „toxine thermostable“ de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *Compt. rend. Acad. Sci., Paris*, 260. 1965, 7050-7053.
- , et Lecadet, M., Relations immunologiques des protéines toxiques extraites de trois souches de *Bacillus thuringiensis*. *Compt. rend. Acad. Sci., Paris*, 252. 1961, 3160-3162.
- Bateson, J. B., Isolation of the crystalline parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis*. *Nature, London*, 205. 1965, 622.
- Begg, J. A., Microbial and chemical control of hornworms attacking tobacco in Ontario. *J. econ. Ent.* 57. 1964, 646-649.
- Benz, G., A toxic principle in the digestive fluids of *Pieris brassicae* (Linnaeus). *J. Insect Path.* 4. 1962, 492-495.
- , Die Pufferkapazität von Blut und Verdaungssaft von *Pieris brassicae* und der Einfluß von Anoxie und *Bacillus thuringiensis*-Endotoxin auf die Permeabilität der Darmwand. *J. Insect Physiol.* 12. 1966a, 137-151.
- , On the chemical nature of the heat-stable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Experientia* 22. 1966 b, 81-82.
- , and Borusiewicz, K., A method for the differential staining of spores and parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* Berliner, and *Bacillus fribourgensis* Wille. *J. Insect Path.* 5. 1963, 393-394.



- Berliner, E., Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Ztschr. angew. Ent. 2. 1915, 29–56.
- Biliotti, E., Relations entre agents pathogènes et entomophages. Entomophaga 1. 1956, 101–103.
- Bonnefoi, A., Procédé d'obtention de produits biologiques pour la lutte contre les insectes nuisibles à l'agriculture. Franz. Patent No. 1 225 179 (1960).
- , et De Barjac, H., Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga 8. 1963, 223–229.
- Bonventre, P. F., Differential cytotoxicity of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* culture filtrates. J. Bact. 90. 1965, 284–285.
- , and Eckert, N. J., Toxin production as a criterion for differentiating *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. J. Bact. 85. 1963, 409–491.
- Borgatti, A. L., and Guyer, G. E., Formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner found to be contaminated with chlorinated hydrocarbon insecticides. J. econ. Ent. 55. 1962, 1015–1016.
- , and — The effectiveness of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner on house-fly larvae. J. Insect Path. 5. 1963, 377–384.
- Briggs, J. D., Reduction of adult house-fly emergence by the effects of *Bacillus* spp. on the development of immature forms. J. Insect Path. 2. 1960a, 418–432.
- , Flask-tank setup now turns out first „bug-killbug“ insecticide. Chem. engin., New York, 67. 1960b, 41–44.
- , Commercial production of insect pathogens. In: Steinhau, E. A., edit. Insect Pathology: An advanced treatise, New York, London, 2. 1963, 519–548.
- , and Goodrich, R. C., Bioferm Report, Wasco, Calif. 17. Nov. 1959.
- , and —, Bioferm Report, Wasco, Calif. 5. April 1960.
- Broersma, D. B., and Buxton, J. A., A comparative study of the action of six crystalliferous bacteria on the cabbage looper. *Trichoplusia ni*. J. Invertebrate Path. 9. 1967, 58–69.
- Brown, E. R., 1959 zit. n. Steinhau 1959a.
- , and Cherry, W. B., Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. J. infect. Dis. 96. 1955, 34–39.
- , Moody, M. D., Treece, E. L., and Smith, C. W., Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* var. *mycoides*. J. Bact. 75. 1958, 499–509.
- Bucher, G. E., Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. J. Insect Path. 2. 1960, 172–195.
- , Angus, T. A., and Krywienczyk, J., Characteristics of a new strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner (Serotyp I) isolated from the Bumblebee wax moth. J. Invertebrate Path. 8. 1966, 485–491.
- Burdon, K. L., and Wende, R. D., On the differentiation of anthrax bacilli from *Bacillus cereus*. J. infect. Dis., 107. 1960, 224–234.
- Burgerjon, A., Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. Ann. Épiphyties 7. 1956, 675–684.
- , Titrage et définition d'une unité biologique pour les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga 4. 1959, 201–206.
- , Relation entre l'intoxication provoquée par *Bacillus thuringiensis* Berliner et la consommation chez *Pieris brassicae* L. Ann. Épiphyties 13. 1962, 59–72.
- , Adhésivité comparée de quelques préparations à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, sur feuillage soumis à un lessivage au laboratoire. Ann. Épiphyties 15. 1964. 73–84.

- , Principes thermostables dans les préparations industrielles à base de *Bacillus thuringiensis*. Berliner. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 227—237.
- , Le titrage biologique des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Berliner par réduction de consommation au laboratoire de la Minière. Entomophaga 10. 1965, 21—26.
- , 1966; zit. n. B u r g e s und Mitarb. 1967b.
- , et D e B a r j a c , H., Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 251. 1960, 911—912.
- , et —, Essais préliminaires sur le rôle insecticide de la toxine thermostable produite par *Bacillus thuringiensis* Berliner. Verh. 11. Int. Kongr. Ent., Wien 1960. 2. 1962, 835—839.
- , et —, Étude de la toxine soluble thermostable chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 221—226.
- , and B i a c h e , G., The activity of the heat-stable of *Bacillus thuringiensis* Berliner used in nature against the larvae of *Diprion pini* (Linnaeus). J. Insect Path. 6. 1964, 538—541.
- , et —, Alimentation au laboratoire de *Perillus bioculatus* Fabr. avec des larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say intoxiquées par la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga 11. 1966, 279—284.
- , et —, Contribution à l'étude du species d'activité de différentes souches de *Bacillus thuringiensis*. Ent. exp., appl. 10. 1967 a, 211—230.
- , et —, Effets tératologiques chez les nymphes et les adultes d'insectes, dont les larves ont ingéré des doses subléthales de toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 264. 1967 b, 2423—2325.
- , and G a l i c h e t , P. F., The effectiveness of the heat-stable toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on larvae of *Musca domestica* Linnaeus. J. Invertebrate Path. 7. 1965, 263—264.
- , G r i s o n , P., and K a c h k o u l i , A., Activity of the heatstable toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Locustidae, Orthoptera). J. Insect Path. 6. 1964, 381—383.
- , et Y a m v r i a s , C., Titrage biologique des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-à-vis de *Anagasta (Ephestia) kühniella* Zell. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 249. 1959, 2871—2872.
- B u r g e s , H. D., Insect pathogens and microbial control of insects in stored products. I. Test with *Bacillus thuringiensis* Berliner against moths. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 323—327.
- , The standardisation of products based on *Bacillus thuringiensis*. Meded. Rijksfac. Landbouwwetensch. Gent 31. 1966, 536—546.
- , The standardization of products based on *Bacillus thuringiensis*. — Insect Pathology and Microbial Control. Intern. Coll. Wageningen 1966. (P. A. v. d. L a a n edit.) Amsterdam, 1967 a, 306—312.
- , Standardization of *Bacillus thuringiensis* Products: Homology of the standard. Nature 215. 1967 b, 664—665.
- , et al., The standardization of *Bacillus thuringiensis*: Tests on three candidate reference materials. — Insect Pathology and Microbial Control. Intern. Coll. Wageningen 1966. (P. A. v. d. L a a n edit.) Amsterdam, 1967, 314—337.
- , and C a m m e l l , M. E., Use of *Bacillus thuringiensis* to protect broodcomb from moths. In: Pest Infest. Res. 1964 (1965a), 16.
- , and —, Transmission of *Bacillus thuringiensis*. In: Pest Infest. Res. 1964 (1965b), 17.

