

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

Heft 103

April 1961



Bacillus thuringiensis Berliner

Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung
in der biologischen Schädlingsbekämpfung
(In memoriam Dr. Ernst Berliner [1880-1957])

von

Dr. A. Krieg

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

Berlin 1961

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

Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
Auslieferung: Berlin SW 61, Lindenstraße 44-47 (Westberlin)

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	7
 B. Mikrobiologie	
1. Erreger-Nachweis; Isolierung	
a) Allgemeines	9
b) Morphologischer Erreger-Nachweis	10
c) Kultureller Erreger-Nachweis	10
2. Morphologie	
a) Allgemeines	11
b) Darstellung im Phasenkontrast	12
c) Färberisches Verhalten	12
d) Zytologie	12
e) Formwechsel	14
3. Kulturverfahren	
a) Allgemeines	15
b) Anlage von Massenkulturen	15
c) Aufbereitung von Bazillenpräparaten	16
4. Produktion toxischer Stoffe	
a) Thermolabiles Endotoxin	17
b) Thermostabiles »Exotoxin«	18
c) Bacillogenes »Antibiotikum«	19
d) Lecithinase	19
e) Proteinase	20
5. Sonstige Eigenschaften und biochemische Leistungen	20
6. Taxonomie und Bestimmungsschlüssel	21
7. Reaktion gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen (einschließlich Sterilisation u. Desinfektion)	
a) Temperatur-Einfluß	24
b) Strahlen-Wirkung	24
c) Säure- und Alkali-Wirkung	25
d) Formaldehyd-Wirkung	25
8. Mikroökologie	
a) Allgemeines	25
b) Antibiotika	26
c) Bakteriophagen	26

C. Wirksamkeit gegenüber Insekten

1. Kontaminationsbedingungen	
a) Allgemeines	27
b) Pathogenität	28
c) Virulenz	29
2. Wirksamkeitsbestimmung am spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplex	
a) Standardisierung und Dosierung der Präparate	30
b) Bestimmungsmethoden	32
c) Ergebnisse	37
3. Wirtsspektrum des spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplexes	38
4. Pathologie des spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplexes	
a) Äußere Symptome	50
b) Histopathologie	50
c) Physiopathologie	50
d) Immunität, Resistenz und Toleranz	53
5. Das unspezifische »Exotoxin«	
a) Allgemeines	54
b) Wirksamkeitsvergleiche	55
c) Wirtsspektrum	55
d) Pathologie	56
6. Epizootiologie und geographische Verbreitung	56
7. Mischinfektionen	58

D. Ungefährlichkeit gegenüber Säugetieren und Mensch

1. Untersuchungen an Säugetieren	58
2. Untersuchungen an Menschen	59
3. Variabilität	60

E. Anwendung

1. Spezifische biologische Bekämpfung von Schadinsekten	61
2. Wirkung auf Nutzinsekten und übrige Insektenfauna	62
3. Wirkung auf Pflanzen und andere Anwendungsfragen	64
4. Die Zulassung von Bazillen-Präparaten zur Schädlingsbekämpfung	65
5. Ausblick	66

F. Literatur	67
---------------------------	----

Bacillus thuringiensis Berliner
 Biologic and Pathogenic Properties and its Practical Use
 in Biological Control
 (in memoriam Dr. Ernst Berliner 1880—1957)

Contents

	Page
A. Introduction	7
B. Microbiology	
1. Diagnosis; Isolation	
a) General remarks	9
b) Diagnosis by morphologic properties	10
c) Diagnosis by propagation and cultivation	10
2. Morphology	
a) General remarks	11
b) Demonstration in phase-contrast	12
c) Staining properties	12
d) Cytology	12
e) Developmental cycle	14
3. Methods of cultivation	
a) General remarks	15
b) Technique of mass-production	15
c) Preparation of bacillus-products	16
4. Production of toxic substances	
a) Thermo-labile endotoxin	17
b) Thermo-stable »exotoxin«	18
c) Bacillogenic »antibioticum«	19
d) Lecithinase	19
e) Proteinase	20
5. Other properties and biochemical efficiencies	20
6. Taxonomy (with key for determination)	21
7. Effects of physical and chemical agents (sterilisation and disinfection included)	
a) Effect of temperature	24
b) Effect of radiation	24
c) Effect of acid or alkali	25
d) Effect of formaldehyde	25
8. Micro-ecology	
a) General remarks	25
b) Antibiotics	26
c) Bacteriophages	26

	Page
C. Effectiveness against insects	
1. Conditions for contamination	
a) General remarks	27
b) Pathogenicity	28
c) Virulence	29
2. Bioassay of the specific spore-endotoxin-complex	
a) Standardization and dosage of preparations of the bacillus	30
b) Methods of bioassay	32
c) Results	37
3. Host spectrum of the specific spore-endotoxin-complex	38
4. Pathology of the specific spore-endotoxin-complex	
a) Gross-symptoms.....	50
b) Histopathology	50
c) Physiopathology	50
d) Immunity, resistance and tolerance	53
5. The unspecific »exotoxin«	
a) General remarks	54
b) Comparison of effects	55
c) Host spectrum	56
d) Pathology	56
6. Epizootiology and geographical distribution	56
7. Mixed infections	58
D. Harmlessness to mammals (man included)	
1. Experiments with mammals	58
2. Experiments with men.....	59
3. Variability	60
E. Practical use	
1. Specific biological control of harmful insects.....	61
2. Effect on useful insects and insect fauna	62
3. Effect on plants and other questions of practical use	64
4. Permission for use of bacillus-products in the control of insect pests	65
5. Outlook	66
F. References	67

A. Einleitung

Vor genau 50 Jahren, in der Zeit von 1909 bis 1912, untersuchte BERLINER eine Infektionskrankheit bei Mehlmottenraupen (*Anagasta kühniella* (Zell.) syn. *Ephestia kühniella* Zell.), über die er 1911 erstmals berichtete. Im Sommer 1909 trat die erwähnte Seuche in einer Sendung von Mehlmottenraupen auf, die BERLINER zum Studium der Parasiten dieser Tiere aus einer Mühle in Thüringen erhalten hatte. In der Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung breitete sich diese Krankheit dann seuchenartig aus. BERLINER (zuvor Assistent am Robert-Koch-Institut) war zu dieser Zeit Mitarbeiter von Prof. BUCHWALD an der Versuchsanstalt für Getreideverarbeitung in Berlin.