- Burns, E. C., Wilson, B. H., and Tower, B. A., Effect of feeding *Bacillus thuringiensis* to caged layers for fly control. *J. econ. Ent.* 54. 1961, 913—915.
- Canale-Parola, E., A red pigment produced by aerobic sporeforming bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 46. 1963, 414—427.
- Cantwell, G. E., and Franklin, B. A., Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 256—258.
- , Heimpel, A. M., and Thompson, M. J., The production of an exotoxin by various crystal-forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 6. 1964a, 466—480.
- , Knox, D. A., Lehnert, T., and Michael, A. S., Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies treated with certain biological insecticides. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 228—233.
- , —, and Michael, A. S., Mortality of honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus, fed exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 6. 1964b, 532—536.
- Cavalli-Sforza, L., Grundbegriffe der Biometrie — insbesondere der statistischen Methoden bei der Wertmessung biologisch wirksamer Substanzen. Stuttgart 1964. 209 p.
- Cella, G., e Giordani, G., Ricerche sull'attività del *Bacillus thuringiensis* Berliner in riguardo all'*Apis mellifera* L. *Boll. Ist. Ent. Univ. Bologna* 28. 1965/66. 141—173.
- Černov, A. V., (Technologische Gewinnung des Trockenpräparates „Dendrobazillin“ zur Bekämpfung von *Dendrolimus sibiricus*). In: Talalajeva, E. V., edit. *Ispol. Mikroorgan. dlja Bor'by s vred. Nasekom. Les. Vost. Sibiri. Izv. biol.-geogr. naučn issled. Inst. pri Irkutsk Gosudarst. Univ. im. Ždanova*, 19. 1965, 41—55. (Russ.)
- Chačatryan, L. S., i Rautenštejn, J. I., (A comparative study of some phages of bacteria of the *Bacillus cereus-thuringiensis* group). *Mikrobiologija. Moskva*, 32. 1963, 813—818. (Russ.)
- Charles, P. J., Note sur l'application des méthodes de lutte microbiologique contre les Acridiens. *Congr. Protect. Cult. Tropic. Marseille* 1965, 1965, 851—854.
- Conner, R. M., and Hansen, P. A., Effects of Valine, Leucine, and Isoleucine on the growth of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. *J. Invertebrate Path.* 9. 1967a, 12—18.
- , and —, Effect of Valine, Leucine, and Isoleucine on the production of fly toxin by *Bacillus thuringiensis* and related organisms. *J. Invertebrate Path.* 9. 1967b. 114—125.
- Cosenza, B. J., and Lewis, F. B., Taxonomic considerations of four "Wild"-type crystalliferous bacilli and their toxicity to larvae of the gypsy moth, *Porthetria dispar*. — *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 520—525.
- Cook, A. M., and Lund, B. M., Total counts of bacterial spores using counting slides. *J. gen. Microbiol.* 29. 1962, 97—104.
- Cope, O. B., (Report USDI, Fish and Wildlife Serv., 27. April 1960) zit. n. Druckschrift „Thuricide 90 TS Flowable“, Bioferm Corp. Wasco, Calif. 1965.
- Corlett, G. R., Investigations of the effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on mammals. (Univ. Ottawa Publ., Jan. 1961) zit. n. Druckschrift „Thuricide 90 TS Flowable“, Bioferm Corp. Wasco, Calif. 1965.
- Le Corroller, Y., À propos de la transformation de souches banales de *B. cereus* Frank. et Frank. en souches cristallophores pathogènes pour les insectes. *Ann. Inst. Pasteur* 94. 1958, 670—673.

- Creighton, C. S., Cuthbert jr., F. P., and Reid jr., W. J., Evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in control of caterpillars on cabbage. *J. Insect Path.* 6. 1964, 102–110.
- David, J., et Vago, C., Influence des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur divers caractères physiologiques de Drosophiles adultes. *Entomophaga* 12. 1967, 153–159.
- Doane, C. C., Field tests with newer materials against the Gypsy moth. *J. econ. Ent.* 59. 1966, 618–620.
- , and Hitchcock, S. W., Field tests with an aerial application of *Bacillus thuringiensis*. Connecticut agric. Exp. Sta. Bull. 665. 1964, 20 p.
- , and Wallis, R. C., Enhancement of the action of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on *Porthetria dispar* (Linnaeus) in laboratory tests. *J. Insect Path.* 6. 1964, 423–429.
- Drake, B. D., and Smythe, C. V., Process for making pesticidal compositions. US Patent No. 3 087 865. 1963.
- Dunn, P. H., Control of house flies in bovine feces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 2. 1960, 13–16.
- Eckert, J., zit. n. Fisher und Rosner 1959.
- Estes, Z. E., und Faust, R. M., 1964 zit. n. Heimpele 1965.
- Ettlinger, L., Diskussionsbemerkung zu Lysenko 1964: Colloq. Int. Path. Insectes, Lutte Microbiol. (Paris, 1962) — *Entomophaga, Mém. hors Sér.* 2. 1964, 268.
- Evlachova, A. A., i Švecova, O. I., (Die Auslese virulenter Formen von Mikroorganismen zur Verwendung bei der mikrobiologischen Bekämpfung schädlicher Insekten). *Mikrobiol. metod Bor'by s vred. Nasekom.*, Moskva, 1963, 24–34. (Russ.)
- Fankhänel, H., Über Versuche zur Verwendung von Bakterienmittel gegen Forstschädlinge in Laboratorium und Freiland. *Nachr.bl. dtsh. Pflschutzd.*, Berlin, N. F. 16. 1962, 121–127.
- Fast, P. G., and Angus, T. A., Effects of parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* Ishiwata on the permeability of the gut wall of *Bombyx mori* (Linnaeus) larvae. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 29–32.
- Faust, R. M., and Estes, Z. E., Silicon content of the parasporal crystal of several crystalliferous bacteria. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 141–144.
- Fedorinčik, N. S., (Ergebnisse der Erprobung von Entobakterien). *Zašč. Rast.*, Moskva, 9 (11). 1964a, 20–22. (Russ.)
- , Les facteurs déterminant l'efficacité des biopréparations dans la protection des végétaux. *Entomophaga, Mém. hors Sér.* 2. 1964b, 51–61.
- Feigin, J. M., Exposure of the house fly to selection by *Bacillus thuringiensis*. *Ann. ent. Soc. Amer.* 56. 1963, 878–879.
- Fish, D. C., Isolation and purification of anthrax toxin. *Bact. Proc.*, Baltimore, 1966, 41 p.
- Fisher, R. A., Bioassay of microbial pesticides. In: Zweig, G. edit., *Analytic methods for pesticides and food additives*. New York. 1. 1963, 425–442.
- , and Rosner, L., Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide. *J. agric. Food Chem.*, Washington, 7. 1959, 686–688.
- Fitz-James, P. C., and Young, E. I., Comparison of species and varieties of the genus *Bacillus*. Structure and nucleic acid content of spores. *J. Bact.* 78. 1959, 743–754.
- Flanders, R., and Hall, I. M., Manipulated bacterial epizootics in *Anagasta* populations. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 368–377.
- Franz, J. M., Biologische Schädlingsbekämpfung. In: Sorauer, P. edit., *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*, 6. Bd., 3. Lfg., Berlin, 1961 a, 2. Aufl. 1–302.

- , Bibliographie über biologische Bekämpfung VI. *Entomophaga* 6. 1961 b, 277—329.
- , Bibliographie über biologische Bekämpfung VII. *Entomophaga* 8. 1963, 89—161.
- , Bibliographie über biologische Bekämpfung X. *Entomophaga* 11. 1966a, 11—113.
- , Praktische Aspekte der mikrobiologischen Bekämpfung von Schadinsekten. Meded. Rijksfac. Landbouwwetensch. Gent 31. 1966b, 512—524.
- , Bibliographie über biologische Bekämpfung XI. *Entomophaga* 12. 1967a, 5—80.
- , Zur Bestimmung des Wirkungsgrades einer mikrobiologischen Bekämpfung von Schadinsekten. Abstr. 6. Int. Pfl.schutz-Kongr., Wien 1967, 1967 b, 77.
- , und L a u x, W., Bibliographie über biologische Bekämpfung VIII. *Entomophaga* 8. 1963, 263—321.
- , und —, Bibliographie über biologische Bekämpfung IX. *Entomophaga* 9. 1964, 311—389.
- , und K r i e g, A., *Bacillus thuringiensis*-Präparate gegen Forstschädlinge — Erfahrungen in der Alten Welt. Gesunde Pflanzen 19. 1967, 175—182.
- , —, und R e i s c h, J., Freilandversuche zur Bekämpfung des Eichenwicklers (*Tortrix viridana* L.) (Lep., Tortricidae) mit *Bacillus thuringiensis* im Forstamt Hanau. Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., Braunschweig, 19. 1967, 36—44.
- G a l i c h e t, P.-F., Administration aux animaux domestiques d'une toxine thermostable sécrétée par *Bacillus thuringiensis* Berliner en vue d'empêcher la multiplication de *Musca domestica* Linnaeus dans les fèces. Ann. Zootech. 15. 1966, 133—145.
- G i b s o n, N. H. E., and W o l f, J., Environmental humidity and the susceptibility of larvae of *Anagasta kühniella* Zell. to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*, Mém. hors Sér. 2. 1964, 329—336.
- G i n g r i c h, R. E., *Bacillus thuringiensis* as a feed additive to control dipterous pests of cattle. J. econ. Ent. 58. 1965, 363—364.
- , and E s c h l e, J. L., Preliminary report on the larval development of the horn fly, *Haematobia irritans*, in feces from cattle given fractions of a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebrate Path. 8. 1966, 285—287.
- G o c h n a u e r, T. A., 1960 zit. n. N o r r i s 1961.
- G o d o v a r i b a i, S., K r i s h n a m u r t h y, K., and M a j u m d e r, S. K., Bacterial spores with malathion for controlling *Ephestia cautella*. Pest Technol. 4: 1962, 155—158.
- G o ł e b i o w s k a, Z., (Effect of environmental factors on efficiency of *Bacillus thuringiensis* microbial insecticide on *Ephestia kühniella* Zeller). Prace nauk. Inst. Ochr. Rośl. 6. (2), 1964, 123—144. (Poln.)
- G r e e n w o o d, E. S., *Bacillus thuringiensis* in the control of *Lucilia sericata* and *Musca domestica*. New Zealand J. Sci. 7. 1964, 221—226.
- G r e l e t, N., 1966 zit. n. D e B a r j a c und Mitarb. 1966.
- G r i g o r o v a, R., Deux souches de *Bacillus thuringiensis* Berliner isolées des chenilles du *Bombyx dispar* *Lymantria dispar*. *Entomophaga*, Mém. hors Sér. 2. 1964, 179—191.
- , and K a l u c h e v a, I., Electron microscopic investigations on the shape of the crystals of six strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Dokl. bolgar. Akad. Nauk 19. 1966, 1075—1078.
- G u k a s j a n, A. B., (Die Anfälligkeit der Bienen für die Erreger der Krankheit des Sibirischen Spinners). Pčelovodstvo, (11), 1958 a, 46—48. (Russ.)
- , (Bakteriostatische und bakterizide Wirkung von Koniferennadeln und ihren Komponenten auf Krankheitserreger von *Dendrolimus sibiricus*). Izv. Akad. Nauk SSSR, Sibirsk. Otd., (7), 1958b, 95—101. (Russ.)

- , (Bakteriologische Bekämpfung von *Dendrolimus sibiricus* in Tuva). Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol., 28. 1963, 115–125. (Russ.)
- , i Mašanov, A. I., (Einfluß von Röntgen- und Gamma-Strahlung auf die Virulenz des entomopathogenen Bacteriums *Bacillus thuringiensis* Krass. et Guk.). In: Gukasjan, A. B., edit., Mikroorganizmy v Bor'be s Vredit. lesn. Choz., Moskva, 1966, 233–244. (Russ.)
- Hall, I. M., Microbial control. In: Steinhau, E. A. edit., Insect Pathology: An advanced treatise, New York, London 2. 1963, 477–517.
- , and Andres, L. A., Field evaluation of commercially produced *Bacillus thuringiensis* Berliner used for control of lepidopterous larvae on crucifers. J. econ. Ent. 52. 1959, 877–880.
- , and Stern, V. M., Comparison of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *thuringiensis* and chemical insecticides for control of the alfalfa caterpillar. J. econ. Ent. 55. 1962, 862–865.
- Hannay, C. L., Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, London, 172. 1953, 1004.
- , Inclusions in bacteria. In: Bact. Anatomy, Symp. Soc. gen. Microbiol. 6. 1956, 318–340.
- , and Fitz-James, P. C., The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Canad. J. Microbiol. 1. 1955, 694–710.
- Harvey, J. L., Exemption from requirement of tolerance for residues of viable spores of microorganism *Bacillus thuringiensis* Berliner. US Federal Register, Rules and Regulations, 1960, 3207–3208.
- Harvey, T. L., and Brethour, J. R., Feed additives for control of house fly larvae in livestock feces. J. econ. Ent. 53. 1960, 774–776.
- , and Howell, D. E., Resistance of the house fly to *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Invertebrate Path. 7. 1965, 92–100.
- Hauke, H., Die Bedeutung der aeroben Sporenbildner für die Lebensmittelhygiene. Wiss. Ztschr. Univ. Leipzig, Math.-naturwiss. Reihe, 10. 1961, 303–305.
- Hawkins jr., D., Chao, K. C., and Williams, R. P., Iron requirement for pigment formation by *Bacillus anthracis*. Bact. Proc., Baltimore, 1963, 52.
- Heimpel, A. M., The specificity of the pathogen *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner for insects. Proc. 12. Int. Congr. Ent., London 1964 (1965), 736.
- , A crystalliferous bacterium associated with a "blister disease" in the earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny). J. Invertebrate Path. 8. 1966, 295–298.
- , A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Ent. 12. 1967, 287–322.
- , and Angus, T. A., The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. Canad. J. Microbiol. 4. 1958, 531–541.
- , and —, The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Path. 1. 1959, 152–170.
- , and —, Bacterial insecticides. Bact. Rev. 24. 1960, 266–288.
- Heitor, F., Persistence de la virulence de bactéries entomopathogènes du groupe *thuringiensis*. Rev. Path. vég. 40. 1961, 13–16.
- , Sensibilité vis-à-vis de *Bacillus thuringiensis* des insectes nuisibles aux ruches: *Galleria mellonella* L. et *Achroia grisella* Fabr. Verh. 11. Int. Kongr. Ent., Wien 1960, 2. 1962, 845–949.
- Herfs, W., Zur Technik der Wirksamkeitsbestimmung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten (Sporen-, Endotoxin-Komplex) an Raupen im Laboratorium. Entomopatha 8. 1963, 163–181.

- , Untersuchungen zur Wirksamkeit von Industrie-Präparaten des *Bacillus thuringiensis* Berliner gegen die Große Wachsmotte (*Galleria mellonella* (L.)). Ztschr. angew. Ent. 54, 1964, 233—237.
- , Zur praktischen Anwendung von „Hoechst 2802 Biospor Spritzpulver“ (*Bacillus thuringiensis*) im Obst- und Weinbau sowie an einer Feldhecke. Ztschr. Pfl.krankh., 72. 1965a, 65—77.
- , Die Verträglichkeit von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten mit chemischen Pflanzenschutzmitteln und mit Beistoffen. Ztschr. Pfl.krankh. 72. 1965b, 584—599.
- , Beitrag zur Erklärung gelegentlicher Mißerfolge bei der praktischen Anwendung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten. Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., Braunschweig, 18. 1966, 25—29.
- , und K r i e g, A., Untersuchungen zur Beurteilung der Wirksamkeit industrieller Präparate von *Bacillus thuringiensis* Berliner für die Bekämpfung des Kohlweißlings (*Pieris brassicae* (L.)). Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., Braunschweig, 15. 1963, 49—54.
- H i l l, L. R., An index to deoxyribonucleic acid base compositions of bacterial species. J. gen. Microbiol. 44. 1966, 419—437.
- H i t c h i n g s, D. L., *Bacillus thuringiensis*: A reproduction inhibitor for southern armyworm. J. econ. Ent. 60. 1967, 596—597.
- H o l m e s, K. C., and M o n r o, R. E., Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. mol. Biol. 14. 1965, 572—581.
- H o l t m a n n, K. H., Der Nachweis von *Bacillus thuringiensis* auf Gemüsepflanzen sowie das Verhalten seines Endotoxins gegenüber einigen Fermenten. Diss. Goethe-Univ. Frankfurt/M. 1960. 80 p.
- H o o p i n g a r n e r, R., and M a t e r u, M. E. A., The toxicology and histopathology of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Galleria mellonella* (Linnaeus). J. Insect Path. 6. 1964, 26—30.
- H u a n g, S.-S., and T a m a s h i r o, M., The susceptibility of *Cactoblastis cactorum* (Berg) to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Proc. Hawaii ent. Soc. 19. 1965, 213—221.
- I g n o f f o, C. M., The susceptibility of *Pectinophora gossypiella* (Saunders) to intrahemocoelic injections of *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Insect Path. 4. 1962, 34—40.
- , Sensitivity spectrum of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner to antibiotics, sulfonamides, and other substances. J. Insect Path. 5. 1963, 395—397.
- , Possibilities of mass-producing insect pathogens. — Insect Pathology and Microbial Control. Intern. Coll. Wageningen 1966. (P. A. v. d. L a a n edit.) Amsterdam, 1967, 91—117.
- , and D u t k y, S. R., The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of *Bacillus* and *Beauveria* spores and cabbage looper nuclear-polyhedrosis virus. J. Insect Path. 5. 1963, 422—426.
- I s a k o v a, N. P., (Eine neue Varietät von Bakterien eines für Insekten pathogenen Typs von *Bacillus cereus* Fr.). Dokl. Vses. Akad. sel'skochoz. Nauk Lenina 23. 1958, 28—27. (Russ.)
- , Le rôle de la microflore intestinale de l'insectes dans la pathogénèse de l'affection provoquée par *Bacillus cereus* var. *galleriae*. Entomophaga, Mem. hors Sér. 2. 1964, 175—178.
- , (Entomophagen und bakterielle Infektion). Zašč. Rast., Moskva, 10. (3). 1965, 51. (Russ.)