In der Zeitschrift für angewandte Entomologie erschien 1915 eine ausführliche Publikation unter dem Titel »Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe *Ephestia kühniella* Zell. und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp.«. BERLINER beschrieb in der Arbeit die Isolation und Züchtbarkeit des von ihm *Bacillus thuringiensis* genannten Erregers und dessen pathogenetische Wirkung auf das Wirtstier. Da es bei der Schlaffsucht der Mehlmottenraupe gelingt, die Kochschen Postulate für den Nachweis einer Infektionskrankheit sicher zu erbringen, bezeichnete BERLINER sie als ein Schulbeispiel für infektiöse Insektenkrankheiten. Auch dachte BERLINER bereits an die Möglichkeit, durch Kontamination von Mehl mit Bazillen-Sporen Mehlmotten zu bekämpfen. Der erste Weltkrieg unterbrach diese hoffnungsvollen Arbeiten.

Erst nach 1950, als die Nachfrage nach spezifischen und toxikologisch unbedenklichen Mitteln größer wurde als früher, setzte sich die Verwendung dieses Erregers auch in der Praxis durch, wie im folgenden kurz geschildert wird.

Im Jahre 1922 nahm MATTES am Zoologischen Institut in Marburg auf Veranlassung von Geheimrat KORSCHOLT im Zusammenhang mit parasitologischen Arbeiten an der Mehlmotte die Versuche mit *Bac. thuringiensis* wieder auf. Er mußte allerdings feststellen, daß eine biologische Bekämpfung der Mehlmottenraupen mit dem Bazillus auf Grund ihres ungünstigen physiologischen Verhaltens nicht in dem zu erwartenden Maße erfolgreich war (MATTES 1927).

Die nächsten Versuche mit *Bac. thuringiensis* wurden 1928 bis 1931 von HUSZ in Ungarn durchgeführt, mit dem Ziel einer biologischen Bekämpfung der Raupen des Maiszünslers (*Pyrausta nubilalis* (Hbn.)). Seine Erfolge (50–60% Mortalität) konnten durch Versuche von CHORINE (1929) sowie METALNIKOV u. Mitarb. (1930) bestätigt werden. Diese Versuche standen im Zusammenhang mit einem 4jährigen internationalen Projekt zur Maiszünsler-Bekämpfung in Jugoslawien (Zagreb) und Ungarn (Keszthely), welches vom Institut Pasteur (Paris) unterstützt wurde. Im Verlauf der Experimente erwies sich *Bac. thuringiensis* im Vergleich zu anderen Bakterien, die aus dem Maiszünsler isoliert worden waren, als besonders wirksam. — Im Gegensatz zu diesen Erfolgen hinsichtlich einer möglichen biologischen Bekämpfung des Maiszünslers berichtete ECKSTEIN (1934) in Deutschland (Rastatt) nur über negative Resultate.

Aus der gleichen Zeit liegen noch erfolgreiche Bekämpfungsversuche mit *Bac. thuringiensis* vor von METALNIKOV u. METALNIKOV (1933, 1937) gegen den Baumwollschädling *Gelechia gossypiella* (Saund.) in Ägypten (Nähe von Kairo) und von POSPELOV (1936) gegen Kohlweißlinge (*Pieris* spp.) in der UdSSR (Nähe von Leningrad und in der Moldau-SSR). Gleichzeitig von POSPELOV gegen den Maiszünsler durchgeführte Versuche fielen hingegen ähnlich wie die von ECKSTEIN (1934)

unbefriedigend aus. 1940 führte dann METALNIKOV in Frankreich erfolgreiche Versuche zur Bekämpfung von *Sparganothis pilleriana* (Schiff.) und *Clysia ambiguella* (Hbn.) durch.

Die Bekämpfungsversuche von BERLINER und MATTES gegen Mehlmotten wurden 1942 von METALNIKOV in Frankreich an *Ephestia chutella* Hbn. und von JACOBS 1950 in England an *Anagasta kühniella* (Zell.) wieder aufgenommen, wobei gewisse Erfolge erzielt wurden. JACOBS arbeitete dabei mit einem französischen *Bac. thuringiensis*-Präparat (»SPOREIN«). 1954 und 1957 wurde von verschiedenen amerikanischen Autoren das Problem der Bekämpfung von *P. nubilalis* mittels *Bac. thuringiensis*, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen, erneut aufgegriffen. — TOUMANOFF (1954 a) berichtete über mäßige Erfolge bei *Galleria mellonella* (L.); bessere, aber noch nicht voll befriedigende Ergebnisse hatten KRIEG u. FRANZ (1959) bei diesem Wirt.

Während bei den Pyraliden (*A. kühniella*, *P. nubilalis* und *G. mellonella*) Bemühungen um eine biologische Bekämpfung sehr unterschiedliche Erfolge zeitigten, änderte sich dies, sobald man andere Lepidopteren in die Untersuchungen einbezog. So hatte 1951 KLEMENT in Ungarn einen durchschlagenden Erfolg gegen die Raupen des weißen Bärenspinners (*Hyphantria cunea* Drury) und STEINHAUS (1951) in Californien (USA) gegen die Raupen des Luzerne-Heufalters (*Colias philodice eurytheme* Boisd.). Es folgten alsbald weitere erfolgreiche Bekämpfungsversuche, und zwar von TANADA (1956 a) in Hawaii, von LEMOIGNE u. Mitarb. (1956) in Frankreich und von KRIEG (1957) in Deutschland an Kohlweißlingsraupen (*Pieris rapae* (L.) bzw. *Pieris brassicae* (L.)). 1954 erzielten GRISON u. BÉGUIN eine erste wirksame Bekämpfung gegen Raupen des Kiefernprozessionsspinners (*Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.)) in Frankreich. Schließlich berichtete TALALAEV (1957) über eine erfolgreiche biologische Bekämpfung des sibirischen Arvenspinners (*Dendrolimus sibiricus* (Tschetv.)) mit einem *Bac. thuringiensis*-Präparat in der UdSSR.

Diese Aufzählung ist bei weitem nicht vollständig und soll nur einige wesentliche Etappen in der *Bac. thuringiensis*-Anwendung aufzeigen. Wie die Geschichte der Erforschung dieses Bazillus lehrt, waren es oft untaugliche Objekte, u. U. aber auch ungünstige Bekämpfungstermine und Applikationsformen, die die Anwendung dieses gegen viele Lepidopteren-Raupen wirksamen Erregers lange erschwert oder gar vereitelt haben.

Als BERLINER im Jahre 1957 in Darmstadt starb, war auf Grund der bis dahin vorliegenden Freiland-Versuche seine Hoffnung, den Bazillus in der biologischen Bekämpfung angewandt zu sehen, in Erfüllung gegangen.

Leider ging der Originalstamm von BERLINER verloren; aber MATTES gelang es, einen neuen Stamm zu isolieren. Dieser »German strain« kam durch Vermittlung von PORTER zu SMITH u. STEINHAUS nach den USA, wo er seitdem die Grundlage für Forschungs- und kommerzielle Zwecke bildet (STEINHAUS 1960 b).