- , und Moiseeva, T. S., Der Einfluß der bakteriellen Infektion auf die Kohleule (*Barathra brassicae* L.) und ihre Abwehrreaktion gegenüber Endoparasiten. Abstr. 6. Int. Pfl.schutz-Kongr., Wien 1967, 1967, 78–79.
- Jalovicin, M. V., Some questions on the toxigenicity of sporeforming entomogenous crystalliferous bacteria. 9. Int. Congr. Microbiol., Moscow 1966, Abstr. 1966, 313.
- Jacques, R. P., The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on the fauna of an apple orchard. Canad. Entomologist 97. 1965, 795–802.
- Johansen, C., Impregnated foundation for waxmoth control. Glean. Bee Cult., Medina, 90. 1962, 682–684.
- Johnson, C. E., and Bonventre, P. F., Studies on the lethal toxin of *Bacillus cereus*. Bact. Proc., Baltimore, 1966, 41.
- Kabay, A., Untersuchungen über einen aus *Melolontha melolontha* isolierten Stamm von *Bacillus cereus*. Diss. Zürich 1965. 50 p.
- Kaesler, W., 1957, zit. n. Krieg und Franz 1959.
- Keynan, A., Evenchick, Z., Halvorson, H. O., and Hastings, J. W., Activation of bacterial endospores. J. Bact. 88. 1964, 313–318.
- Klein, W. H., and Lewis, F. B., Experimental spraying with *Bacillus thuringiensis* for control of the spruce budworm. J. Forestry 64. 1966, 458–462.
- Kneitz, G., Mitteilung zur Wirkung von *Bacillus thuringiensis* auf Waldameisen (Hym., Formicidae). Waldhygiene 6. 1966, 183–187.
- Knisely, R. F., Differential media for the identification of *Bacillus anthracis*. J. Bact. 90. 1965, 1778–1783.
- , Selektive medium for *Bacillus anthracis*. J. Bact. 92. 1966, 784–786.
- Komjagin, A. J., Poltev, V. J., i Lobanov, A. V., (Staatliche Prüfung bakteriologischer Methoden zur Bekämpfung von *Dendrolimus sibiricus*). In: Čerepanov, A. J. edit., Issled. po biol. metod bor'by s vredit. sels'k. i lesn. choz. (Dokl. k simp., 17.–20. Nov. 1964). Akad. Nauk SSSR, Sibirsk. Otd., Novosibirsk, (2). 1965, 14–18. (Russ.)
- Krassilnikov, N. A., i Gukasjan, A. B., (*Bacillus tuiensis* n. sp. — A new excitant of the disease of the Siberian silkworm). Mikrobiologija, Moskva, 33. 1964, 664–671. (Russ.)
- Krepkich, L. J., (Über gewisse physiologisch-chemische Eigenschaften von entomopathogenen Mikroorganismen). In: Gukasjan, A. B. edit., Mikroorganizmy v Bor'be s Vredit. lesn. Choz., Moskva 1966, 204–211. (Russ.)
- Krieg, A., *Bacillus thuringiensis* Berliner. Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung (In memoriam Dr. Ernst Berliner (1880–1957)). Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem H. 103. 1961, 79 p.
- , Neues über insektenpathogene, kristallbildende Bazillen. Anz. Schädl.kde 35. 1962, 182–188.
- , Crystalliferous bacteria. In: Recent Progr. Microbiol., Symposia, 8. Int. Congr. Microbiol., Montreal, 1962, (1963), 134–140.
- , Über die Bienenverträglichkeit verschiedener Industrie-Präparate des *Bacillus thuringiensis*. Anz. Schädl.kde 3. 1964 a, 39–40.
- , *Bacillus thuringiensis* Berliner und seine Wirkung auf die Mehlmotte *Anagasta kühniella* (Zell.). Ztschr. angew. Zool. 51. 1964b, 13–23.
- , *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) — Vegetative Vermehrung und Sporenbildung. In: Wolf, G. edit., Encyclopedia cinematographica E 555/1963. Göttingen 1964 c, 9 p.
- , Identifizierung von *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in mikrobiologischen Präparaten durch Kombination von Immunfluoreszenz- und Phasenkontrast-Verfahren. Zentralbl. Bakt. I. Abt. 197. 1965a, 527–532.



- , Über die in vivo-Titration (Bioassay, Biotest) von Insektenpathogenen, speziell von *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga 10. 1965b, 3–20.
- , Über den Biotest von *Bacillus thuringiensis*-Exotoxin mit *Drosophila melanogaster*. Ent. exp., appl. 9. 1966, 185–190.
- , Über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*-Exotoxin auf die Wachsmotten-Raupen (*Galleria mellonella*). Anz. Schädl.kde 40. 1967, 8–9.
- , und Franz, J., Versuch zur Bekämpfung von Wachsmotten mittels Bakteriose. Naturwissenschaften 46. 1959, 22–23.
- , und Herfs, W., Über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* auf Bienen. Ent. exp., appl. 6. 1963a, 1–9.
- , und —, Empfindlichkeit verschiedener Insektenarten gegenüber dem „Exotoxin“ von *Bacillus thuringiensis* Berliner. Ztschr. Pfl.krankh. 70. 1963b, 11–21.
- , und Schmidt, L., Über die Möglichkeiten einer mikrobiologischen Bekämpfung von *Hyphantria cunea* (Drury). Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., Braunschweig, 14. 1962, 177–182.
- Krywienczyk, J., and Angus, T. A., A serological comparison of the parasporal bodies of three insect pathogens. J. Insect Path. 2. 1960, 411–417.
- , and —, Serological studies of the protein parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* Ishiwata. J. Invertebrate Path. 7. 1965, 175–179.
- , and —, Serological studies of the protein parasporal inclusions of *Bacillus entomocidus* var. *entomocidus*. J. Invertebrate Path. 8. 1966, 439–441.
- , and —, A serological comparison of several crystalliferous insect pathogens. J. Invertebrate Path. 9. 1967, 126–128.
- Kudler, J., a Lysenko, O., (Biological control of satin moth (*Leucoma salicis* L.) by pathogenic microorganisms). Lesn. Časopis, Praha, 9. 1963, 787–798. (Tschech.)
- Küthe, K., Frostspanner- (*Cheimatobia brumata* L.) und Gespinstmotten- (*Hyponomeuta padella* L.) bekämpfung mit *Bacillus thuringiensis* Berliner. Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem. H. 115. 1965, 55–59.
- Kulagin, V. S., i Lebedeva, N. P., (Ergebnisse der Überwachung von durch *Bacillus dendrolimus* verursacht Epizootien bei einem Großversuch im Forstrevier von Usuglinsk). In: Talalaeva, E. V. edit., Ispol. Mikroorgan. dlja Bor'by s vred. Nasekom. Les. Vost. Sibiri. Izv. biol.-geogr. naučn.-issled. Inst. pri Irkutsk Gosudarst. Univ. im. Ždanova, 19. 1965, 29–34. (Russ.)
- Kulikov, V. S., (Die mikrobiologische Methode im Kampf gegen die Motte). Pčelovodstvo (10), 1966, 29. (Russ.)
- Kurstak, E., Le processus de l'infection par *Bacillus thuringiensis* Berl. d'*Ephestia kühniella* Zell. déclenché par le parasitisme de *Nemeritis canescens* Grav. (Ichneumonidae). Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 259. 1964, 211–212.
- , Action de la bactérie *Bacillus thuringiensis* Berliner sur des cellules sanguines d'*Ephestia kühniella* Zeller (Lepidoptera). Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 260. 1965, 2368–2370.
- Kushner, D. J., and Harvey, G. T., Antibacterial substances in leaves: Their possible role in insect resistance to disease. J. Insect Path. 4. 1962, 155–184.
- , and Heimpel, A. M., Lecithinase production by strains of *Bacillus cereus* Fr. et Fr. pathogenic for the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Htg.). Canad. J. Microbiol. 3. 1957, 547–551.
- VanderLaan, P. A., and Wassink, H. J. M., Control of tent caterpillar (*Malacosoma neustria*) with *Bacillus thuringiensis* in the city of Amsterdam. Tijdschr. Plantenziekten, 68. 1962, 143–146.

- , and —, Susceptibility of different species of stored-products moth-larvae to *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 315—322.
- L a b a w, L. W., The structure of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals. J. Ultrastruct. Res. 10. 1964, 66—75.
- L a m a n n a, C., and J o n e s, L., Antigenic relationship of the endospores of *Bacillus cereus*-like insect pathogens to *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. J. Bact. 81. 1961, 622—625.
- , and —, Lethality for mice of vegetative and spore forms of *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus*-like insect pathogens injected intraperitoneally and subcutaneously. J. Bact. 85. 1963, 532—535.
- L a n g e, R., Versuche mit *Bacillus thuringiensis* Berliner an der Kahlrückigen Waldameise (*Formica polyctena* Först.). Allg. Forstztzsch. 21. 1966, 526.
- L a u r e n t, J. E., Élevage permanent d'*Athalia colibri* (Christ) (Tenthredinidae) en vue de tester la toxine soluble thermostable de *Bacillus thuringiensis*. Bull. Éc. nat. sup. agron., Nancy, 7. 1965, 79—91.
- L e c a d e t, M.-M., La toxine figurée de *Bacillus thuringiensis*. Technique de séparation et composition en acides aminés. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 261. 1965, 5693—5696.
- , La toxine figurée de *Bacillus thuringiensis*. Dissolution par action du thioglycolate ou de la cystéine. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 262. 1966, 195—198.
- , et M a r t o u r e t, D., Étude comparée de l'hydrolyse enzymatique des cristaux des souches *Bacillus thuringiensis* serotype I Berliner et *B. thuringiensis* serotype III Anduze. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 205—212.
- , and —, The enzymic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Berliner crystals, and the liberation of toxic fractions of bacterial origin by the chyle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). J. Invertebrate Path. 7. 1965, 105—108.
- L e c o m t e, J., et M a r t o u r e t, D., Non toxicité pour les abeilles, des traitements à base de *Bacillus thuringiensis*, souche Anduze. (Bactérie pathogène pour les larves de Lépidoptères). Ann. abeille, Paris, 2. 1959, 171—175.
- L e i b, E., Pflanzenschutz, Gesundheitsschutz, Naturschutz. Staatliche Initiative für eine sinnvolle Koordinierung. Ztschr. Pfl.krankh. 72. 1965, 217—223.
- L e m o i g n e, M., B o n n e f o i, A., B é g u i n, S., G r i s o n, P., M a r t o u r e t, D., S c h e n k, A., et V a g o, C., Essais d'utilisation de *Bacillus thuringiensis* Berliner contre *Pieris brassicae* L. Entomophaga 1. 1956, 19—34.
- L e s k o v a, A. J., (Bacterial preparation to control cabbage pests). Zašč. Rast., Moskva, 5. (6). 1960, 31—32. (Russ.)
- , (Versuche zur Verwendung des Bakterienpräparates Entobakterien-3 zur Bekämpfung von *Hyponomeuta malinella* Zell.). Bjull. Vsesojuzn. naučn.-issled. Inst. Zašč. Rast., (3/4). 1961, 50—53. (Russ.)
- , (Pathologische Veränderungen der Haemolymphe von Raupen der Apfelmotte durch Infektion mit Entobakterin). In: Č e r e p a n o v, A. I. edit., Issled. po biol. metod bor'by s vredit. sel'skogo. i lesn. choz. (Dokl. k simp., 17.—20. Nov. 1964). Akad. Nauk SSSR, Sibirsk. Otd., Novosibirsk, 1964, 61—64. (Russ.)
- , (Die Wirkung von Entobakterin und einiger entomopathogener kristallbildender Bakterien auf die Hausfliege). In: R i š, M. A. edit., Biol. Metod Bor'by s vredit. sel'skogo, lesn. choz. i karant. sorn. Izd. Fan, Taškent, 1966, 124—125. (Russ.)
- , i K u l i k o v, N. S., (Wirkung von Entobakterin-3 und Thuricide auf Bienen). Pčelovodstvo 40. 1963, 32—33. (Russ.)
- L e w i s, F. B., and C o n n o l a, D. P., Field and laboratory investigations of *Bacillus thuringiensis* as a control agent for the gypsy moth, *Porthetria dispar* (L.). US Forest Serv. Res. Pap. NE-50, 1966, 38 p.

- Lysenko, O., 1960, zit. n. Heimpel and Angus 1960.
- , The taxonomy of entomogenous bacteria. In: Steinhaus, E. A. edit., *Insect Pathology: An advanced treatise*, New York, London, 2. 1963, 1–20.
- , Some thoughts to the taxonomy of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*. Mém. hors Sér. 2. 1964, 239–244.
- Maas Geesteranus, H. P., Noordink, J. P. W., and van den Anker, C. A., A bioassay to characterize strains and preparations of *Bacillus thuringiensis* Berliner. — *Insect Pathology and Microbial Control*. Intern. Coll. Wageningen 1966. (P. A. v. d. Laan edit.) Amsterdam, 1967, 302–306.
- Martouret, D., Applications diverses et normes d'utilisation de *Bacillus thuringiensis* Berliner souche "Anduze". *Entomophaga* 4. 1959, 211–220.
- , Les toxines de *Bacillus thuringiensis* et leur processus d'action chez les larves de lépidoptères. *Meded. Landbouwhogeschool, Opzoek. stat. Gent* 26. 1961, 1116–1126.
- , Études préliminaires sur le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner vis-à-vis de *Pieris brassicae* L. *Verh. 11. Int. Kongr. Ent., Wien* 1960, 2. 1962, 849–855.
- , (persönl. Mitteilung) 1963.
- , and Euvette, G., The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner preparations on the honey bee under conditions of forced feeding. *J. Insect Path.* 6. 1964, 198–203.
- , Lhoste, J., et Roche, A., Action sur le mesenteron de *Pieris brassicae* L. de la toxine de l'inclusion parasporale de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga* 10. 1965, 349–365.
- , et Milaire, H., Expérimentation de produits bactériens à base de *Bacillus thuringiensis* à l'échelon agricole. *Phytiat.-Phytopharm.* 12. 1963, 71–80.
- Mašanov, A. I., (Einfluß von Röntgen- und Gamma-Strahlen auf die Virulenz des entomopathogenen Bacteriums *Bacillus insectus* Guk.) In: Gukasjan, A. B. edit., *Mikroorganizmy v Bor'be s Vredit. Lesn. Choz. Moskva*, 1966a, 223–232. (Russ.)
- , (Feld-Versuche mit solchen entomopathogenen Kulturen, die unter Verwendung von Röntgenstrahlen erhalten wurden.) In: Gukasjan, A. B. edit., *Mikroorganizmy v Bor'be s Vredit. Lesn. Choz. Moskva*, 1966b, 245–251. (Russ.)
- Matter, M. M., (persönl. Mitteilung) 1966.
- Mattes, O., Parasitäre Krankheiten der Mehlmotten-Larven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. (Zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien). *Sitzungsber. Ges. Beförderung ges. Naturwiss., Marburg*, 62. 1927, 382–417.
- McConnell, E., and Richards, A. G., The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects. *Canad. J. Microbiol.* 5. 1959, 161–168.
- McEwen, F. L., Glass, E. H., Davis, A. C., and Splittstoesser, C. M., Field tests with *Bacillus thuringiensis* Berliner for control of four lepidopterous pests. *J. Insect Path.* 2. 1960, 152–164.
- Mechalás, B. J., Method for the production of microbial insecticides. US Patent Nr. 3 086 922 (1963).
- , and Anderson, N. B., Bioassay of *Bacillus thuringiensis* Berliner-based microbial insecticides. II. Standardization. *J. Insect Path.* 6. 1964, 218–224.
- , and Beyer, O., Production and assay of extracellular toxins by *Bacillus thuringiensis*. *Development in industrial Microbiology* 4. 1963, 141–147.