Außer *Bac. thuringiensis* kennen wir heute eine ganze Reihe von pathogenetisch und mikrobiologisch sich ähnlich verhaltenden insektenpathogenen Bazillen. Die wichtigsten Typen sind der 1902 von ISHIWATA in Japan isolierte Erreger der »Sotto« der Seidenraupen (*Bacillus sotto*), ferner der 1951 von TOUMANOFF u. VAGO ebenfalls aus Seidenraupen in Frankreich isolierte Erreger der Fleckenkrankheit (*Bacillus cereus* var. *alesti*) und endlich der von STEINHAUS in den USA aus Raupen von *Aphomia gularis* Zell. isolierte und von HEIMPEL u. ANGUS (1958) als *Bacillus entomocidus* beschriebene Sporenbildner.

Ein Maßstab für die wachsende Bedeutung, die *Bac. thuringiensis* in den letzten Jahren gewonnen hat, ergibt sich aus einem Vergleich der Fülle moderner *Bac. thuringiensis*-Literatur mit den wenigen Zeilen, die STEINHAUS diesem Bazillus in den »Principles of Insect Pathology« (1949) gewidmet hat. Das in den mittlerweile verstrichenen 12 Jahren erschienene Schrifttum über *Bac. thuringiensis* und seine Verwandten läßt sich in seiner Gesamtheit heute nur noch schwer übersehen. Eine Liste über die Wirksamkeit von Bazillen der *Bac. thuringiensis*-Gruppe gegenüber verschiedenen Insektenarten wurde 1957 (a) von STEINHAUS herausgegeben. Bei dem hier vorliegenden Referat wurde die Literatur bis Ende 1960 berücksichtigt.

Seit 1954 laufen auch im Institut für biologische Schädlingsbekämpfung der Biologischen Bundesanstalt in Darmstadt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft Untersuchungen zur Grundlagen-Forschung und Anwendung von *Bac. thuringiensis* in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Die Resultate sind, soweit abgeschlossen, in dem vorliegenden Bericht verwertet.

Die Ergebnisse der *Bac. thuringiensis*-Forschung in jüngster Zeit ergaben, daß die industrielle Produktion eines Sporen-Präparates für Zwecke der biologischen Schädlingsbekämpfung auch vom wirtschaftlichen Standpunkt aus vertretbar ist. So reifte in den Jahren 1958/59 in verschiedenen Ländern die Produktion des Bazillus für Großversuche in industriellem Maßstabe heran. Heute sind in den USA bereits mehrere in Großtank-Verfahren hergestellte Präparate auf dem Markt erhältlich:

- (1) Bioferm Corporation, Wasco, Calif., und Stauffer Chemical Co: »THURICIDE«
- (2) Merck & Co, Inc., Rahway, N. J.: »AGRITOL«
- (3) Nitrilite Products, Inc., Buena Park, Calif.: »LARVATROL 25 W«
- (4) Röhm & Haas Co., Philadelphia, Pa.: »BAKTHANE L-69«.

Aber auch in anderen Ländern läuft die industrielle Produktion bereits an, so in Frankreich (Laboratoire LIBEC, Paris: »SPOREINE«, Institut Pasteur: »BACTOSPEINE IP 54«), in Deutschland (Farbwerke Hoechst: »BIOSPOR 2802«), ferner in der ČSR (Hersteller und Bezeichnung des Präparates noch unbekannt) und in der UdSSR (Mikrobiologisches Laboratorium des All-Union-Instituts für Pflanzenschutz (VIZR): »ENTOBAKTERIN 3«).

Wichtig für die praktische Anwendung ist die Tatsache, daß die Sporenpräparate bei trockener Lagerung und Zimmertemperatur jahrelang ihre Keimfähigkeit und Virulenz bewahren.

Ausgedehnte Freilandversuche liegen vor allem aus den USA, neuerdings aber auch aus Frankreich, Deutschland, der ČSR und UdSSR vor.

B. Mikrobiologie

1. Erreger-Nachweis; Isolierung

a) Allgemeines

Wie bereits erwähnt, gelang es BERLINER, im Falle der Schlafsucht der Mehlmotten-Raupen das Vorliegen einer echten Infektionskrankheit, verursacht durch *Bac. thuringiensis*, kritisch nachzuweisen. Ein solcher spezifischer Erreger-Nachweis gelang auch bei ähnlichen Spontan-Erkrankungen anderer Insekten (s. S. 56) und außerdem bei der Rück-Isolierung von Bazillen der *Thuringiensis*-Gruppe aus erkrankten Tieren in Infektionsversuchen. Im allgemeinen ist der Bazillus gut nachweisbar in Raupen von *Bombyx mori* L., *Anagasta kühniella* (Zell.), *Galleria mellonella* (L.), *Hyponomeuta malinella* Zell.. Weniger gut gelang ein regelmäßiger Nachweis

bei befallenen Raupen von *Pieris brassicae* (L.) und *Pieris rapae* (L.). Ausgesprochen schlecht reproduzierbar war der Erreger-Nachweis bei Raupen von *Malacosoma neustria* (L.) und *Barathra (Mamestra) brassicae* (L.). Der Erfolg ist offenbar von der Vermehrungsmöglichkeit der Bazillen im Raupenkadaver abhängig und auch davon, in welchem Maße eine Infektion oder Intoxikation im Vordergrund der Pathogenese steht.

b) Morphologischer Erreger-Nachweis

In frischtoten Tieren findet man bei mikroskopischer Untersuchung bewegliche plumpe Stäbchen vom *Cereus*-Typ (Abb. 1). Wird nach zwei- bis dreitägiger Aufbewahrung des Materials bei Zimmertemperatur die Untersuchung wiederholt, so werden charakteristische Sporangien mit Sporen und Endotoxin-Kristallen gefunden (Abb. 3). Die Untersuchung erfolgt zweckmäßigerweise im Phasenkontrast, wodurch eine zeitraubende und unterschiedlich ausfallende Färbung unterbleiben kann.

c) Kultureller Erreger-Nachweis

Führt der morphologische Nachweis nicht zum Ziel oder ist eine Isolierung des Erregers beabsichtigt, so wird eine Kultur angelegt. Hierzu werden nach der in bakteriologischen Laboratorien üblichen Technik Ausstriche auf Platten (Nähragar in Petrischalen) angefertigt.

Nach dem Zustand der Probe wird entweder direkt ausgestrichen oder nach Erhitzen $\frac{1}{2}$ min auf 80 bis 90° C. An Stelle des Erhitzens kann auch die Verwendung eines Selektiv-Nährbodens treten. Als solcher wird ein Penicillin-G-Nähragar mit 100 E/ml empfohlen (KRIEG 1958). Schließlich kann auch eine Anreicherung von *Bac. thuringiensis* durch Vorkultur des Ausstrichmaterials in Penicillin-G-Nährbouillon erfolgen. Erst von dieser Vorkultur aus werden dann die Platten beimpft.

Röhrchen und Platten werden 12 bis 24 Std. bei 20 bis 30° C inkubiert. Typisch für *Bac. thuringiensis* auf Nähragar sind die großen rauen Oberflächenkolonien. Ihre Identifizierung wird morphologisch (mikroskopische Untersuchung) durchgeführt. Die Differenzierung verschiedener Stämme erfolgt durch Test auf unterschiedliche biochemische Leistungen (s. Bestimmungsschlüssel).

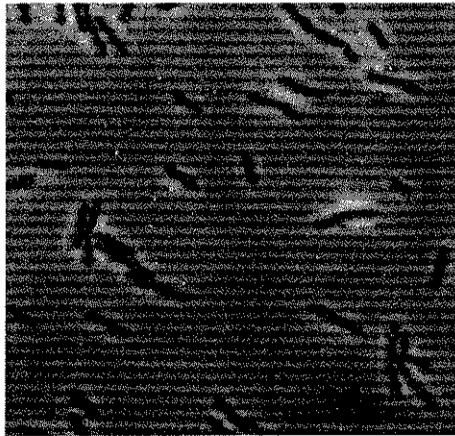


Abb. 1. Vegetative Zellen von *Bac. thuringiensis* Lichtmikroskop — lebend, Phasenkontrast;

Abb.-Maßstab 600 : 1

(Original)

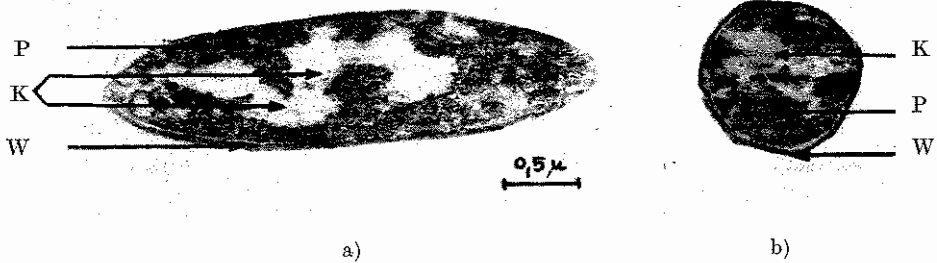


Abb. 2. Längs- (a) und Quer- (b) Schnitt durch vegetative Zelle von *Bac. thuringiensis* Elektronenmikroskop — fixiert, kontrastiert; Abb.-Maßstab 20 000 : 1 (Original)
P = Zytoplasma, K = Kernäquivalent, W = Zellwand

2. Morphologie

a) Allgemeines

Bac. thuringiensis und seine Verwandten besitzen wie alle Bacillaceen einen charakteristischen morphologischen Phasenwechsel mit verschiedenen Formen: vegetative Phase (durch Teilung sich vermehrende Bazillen) und reproduktive Phase (ruhende Sporen). Bei den vegetativen Formen handelt es sich um relativ dicke Stäbchen ($1,2$ bis $1,8 \times 3,0$ bis $5,0 \mu$). Sie kommen einzeln oder in Ketten vor (Abb. 1) und sind meist schwach beweglich. Zur Sporulation sind alle vegetativen Zellen befähigt. Sie tritt bei Erschöpfung des Nährmediums ein und erfolgt endotroph (d. h. auch ohne Vorhandensein exogener Nährstoffe), aber nur unter aeroben Bedingungen. Die Sporangien (= Sporenmutterzellen) sind nicht aufgetrieben (Abb. 3). Die Sporen haben eine elliptische bis zylindrische Form ($0,8$ bis $0,9 \times 2,0 \mu$) und liegen subterminal. Außer der Spore enthält jedes Sporangium einen kristallinen parasporalen Körper,

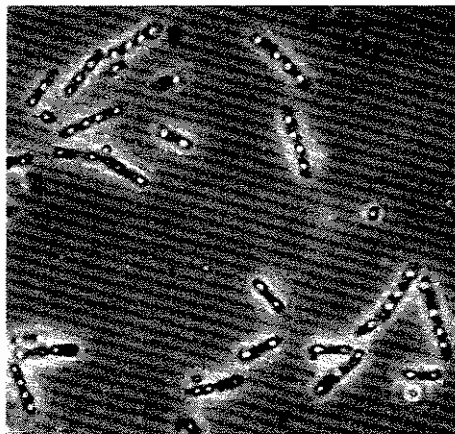


Abb. 3. Sporulierende Zellen von *Bac. thuringiensis* Lichtmikroskop — lebend, Phasenkontrast; Abb.-Maßstab 600 : 1 (Original)

den BERLINER (1915) als »Restkörper« beschrieben hat (Abb. 4). Seine Größe beträgt etwa $0,6 \times 2,0 \mu$. Es ist möglich, die Sporen in keimfähigem Zustand jahrelang trocken aufzubewahren. Eine Keimung der Sporen erfolgt, wenn man sie in ein genügend wasserhaltiges Nährsubstrat bringt. Dann quillt die Sporenhülle auf, und der Sporenhalt dehnt sich in Richtung der Längsachse, bis die Form des vegetativen Stadiums erreicht ist. Schon BERLINER konnte beobachten, daß ein Sprengen oder Abwerfen der Sporenmembran (=Endosporium) nicht stattfindet.