- Menn, J. J., Bioassay of a microbial insecticide containing spores of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 2. 1960, 134–138.
- Metalnikov, S., Utilisation des microbes dans la lutte contre *Lymantria* et autres insectes nuisibles. *Compt. rend. Soc. Biol., Paris*, 105. 1930, 535–537.
- , et Metalnikov, S. S., Utilisation des bactéries dans la lutte contre les insectes nuisibles aux cotonniers. *Compt. rend. Soc. Biol., Paris*, 113. 1933, 169–172.
- Monro, R. E., Serological studies on the formation of protein parasporal inclusions in *Bacillus thuringiensis*. *J. biophys. biochem. Cytol.* 11. 1961a, 321–331.
- , Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J., Cambridge*, 81. 1961b, 225–232.
- Morrison, F. O., et Perron, J. M., Sensibilité des différentes stades larvaires de *Galleria mellonella* L. à *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Phytoprotection* 44. 1963. 106–115.
- Needler, A. W. H., (Report Fisheries Res. Board Canada, 4. Juli 1960), zit. n. Druckschrift „Thuricide 90 TS Flowable“, Bioferm Corp. Wasco, Calif. 1965.
- Nikodémusz, I., und Bouquet, D., Hygienisch-epidemiologische und bakteriologische Untersuchung bei einer durch *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftung. *Ztschr. Hyg.* 147. 1961, 327–335.
- , und Gonda, G., Beiträge zur Tierpathogenität aerober Sporenbildner. *Zentralbl. Bakt., I. Abt.* 189. 1963, 298–307.
- Norris, J. R., Bacteriophages of *Bacillus cereus* and of crystal-forming insect pathogens related to *B. cereus*. *J. gen. Microbiol.* 26. 1961, 167–173.
- , The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. appl. Bact.* 27. 1964, 439–447.
- , and Burges, H. D., Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects. Epizootiological applications. *J. Insect Path.* 5. 1963, 460–472.
- , and —, The identification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* 10. 1965. 41–47.
- , and Watson, D. H., An electron microscope study of sporulation and protein crystal formation in *Bacillus cereus* var. *alesti*. *J. gen. Microbiol.* 22. 1960. 744–749.
- , and Wolf, J., A study of antigens of the aerobic sporeforming bacteria. *J. appl. Bact.* 24. 1961, 42.
- Oatman, E. R., The effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on some lepidopterous larval pests, apple aphid predators, and on phytophagous and predaceous mites on young apple trees. *J. econ. Ent.* 58. 1965, 1144–1147.
- , and Legner, E. F., Additional studies of the effect of *Bacillus thuringiensis* on the eyespotted bud moth, *Spilonota ocellana*. *J. econ. Ent.* 57. 1964, 294.
- Pendleton, I. R., and Morrison, R. B., Analysis of the crystal antigens of *Bacillus thuringiensis* by gel diffusion. *J. appl. Bact.* 29. 1966a, 519–528.
- , and —, Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Nature, London*, 212. 1966b, 728–729.
- Petruchina, M. T., (Untersuchung über die Wirksamkeit eines Bakterienpräparates gegen Raupen der Apfelbaum-Gespinnstmotte in der Moldau-SSR). In: Telenga, N. A., Ščerbinovskij, N. S., i Djadečko, N. P. edit., *Biol. Metod Bor'by s Vredit. Rast., Kiev*, 1959, 101–105. (Russ.)
- Plurad, S. B., and Hartman, P. A., The fate of bacterial spores ingested by adult honey bees. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 449–454.
- Proom, H., and Knight, B. C. J. G., The minimal nutritional requirements of some species in the genus *Bacillus*. *J. gen. Microbiol.* 13. 1955, 474–480.

- Raun, E. S., Sutter, G. R., and Revelo, M. A., Ecological factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to the European corn borer and fall armyworm. *J. Invertebrate Path.* 88. 1966, 365—375.
- Rautenstejn J. L., Misiureva, N. G., i Chačatřjan, L. S., (Lysogenicity of *Bac. cereus* var. *galleriae* cultures and the peculiarities of the phages contained in them.) *Mikrobiologija*, Moskva, 33, 1964, 980—986. (Russ.)
- Ridet, J.-M., Variabilité de la sensibilité de *Lymantria dispar* L. à *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga* 11. 1966, 355—364.
- Roberts, T. L., and Rosenkrantz, H., Acetyl esterase in *Bacillus cereus* spores. *Canad. J. Biochem.* 44. 1966, 671—675.
- Rode, L. J., and Foster, J. W., Germination of bacterial spores by long-chain alkyl amines. *Nature*, London, 188. 1960, 1132—1134.
- Rogers, A. H., White, A. G., Wolf, J., and Gibson, N. E. H., The use of radioactivity for the assessment of dose in bioassays involving bacterial insect pathogens. — *Insect Pathology and Microbial Control*. Intern. Coll. Wageningen 1966. (P. A. v. d. Laan edit.) Amsterdam, 1967, 296—302.
- Rogoff, H. M., Crystal-forming bacteria as insect pathogens. *Advances appl. Microbiol.* 8. 1966, 291—313.
- Ruperez, A., Actividad patogena de varias cepas de *Bacillus thuringiensis* contra *Lymantria dispar* L. (Ensayo de un metodo de aplicaci3n). *Bol. Serv. Plagas forest.*, Madrid, 6. 1963, 147—148.
- Sebasta, K., Horská, K., and Vaňková, J., Isolation, purification and toxicity of a thermostable exotoxin from the strain of *Bacillus gelechiae* auct. — *Insect Pathology and Microbial Control*. Intern. Coll. Wageningen 1966 (P. A. v. d. Laan edit.) Amsterdam, 1967, 238—242.
- Seidel, G., Ein Versuch zur Differenzierung von *B. cereus* oder *B. anthracis* innerhalb eines Labortages. *Zentralbl. Bakt.*, I. Abt. 175. 1959, 433—436.
- Sekariah, P. C., and Seth, R. N., Studies on the bacterial flora on the intestinal tract of the honey bee (*Apis indica*). II. On the occurrence of *Bacillus thuringiensis* Berliner in foulbrood of honey bees in India *J. Indian Vet.* 36. 1959, 19—23.
- Semel, M., The efficiency of a polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* for control of the cabbage looper on cauliflower. *J. econ. Ent.* 54. 1961, 698—701.
- Shaikh, M. U., and Morrison, F. O., Susceptibility of nine insect species to infection by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 347—350.
- Shimanuki, H., Hartman, P. A., and Rothenbuhler, W. C., Effect of *Bacillus thuringiensis* on honey bee populations. *Bact. Proc.*, Baltimore, 63. 1963, 10.
- Sicker, W., Biotest von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten (Sporen-Endotoxin-Komplex) mit *Plutella maculipennis* (Curtis). *Ber. Wandervers. Dtsch. Ent.*, Dresden 1965, (*im Druck*).
- , und Krieg, A., Die Wirkung von *Bacillus thuringiensis*-Exotoxin auf *Plutella maculipennis* (Curtis). *Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd.*, Braunschweig, 18. 1966, 103—105.
- , Magnoler, A., und Huger, A., Über ein verzögertes Absterben von viruskranken Raupen des Ringelspinners, *Malacosoma neustria* (L.), nach Infektion mit einem *Bacillus thuringiensis*-Präparat. *Ztschr. Pfl.krankh.* 72. 1965, 599—605.
- Slein, M. W., and Logan, G. F., Mechanism of action of the toxin of *Bacillus anthracis*. II. Alkaline phosphatasemia produced by culture filtrates of various bacilli. *J. Bact.* 83. 1962, 359—369.

- , and —, Characterization of the phospholipases of *Bacillus cereus* and their effects on erythrocytes, bone and kidney cells. *J. Bact.* 90. 1965, 69–81.
- Smirnov, W. A., Color refraction in dark field to detect parasporal bodies of crystalliferous bacteria. *J. Insect Path.* 3. 1961, 216–217.
- , A staining method for differentiating spores, crystals, and cells of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *J. Insect Path.* 4. 1962, 384–386.
- , The formation of crystals in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner before sporulation at low-temperature incubation. *J. Insect Path.* 5. 1963a, 242–250.
- , Effect of urea on the formation of parasporal inclusions in species and varieties of *Bacillus cereus* group. *J. Insect Path.* 5. 1963b, 389–392.
- , and Berlinguet, L., A substance in some commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* toxic to sawfly larvae. *J. Invertebrate Path.* 8. 1966, 376–381.
- , and Heimpe, A. M., Notes on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner for the earthworm, *Lumbricus terrestris* Linnaeus. *J. Insect Path.* 3. 1961, 403–408.
- , and Hutchison, P. M., Bacteriostatic and bacteriocidal effects of extracts of foliage from various plant species on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 273–280.
- , and McLeod, C. F., Study of the survival of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner in the digestive tracts and in feces of a small mammal and birds. *J. Insect Path.* 3. 1961, 266–270.
- , and Perron, J. M., A method of determining the rate of development of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 320–324.
- Smith, H., The use of bacteria grown in vivo for studies on the basis of their pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 12. 1963, 77–102.
- Smythe, R. V., and Coppel, H. C., The susceptibility of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and other termite species to an experimental preparation of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 423–426.
- Sneath, P. H. A., The application of computers in taxonomy. *J. gen. Microbiol.* 17. 1957, 201–226.
- Splittstoesser, C. M., and McEwen, F. L., A bioassay technique for determining the insecticidal activity of preparations containing *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 3. 1961, 391–398.
- Stanley, J. L., and Smith, H., The three factors of anthrax toxin: their immunogenicity and lack of demonstrable enzymic activity. *J. gen. Microbiol.* 31. 1963, 329–337.
- Steiner, H., 1960 ref. bei Krieg 1961.
- Steinhaus, E. A., On the improbability of *Bacillus thuringiensis* Berliner mutating to forms pathogenic for vertebrates. *J. econ. Ent.* 52. 1959a, 506–508.
- , *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. *Hilgardia* 28. 1959b, 351–380.
- , The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. *J. Insect Path.* 2. 1960, 225–229.
- Stelzer, M. J., Susceptibility of the great basin tent caterpillar, *Malacosoma fragile* (Stretch), to a nuclear-polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Invertebrate Path.* 7. 1965, 122–125.
- Stephens, J. M., Disease in codling moth larvae produced by several strains of *Bacillus cereus*. *Canad. J. Zool.* 30. 1952, 30–40.

- Stuart, L. S., (Internal Report USDA, 27. Jan. 1961) Zit. n. Druckschrift „Thuricide 90 TS Flowable“ Bioferm Corp., Wasco, Calif. 1965.
- Stute, K., Über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* auf die Honigbiene (*Apis mellifera* L.). Nachr.bl. dtsh. Pfl.schutzd., Braunschweig, 15. 1963, 102–104.
- Sun, Y. P., Toxicity index — an improved method of comparing the relative toxicity of insecticides. J. econ. Ent. 43. 1950, 45–53.
- Sutter, G. R., and Raun, E. S., The effect of *Bacillus thuringiensis* components on the development of European corn borer. J. Invertebrate Path. 8. 1966, 457–460.
- , and —, Histopathology of European-corn-borer larvae treated with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebrate Path. 9. 1967, 90–103.
- Švecova, O. I., (Biologische Besonderheiten einiger entomophager Bazillen in Verbindung mit den in ihnen gebildeten kristallinen Einschlüssen.) In: Biol. Metod Bor'by s Vredit. sel'skochoz. Kul'tur i lesn. Nasaždenij, Kišinev, 1958, 54–55. (Russ.)
- , (Biologische Besonderheiten einiger insektenpathogener Bazillen und Erkenntnisse über die Entstehung ihrer Einschlusskörper). In: Telenga, N. A., Šcerbinovskij, N. S., i Džadečko, N. D. edit., Biol. Metod Bor'by s Vredit. Rast., Kiev, 1959a, 192–201. (Russ.)
- , (Entobakterin 3 und seine Anwendung in der Bekämpfung von schädlichen Insekten). Zašč. Rast., Moskva, 4 (5). 1959b, 38. (Russ.)
- , (Bakteriophagen entomopathogener sporenbildender Bakterien). Mikrobiol. Metod Bor'by s vredn. Nasekom., Moskva, 1963, 44–48. (Russ.)
- , (Die Verbreitung von Bakterien des Types *Bacillus thuringiensis* und von Bakteriophagen bei verschiedenen Arten von Insekten). In: Čerepanov, A. I. edit. Issled. po biol. Metod Bor'by s Vredit. sel'skogo i lesn. Choz. (Dokl. k simp. 17.–20. Nov. 1964). Akad. Nauk SSSR, Sibirsk. Otd., Novosibirsk, 1964, 113–116. (Russ.)
- , i Zurabova, E. R., (Pigment producing variants of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from the silkworm). Mikrobiologija, Moskva, 35. 1966a, 726–731. (Russ.)
- , and —, On the variability of some entomogenous sporeforming bacteria. 9. Int. Congr. Microbiol., Moscow 1966, Abstr. 1966b, 307–308.
- Szmidt, A., i Šližyński, K., (Control of *Lymantria monacha* L. by means of bio-preparations containing *Bacillus thuringiensis* Berliner). Roczn. Wyzsz. Szkoły rolnic., Poznan, 27. 1965, 251–259. (Poln.)
- Talalaev, E. V., (Künstliche Induktion einer septikämischen Epizootie in Larven von *Dendrolimus sibiricus* (Tštv.) (Lep., Lasiocampidae)). Ent. Obozr. 37. 1958, 641–652. (Russ.)
- , (Bakteriologische Bekämpfung von *Dendrolimus sibiricus*). Trans. 1. Int. Conf. Insect. Path. Biol. Control, Praha 1958, 1959, 51–57. (Russ.)
- , (Eine bakteriologische Bekämpfungsmethode gegen den Sibirischen Spinner). Zašč. Rast., Moskva, 6 (6). 1961, 20–22. (Russ.)
- , (Die Erzeugung einer Septikämie-Epizootie als Bekämpfungsmethode gegen *Dendrolimus sibiricus*). In: Materialy po izuč. lesov Sibiri i Dal'n. Vost., Krasnojarsk, 1963, 249–254. (Russ.)
- Tanada, Y., Susceptibility of the imported cabbageworm to *Bacillus thuringiensis* Berliner. Proc. hawaii. ent. Soc. 15. 1953, 159–166.
- Thon, D., und Belling, A., Untersuchung über die Verwendbarkeit von Nährkartonscheiben für bakteriologische Wasseruntersuchungen mittels der Membranfiltermethode. Zentralbl. Bakt., I. Abt. 172. 1958, 282.