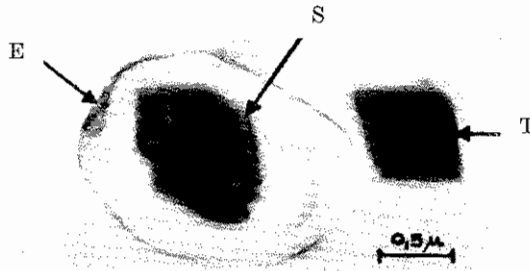


Abb. 4. Schnitt durch Sporangium von *Bac. thuringiensis* Elektronenmikroskop — fixiert, kontrastiert;
Abb.-Maßstab 20 000 : 1 (Original)
E = Exosporium, S = Spore, T = Toxinkristall

b) Darstellung im Phasenkontrast

Im positiven Phasenkontrast werden die vegetativen Stäbchen (in Wasser suspendiert) dunkel auf hellerem Grund (Abb. 1) abgebildet. Sporen und Kristalle dagegen erscheinen auf Grund ihrer größeren optischen Dichte hellglänzend (Abb. 3). Die starke Lichtbrechung der Spore kann als Maßstab für ihre Resistenz gewertet werden; beide entwickeln sich bei der Reifung. Keimende Sporen verlieren die hohe Lichtbrechung und werden so auch optisch vegetativen Stäbchen ähnlicher. Im negativen Phasenkontrast sind die Kontraste invers. Eine solche inverse Darstellung kann man auch im positiven Phasenkontrast dadurch erreichen, daß man den Brechungsexponent des Mediums stark erhöht, etwa durch Zusatz hochprozentiger Gelatine.

c) Färberisches Verhalten

Die vegetativen Formen färben sich nach Hitze-fixierung gut mit gewöhnlichen Anilinfarben an und sind Gram-positiv. Die Färbung der Sporen gelingt nach MÖLLER (Chromsäurebeizung) oder nach KLEIN. Bei Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN (vorher Fixierung in Bouin'schem Gemisch) färbt sich der parasporale Körper im Gegensatz zur Spore gut an. Eine selektive Darstellung des parasporalen Körpers ist auch mit basischem Fuchsin möglich. Spezialfärbung s. u.

d) Zytologie

Die ersten Ergebnisse zur Zytologie von *Bac. thuringiensis* liegen von BERLINER (1915) und MATTES (1927) vor. Neuere Untersuchungen stammen vor allem von HANNAY u. FITZ-JAMES (1955) sowie YOUNG u. FITZ-JAMES (1959).

Zellwand, Geißeln: Die Zellwand besteht im wesentlichen aus einem Mucopolysaccharid. Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist sie etwa 25 bis 30 m μ dick. Eine Kapselbildung ist nicht nachweisbar. — Zellen von *Bac. thuringiensis*

können begeißelt sein; in diesem Falle sind die Geißeln peritrich angeordnet. Ihre Darstellung gelingt lichtmikroskopisch nach Behandlung der Präparate mit Eisen-Tannin-Beize nach LÖFFLER (s. MATTES 1927).

Kern und Zytoplasma: Genau genommen handelt es sich bei dem als Kern oder besser als Kernäquivalent angesprochenen Gebilde um das chromosomenähnlich angeordnete Euchromatin der Bakterienzelle. Das Kernäquivalent enthält somit nur DNS. Die RNS ist in den sog. Ribosomen des umgebenden Zytoplasmas lokalisiert, wodurch dieses seine starke Basophilie erhält. Aus dieser Verteilung der Nukleinsäuren resultiert, daß die meisten basischen Farbstoffe die Bakterienzelle ganz anfärben und nicht nur deren Kernäquivalent. Außerdem ist das Kernäquivalent der Bakterien im Gegensatz zu einem echten Kern höherer Zellen nicht durch eine Membran vom Zytoplasma getrennt (Abb. 2).

MATTES (1927) berichtete als erster auf Grund färberischer Untersuchungen im Lichtmikroskop über Kernäquivalente bei *Bac. thuringiensis*. Sie sind auch darstellbar in vivo mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens; hierbei erscheinen die Kernäquivalente im allgemeinen heller als das umgebende Plasma. Eine deutlichere Differenzierung zwischen Kernäquivalent und dem umgebenden Zytoplasma in vivo kann unter günstigen Verhältnissen bei Verwendung von Acridinorange im Fluoreszenzmikroskop erreicht werden. Die Kernäquivalente leuchten nach Fluorochromierung kräftig grün, während die Plasmafluoreszenz unbedeutend ist. — Gute Bilder werden erzielt nach Fixierung in OsO_4 und Färbung mit Kernfarbstoffen nach vorheriger Hydrolyse der RNS. Zur elektiven Darstellung der Kernäquivalente in OsO_4 -fixierten Bazillen eignet sich nach vorsichtiger HCl-Hydrolyse z. B. eine Anfärbung mit SO_2 -Azur A nach HUEBSCHMANN. Diese Methode ist in ihrer Spezifität etwa gleichwertig der Nucleal-Reaktion nach FEULGEN (HCl-Hydrolyse und Anfärbung mit SO_2 -Fuchsin) (s. auch YOUNG u. FITZ-JAMES 1959). Weiterhin brauchbar ist die Giemsa-Färbung (ohne oder nach HCl-Hydrolyse) und ggf. auch die Eisenhämatoxylinfärbung nach HEIDENHAIN, beide ebenfalls nach OsO_4 -Fixierung (s. auch MATTES 1927).

Im Elektronenmikroskop lassen sich an Hand von Ultradünnschnitten ($\sim 50 \text{ m}\mu$ dick) an OsO_4 -fixierten Bakterien die Kernäquivalente als weniger elektronendichte Zonen vom dichteren Zytoplasma differenzieren. Durch Behandlung mittels Schwermetallsalzen (Uranylacetat und Phosphorwolframsäure) lassen sich diese Kontraste noch erhöhen (Abb. 2).

Der Protoplast wird durch eine etwa $6,7 \text{ m}\mu$ dicke Membran begrenzt, die u. a. aus Lipoproteid besteht und in der zahlreiche Enzyme lokalisiert sind. Sie übt verschiedene Funktionen aus: Osmotische Barriere, aktiver Transport durch spezifische Permeasen, Mitochondrienäquivalent.

Übrige Zellbestandteile: Im Zytoplasma der vegetativen Zelle lassen sich Grana oder Vakuolen nachweisen, die infolge ihrer starken Lichtbrechung nicht nur im Phasenkontrast, sondern auch im Dunkelfeld in vivo darstellbar sind. Sie verschwinden nach übereinstimmenden Beobachtungen von MATTES (1927), YOUNG u. FITZ-JAMES (1959) z. Z. der Sporulation. In ihnen wurde von BERLINER und MATTES mit der Methode nach MEYER Volutin (= Polymetaphosphate) nachgewiesen. YOUNG u. FITZ-JAMES wiesen Lipid mit Sudanschwarz B im Lichtmikroskop nach und sprechen daher die Grana als Lipidtropfen an. Im Elektronenmikroskop beobachteten YOUNG u. FITZ-JAMES an Ultradünnschnitten von OsO_4 -fixiertem Material in der Nähe dieser Orte Vakuolen, von denen sie annehmen, daß es sich hierbei um (infolge der Präparation) »leere« Lipidtropfen handelt. Nach Ansicht des Verfassers (KRIEG 1960) entsprechen die Vakuolen denen, die CHAPMAN u. HILLER (1953) als »empty granules« bei *Bac. cereus* Fr. et Fr. beschrieben hat.

Parasporaler Körper: Ein in der Sporenmutterzelle auftretender parasporaler Körper wurde bereits von BERLINER beobachtet und als rhomboider »Restkörper« beschrieben. Neuere Untersuchungen von HANNAY (1953) haben gezeigt, daß es sich hierbei um einen kristallinen Eiweißkörper handelt. Über seine Feinstruktur liegen EM-Untersuchungen sowohl von HANNAY u. FITZ-JAMES (1955) als auch von NORRIS u. WATSON (1960) vor. Der parasporale Körper bildet sich erst während der Sporulation (Abb. 5) außerhalb des Exosporiums. Nach MONRO (1959) und KRIEG (1959) ist das Kristall-Antigen in vegetativen Zellen noch nicht nachweisbar, sondern erst, wenn diese sich zur Sporulation anschicken. YOUNG u. FITZ-JAMES (1959) konnten zeigen, daß durch 8-Azaguanin die Bildung von Sporen und Kristallen unterbunden werden kann, wenn dieses Purin-Analogon vor der Bildung des Chromatin-Filaments gegeben wird. Spätere Applikation hat auf die Kristallbildung keinen Einfluß mehr. Schließlich verlassen parasporale Körper und Spore getrennt das Sporangium (Abb. 4). Nach Untersuchungen von ANGUS u. Mitarb. (1956a) ist der parasporale Körper mit dem Endotoxin des Bazillus identisch.

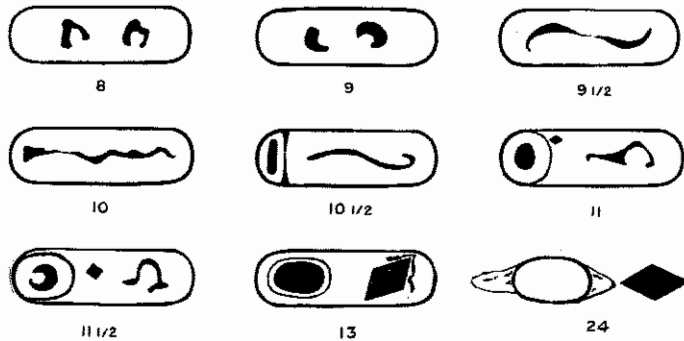


Abb. 5. Form- und Kernphasen-Wechsel von *Bac. thuringiensis* (nach YOUNG und FITZ-JAMES 1959) (Zahlenwerte geben die Zeit nach Beimpfung in Stunden an).

e) Formwechsel

Parallel zum äußerlich wahrnehmbaren Formwechsel laufen charakteristische Veränderungen am Kernäquivalent ab (Abb. 5). Sie sollen daher miteinander besprochen werden. Während die trockene Spore sich nicht mit Anilinfarben anfärbt, gelingt dies, sobald sie gequollen ist. Der Keimung geht eine Quellung von etwa 30 min (bei 30° C) voraus. Innerhalb weiterer 30 min setzt (bei gleicher Temperatur) Keimung ein. In nährstoffhaltigem Substrat erfolgten alsbald rasche Teilungen. Die Teilungsrate beträgt etwa 1 bis 2 in 20 min. Während der logarithmischen Wachstums-Phase herrschen Teilungsformen vor mit gebogenen, meist S- und U-förmigen Kernäquivalenten. Nach dem Übergang in die stationäre Phase nach 6 bis 8 Std. (bei 30° C) setzt unter aeroben Bedingungen alsbald die Sporulation ein (Abb. 6). Sie wird eingeleitet durch Ausbildung eines langen schleifenförmigen Chromatinfadens, der schließlich eine Art Axialfilament bildet. Während der größte Teil des Axialfilamentes fragmentiert, wird an einem Zellpol von dem Chromatinfaden das Sporechromatin abgetrennt. Es bildet sich ein Sporenszeptum aus, und schließlich hebt sich die Spore von der Zellwand der Sporenmutterzelle ab. HANNAY zeigte 1956 an Ultradünnschnitten durch *Bac. thuringiensis*, daß das die Spore umgebende Exosporium nicht,

wie bisher allgemein angenommen wurde, ein Derivat der Zellwand (= Sporangiumwand) ist, sondern im Zellinnern synthetisiert wird. Dieser Befund konnte von CHAPMAN (1956) an *Bac. cereus* und von YOUNG (1958) sowie von NORRIS u. WATSON (1960) an *Bac. thuringiensis* var. *alesti* bestätigt werden.

Etwa zu der Zeit, in der sich Endosporium und Exosporium trennen, erscheint (meist im Winkel, den Exosporium und Zellwand bilden) im Zytoplasma ein kleiner Kristall, der zu einem parasporalen Körper von etwa Sporengröße heranwächst. Schließlich zerfällt das Sporangium, und sowohl der kristalline parasporale Körper als auch die Spore werden frei (Abb. 4). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von MATTES (1927) ist der kristalline parasporale Körper (den BERLINER als »Restkörper« bezeichnet hat) mit dem Chromatin-Restkörper nicht identisch. Dieser Chromatin-Restkörper, der das nicht in die Spore einbezogene Chromatin umfaßt, degeneriert im Gegensatz zum parasporalen Körper. Das an reifen Sporen im Zusammenhang mit Färbung nach HCl-Hydrolyse nachgewiesene extrasporale Chromatin (YOUNG u. FITZ-JAMES 1959) ist ein auf Extrusion beruhender Hydrolyse-Artefakt; es läßt sich nämlich ohne vorausgehende HCl-Hydrolyse nicht nachweisen.

3. Kulturverfahren

a) Allgemeines

Die Anzucht von *Bac. thuringiensis* auf künstlichem Nährsubstrat, mit dem Ziel, Endotoxin-haltige Sporen-Präparate zu erhalten, kann nur unter aeroben Bedingungen erfolgen. Als Substrat eignen sich Nährbouillon (ggf. auf Hefeautolysat-Basis) oder auch halbsynthetische Nährmedien mit geeigneter C- und N-Quelle (2–8% gärfähiges Kohlenhydrat, 0,75% Pepton) sowie Spurenelemente und Wachstumsstoffe (Hefeautolysat 2%) (VAŇKOVÁ 1958). Die Kultur kann entweder in der Nährlösung selbst oder auf einem Gel-artigen Nährboden (z. B. Agar) erfolgen, der auf Nährlösungs-Grundlage hergestellt wird.