- T j u m e n z e v, S. N., (Reproduction of the disease of septicemia in caterpillars of the sibirian silk-worm caused by spores of *Bacillus dendrolimus* Talal. devoid of parasporal inclusions). Mikrobiologija, Moskva, 32. 1963, 879–884. (Russ.)
- T o u m a n o f f, C., Description de quelques souches entomophytes des *Bacillus cereus* Frank. et Frank., avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. Ann. Inst. Pasteur 85. 1953, 90–98.
- , Au sujet de souche crystallophores entomophytes de *cereus*. Ann. Inst. Pasteur 89. 1955, 644–653.
- , Virulence expérimentale d'une souche banale de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. pour les chenilles de *Galleria mellonella* L. et *Pieris brassicae*. Ann. Inst. Pasteur 90. 1956, 660–664.
- , Observation concernant le rôle probable d'un prédateur dans une transmission d'un bacille aux chenilles de *Pieris brassicae*. Ann. Inst. Pasteur 96. 1959, 108–110.
- , Observations sur la transmission héréditaire de la flacherie des vers à soie (*Bombyx mori* L.). Ann. Inst. Pasteur 98. 1960, 367–372.
- , Description d'un *Bacillus cereus* cristallophore du tube digestif de l'abeille normale. Considérations pratiques concernant cette constatation. Ann. abeille, Paris, 6. 1963, 257–266.
- , et Le C o r r o l l e r, Y., Contribution à l'étude de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. cristallophores et pathogènes pour les larves de lépidoptères. Ann. Inst. Pasteur 96. 1959, 680–688.
- T u m a n i a n, V. G., A f r i k i a n, E. K., H a k p i a n, G. M., B o b o k i a n, R. A., and C h i l h a k o p i a n, L. A., Lysogeny in entomopathogenic bacteria and their changeability under the influence of phages. 9. Int. Congr. Microbiol., Moscow 1966, Abstr. 1966, 314.
- U f f e n, R. L., and C a n a l e - P a r o l a, E., Temperature-dependent pigment production by *Bacillus cereus* var. *alesti*. Canad. J. Microbiol. 12. 1966, 590–593.
- V a ň k o v á, J., Study of the effect of *Bacillus thuringiensis* on insects. Folia biol. Praha, 3. 1957, 175–182.
- , Kultivierung von *Bacillus thuringiensis* im Versuchsbetriebsmaßstab. Trans. 1. Int. Conf. Insect Path. Biol. Control, Praha 1958, 1959, 59–64.
- , (Application of a bacterial preparation of *Bacillus thuringiensis* against some pests of agricultural crops. I. Applications against the large white butterfly (*Pieris brassicae* L.)). Sborn. Českoslov. Akad. Zemed. Véd. Rostl. výr., 8. 1962, 571–576. (Tschech.)
- , *Bacillus thuringiensis* in praktischer Anwendung. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 271–291.
- , Pathogenität einzelner Stämme aus der Gruppe *Bacillus thuringiensis* für verschiedene Lepidopteren-Vertreter. Proc. 12. Int. Congr. Ent., London 1964, 1965, 739.
- , Pathogenicity of different strains of the *Bacillus thuringiensis*-group for *Galleria mellonella* L. Acta Ent. bohemoslov., 63. 1966a, 10–16.
- , (persönl. Mitteilung) 1966b.
- , and K r á l í k, O., An electron microscope study of protein crystals in different strains of the *Bacillus thuringiensis*-group. Zentralbl. Bakt., I. Abt. 199. 1966, 380–390.
- , a W e i s e r, J., (Herstellung eines insektiziden Bakterienpräparates aus kristallophoren Bazillen der Gruppe *Bacillus thuringiensis*). Čs. Patent Nr. 105 416 (1962). (Tschech.)



- Vasiljević, L. A., (Pathogenic effect of some species of bacteria on the fall web-worm (*Hyphantria cunea* Drury)). Mem. Inst. Plant Prot., Beograd, (7) 1957, 79 (Serbo-kroat.)
- Videnova, E., (Pathogeny of the disease caused by *Bacillus thuringiensis* on *Chloridea maritima* s.sp. *bulgarica* (Lepidoptera, Noctuidae)). Rasteniev. Nauk, Sofija, 3. 1966, 79–86. (Bulg.)
- Vorončichina, T. M., i Poltev, V. I., (Das Studium der Möglichkeiten der Reproduktion von Bakterienepizootien bei Raupen des Sibirischen Spinners). In: Čerepanov, A. I. edit., Issled. po biol. Metod Bor'by s Vredit. sel'skogo i lesn. Choz. (Dokl. k simp., 17.–20. Nov. 1964) Akad. Nauk SSSR, Sibirisk. Otd., Novosibirsk, 1964, 30–33. (Russ.)
- Walker, P. D., and Batty, I., Surface antigenic changes in *Bacillus cereus* during germination and sporulation as shown by fluorescent staining. J. appl. Bact. 28. 1965, 194–196.
- Watanabe, T., Chemistry of the toxic crystal of *Bacillus thuringiensis*. — Abstr. US–Jap. Seminar, Microbial Control of Insect Pests. Fukuoka 1967, 27–28. (mimeogr.)
- White, C. A., Bioferm Report, Wasco, Calif. 20. Juli 1960.
- , and Briggs, J. D., Comparative susceptibility of lepidopterous larvae to *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga, Mém. hors Sér. 2. 1964, 305–308.
- Wiegand, H., Der Wirkungsbereich von *Bacillus thuringiensis* Berliner. Tagungsber. Dtsch. Akad. Landw. wiss. Berlin, Nr. 29. 1960, 65–72.
- , Über den Zusammenhang zwischen der  $D_{50}$ - und  $t_{50}$ -Prüfmethodik. Nachr. bl. dtsh. Pfl. schutzd., Berlin, N. F. 16. 1962, 241–250.
- , Raupengröße und Dosierung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten. Entomophaga 8. 1963 a, 35–41.
- , Eine Ergänzung zur ( $D_{50}$ ;  $t_{50}$ )-Prüfmethodik. Nachr. bl. dtsh. Pfl. schutzd., Berlin, N. F. 17. 1963 b, 178–179.
- , Die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Bioassay. Arch. Pfl. schutz, 1967, (im Druck).
- , Die Berücksichtigung der natürlichen Mortalität im Bioassay. Biometr. Z. 1967, (im Druck).
- Williams, J. R. P., and Pickering, G., An attempt to control the development of *Musca domestica* L. in poultry feces using feed additives of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Brit. Poultry Sci. 2. 1962, 195–201.
- Wilson, W. T., Observations of the effects of feeding large quantities of *Bacillus thuringiensis* Berliner to honey bees. J. Insect Path. 4. 1962, 269–270.
- Wittig, G., Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars. I. Phagocytosis of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). J. Invertebrate Path. 7. 1965, 474–488.
- , Effect of heat-stable *Bacillus thuringiensis* toxin on armyworms. J. Invertebrate Path. 9. 1967, 1–2.
- Yamvriias, L., Contribution à l'étude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-à-vis de la teigne de la farine *Anagasta (Ephestia) kühniella* Zeller (Lépidoptère). Entomophaga 7. 1962, 101–159.
- Yoder, P. E., and Nelson, E. L., Bacteriophage for *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Bacillus anthracis* Cohn. J. Insect Path. 2. 1960, 189–200.

- Young, I. E., and Fitz-James, P. C., Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var. *alesti*. J. biophys. biochem. Cytol. 6. 1959 a, 483-498.
- , and —, Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. III. The effect of 8-azaguanine on spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var. *alesti*. J. biophys. biochem. Cytol. 6. 1959 b, 499-506.
- Zurabova, E. R., (Über einige Bedingungen der Massenkultur des entomopathogenen Bakteriums *Bacillus cereus* var. *galleriae* im Zusammenhang mit der Herstellung eines Biopräparates). Trudy Vsesojuzn. naučn.-issled. Inst. Zašč. Rast. 14. 1960, 71-78. (Russ.)
- , (Voraussetzungen zur Gewinnung wirksamer Präparate von sporulierenden Bakterien zur Bekämpfung von Schadinsekten). In: Mikrobiol. Metod Bor'by s vredn. Nasekom., Moskva, 1963, 57-65. (Russ.)