Für die fortlaufende Haltung von Stämmen hat sich die in bakteriologischen Laboratorien übliche Weiterzucht auf Schrägagar-Röhrchen bewährt. — Für Massenkulturen eignen sich Oberflächen- und Submers-Verfahren. Sie werden beimpft mit Abschwemmungen von Schrägagar-Röhrchen. — Die in den Kulturen gebildeten Sporen bleiben jahrelang keimfähig. Nach STEINHAUS (1960 a) besaßen Sporen von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* noch nach 10jähriger Aufbewahrung bei ca. 25° C ihre Keimfähigkeit und Virulenz.

b) Anlage von Massenkulturen

b₁) Oberflächenverfahren

Hierbei erfolgt das Wachstum auf Gel-artigem Nährboden, z. B. Nähragar in Kolle-Schalen oder Fernbach-Kolben. Bei diesem Verfahren wachsen die vegetativen Keime innerhalb 24 Std. bei 25 bis 30° C heran. Innerhalb weiterer 48 Std. erfolgt Sporulation. Das Abernten geschieht durch Abschwemmen mit Wasser.

b₂) Submersverfahren A

Die Kultur erfolgt hier in 500-ml-Kolben (mit ca. 75 ml Nährlösung gefüllt) auf der reziproken Schüttelmaschine. Dieses Verfahren eignet sich besonders zur Ermittlung optimaler Nährmedien, indem man von Kolben zu Kolben die Zusammensetzung des Substrats systematisch abändert. Wachstum und Sporulationsgeschwindigkeit sind ähnlich wie beim Verfahren b₁.

b₃) Submersverfahren B

Die Anzucht erfolgt hier in gut belüfteten Tanks, die mit Nährlösung beschickt sind: Es kommen zur Verwendung entweder 2-l-Kluyver-Kolben, ferner halbtechnische Versuchs-Fermenter mit 20 bis 100 l oder industrielle Groß-Fermenter mit 100 bis 10 000 l Inhalt*). Dieses Verfahren eignet sich bei Verwendung üblicher Nährmedien zur Massen-Produktion. Zusatz von inertem Entschäumer (z. B. Silikonen) ist wichtig. Die Geschwindigkeit von Wachstum und Sporulation ist weitgehend von der Belüftung abhängig. Nach VAŇKOVÁ (1958) kann im Tank-Verfahren bei einer Belüftungs-Intensität von 5 Volumina atmosphärischer Luft pro Volumen Gärlösung und optimalem p_H (~ 7) mit Ausbeuten von 8 bis 10 g/l gerechnet werden. Bei diesem Verfahren wachsen die vegetativen Keime innerhalb 12 bis 24 Std. bei 25 bis 30° C heran. Innerhalb weiterer 12 Std. ist die Sporulation im Gange. Die Tank-Ansätze werden nach Erfahrungsdaten abgeerntet.

c) Aufbereitung von Bazillen-Präparaten

Vor der weiteren Verarbeitung ist in jedem Falle eine mikrobiologische Kontrolle einzuschalten. Sie besteht

- a) in einer mikroskopischen Untersuchung und
- b) einer bakteriologischen Untersuchung des Erntegutes.

Die erste Untersuchung soll vor allem feststellen, ob das Präparat den Anwendungstechnischen Voraussetzungen genügt, d. h. ausreichende Sporulation und Kristallbildung erfolgt ist. Sie soll aber auch eine Vorprüfung auf Reinheit des Ansatzes sein. — Die Hauptprüfung auf Reinkultur von *Bac. thuringiensis* wird durch die zweite Untersuchung erbracht, die in der Anlage von Plattenkulturen nach dem Ausstrich-Verfahren besteht. — Erst wenn beide Kontrollen erfolgreich ausgefallen sind, kommt eine weitere Verarbeitung in Frage.

c₁) Herstellung eines »rohen« Sporen-Präparates

Hierbei werden die abgeernteten Suspensionen direkt mit inerten Stoffen versetzt, die reichlich Wasser absorbieren können. (Jede Verschmutzung des Präparates ist hierbei zu vermeiden.)

Werden solche Bazillen-Stämme oder Kulturmedien gewählt, die keine »Exotoxin«-Bildung erlauben, so eignet sich dieses Verfahren auch zur Herstellung eines für die Praxis geeigneten Sporen-Endotoxin-Präparates.

c₂) Herstellung eines Sporen-Endotoxin-Präparates

Hierbei werden zunächst die abgeernteten Suspensionen wiederholt in der Zentrifuge vom Nährmedium und dann vom Waschwasser abgeschleudert oder aber von Kulturflüssigkeit bzw. Waschwasser durch Asbest- oder Kieselgur-Filter abfiltriert. Das in der Kulturflüssigkeit u. U. vorhandene »Exotoxin« verbleibt im Überstand oder im Filtrat, welche entweder verworfen oder nach c₃ weiterverwendet werden. Schließlich wird entweder eine wäßrige Suspension im Sprühverdampfer zu einem Trockenpräparat verarbeitet oder aber ein gereinigtes Sediment schonend getrocknet (Gefrier-trocknung oder Wasserabsorption durch inerte Stoffe). Für alle Sporen-Präparate empfiehlt sich trockene und kühle Lagerung. Außerdem ist im Hinblick auf die UV-Empfindlichkeit der Sporen das Präparat möglichst vor Licht zu schützen (daher braune Flaschen bzw. Blechtonnen).

*) Die Beimpfung von Groß-Fermentern erfolgt mit Vorkulturen aus 500- bis 1000-ml-Kolben.

c₃) Herstellung eines »Exotoxin«-Präparates

Die bei der Herstellung von Sporen-Endotoxin-Präparaten (nach c₂) als Überstand oder Filtrat übrigbleibende Kulturflüssigkeit wird fraktioniert, sterilisiert oder autoklaviert und (evtl. nach vorheriger Einengung) direkt als Lösung verwandt. Zur Aufbewahrung wird sie steril in Ampullen eingeschmolzen. Nach Angaben von McCONNEL u. RICHARDS (1959) läßt sich das »Exotoxin«, ohne daß Inaktivierung zu befürchten ist, über 12 Monate bei -20°C aufbewahren.

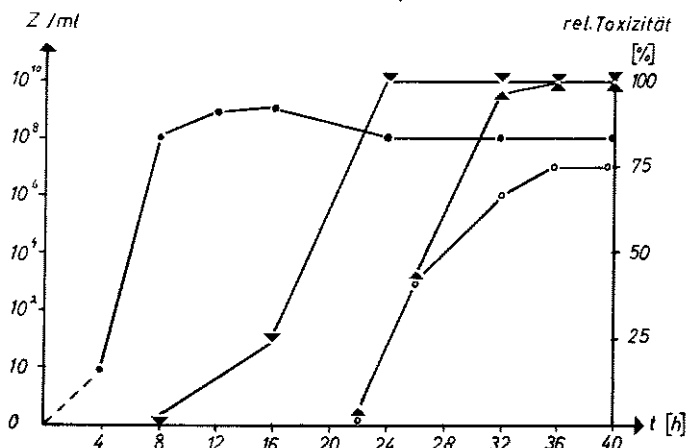


Abb. 6. Wachstum, Sporulation und Toxinbildung bei *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (nach McCONNEL und RICHARDS 1959, verändert).

Z/ml = Zellen pro Millimeter

rel. Toxizität in Prozent

t (h) = Zeit nach Beimpfung in Stunden

● = Keimzahl ○ = Sporenzahl ▼ = »Exotoxin« ▲ = Endotoxin

4. Produktion toxischer Stoffe

Für die Wirkung von *Bac. thuringiensis* sind verschiedene von ihm produzierte Wirkstoffe maßgebend. Im einzelnen ließen sich nachweisen:

- thermolabiles Endotoxin
- thermostabiles »Exotoxin«
- bacillogenes »Antibiotikum«
- Lecithinase
- Proteinase

a) Das speziell auf den Darm von Lepidopteren wirksame Endotoxin der verschiedenen Variationen von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* ist mit dem parasporalen Kristall identisch und bildet sich in der Sporulationsphase (Abb. 6).

Dadurch, daß dem Endotoxin-Kristall etwa das gleiche Gewicht wie der Spore zukommt, erhält man beim strengen Abzentrifugieren von Suspensionen des *Bac. thuringiensis* bzw. *Bac. entomocidus* im allgemeinen den Sporen-Endotoxin-Komplex. Dieser ist insektenpathologisch wichtig (s. Abschn. D bis E).

Das Endotoxin ist thermolabil und unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln, wohl aber löslich in Alkalien (0,02 bis 0,05 n-NaOH). Aus seiner Alkali-Löslichkeit resultiert eine einfache Methode seiner Isolierung aus dem Sporen-Endotoxin-Komplex (HANNAY u. FITZ-JAMES 1955, ANGUS 1956, FITZ-JAMES u. Mitarb. 1958).

Das Endotoxin läßt sich aber auch in ungelöster kristalliner Form aus Sporen-Präparaten gewinnen. HANNAY u. FITZ-JAMES (1955) beschrieben eine Methode, bei der sie gekeimte Sporen von den Kristallen durch Differential-Zentrifugation trennten. VAŇKOVÁ (1957) benutzte zur Trennung die Gradienten-Zentrifugation und ANGUS (1959) die Fluorocarbon-Technik. — Schließlich kann noch eine Trennung zwischen Endotoxin und Sporen dadurch erzielt werden, daß man letztere mit UV inaktiviert (BONNEFOI u. BÉGUIN 1959).

Das reine Endotoxin enthält keine Nukleinsäuren. Es handelt sich um ein Protein, das sowohl von Pepsin als auch von Trypsin abgebaut wird (HOLTMANN 1960); an seinem Aufbau sind folgende Aminosäuren beteiligt: Glutaminsäure, Leucin/Isoleucin, Asparaginsäure, Arginin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Valin, Lysin, Tyrosin, Alanin, Glycin, Tryptophan, Histidin, Cystein/Cystin und Methionin (ANGUS 1956 d). — Die Kristalle sind in konzentrierter Harnstofflösung unlöslich. Zusatz von 3% Thioglycolsäure zu Alkali erhöht die Löslichkeit. Offenbar ermöglicht erst eine Reduktion von Disulfid-Brücken des Proteins die Spaltung von sekundären Bindungen durch Alkali (YOUNG u. FITZ-JAMES 1959). — In Alkali gelöst wandert das Endotoxin bei der Elektrophorese als einheitliche Fraktion im elektrischen Feld.

Nach MONRO (1959) und eigenen Erfahrungen (KRIEG 1959) hat das Endotoxin antigene Eigenschaften. Vergleichende serologische Untersuchungen des Endotoxins verschiedener Stämme wurden von KRYWIENCZYK u. ANGUS (1960) mittels Immuno-Diffusionstest durchgeführt. Hiernach besitzen die Kristalle zwar eine gemeinsame toxische Komponente, sind jedoch serologisch voneinander unterschieden. Verglichen wurden: *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, *Bac. entomocidus* var. *entomocidus*. Da nach MONRO (1959) aufgelöste parasporale Kristalle von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* aus zwei oder mehreren Komponenten bestehen, diskutierten KRYWIENCZYK u. ANGUS die Frage, ob die toxische Komponente nicht ein allen endotoxisch wirksamen parasporalen Kristallen gemeinsames Spaltprodukt ist, welches im Verlauf von deren Auflösung frei wird.

Das Antigen ist nur in den Sporen, jedoch nicht in den vegetativen Zellen nachweisbar (MONRO 1959; KRIEG 1959). Zu den gleichen Ergebnissen kommt die toxikologische Prüfung: Die Endotoxin-Produktion setzt mit dem Beginn der Sporulation ein (s. Abb. 6).

Die LD₅₀ des sterilen Endotoxin-Extraktes beträgt für Larven von *Bombyx mori* L. bei peroraler Applikation 2×10^{-7} g pro Larve (ANGUS 1956).

b) Außer dem thermolabilen Endotoxin wurden für Insekten toxische Stoffe von verschiedenen Autoren in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen und als »Exotoxin« bezeichnet (McCONNEL u. RICHARDS, BURGERJON u. de BARJAC). Abgesehen von der Hitzebeständigkeit und der geringen Wirtsspezifität ihres Präparates, gehen die übrigen Befunde der Autoren hinsichtlich der Eigenschaften des »Exotoxins« weit auseinander. Meines Erachtens handelt es sich bei dem sog. »Exotoxin« weder um einen definierten chemischen Körper noch um ein einheitliches Produkt. Vielmehr dürfte es sich um heterogene Stoffwechsel-Endprodukte der wachsenden Bazillen handeln, die, genügend hoch dosiert, toxisch wirken können. Ihre Toxizität wiederum dürfte unterschiedlich sein in Abhängigkeit von der Natur des verwendeten Kultur-

mediums (vor allem der Art der C- und N-Quellen) und dem benutzten Bakterien-Stamm. Wenn also hier von dem »Exotoxin« im Sinne von McCONNEL u. RICHARDS oder BURGERJON u. de BARJAC die Rede ist, so geschieht es mit dieser Einschränkung.

Das »Exotoxin« ist nicht Darm-spezifisch, sondern wirkt besonders nach parenteraler Applikation. Diese ist nicht auf Lepidopteren beschränkt, sondern auch bei anderen Insekten nachweisbar. Die LD₅₀ des sterilen »Exotoxin«-haltigen Filtrats beträgt für Larven von *Galleria mellonella* (L.) bei parenteraler Applikation 2×10^{-6} g pro Larve (McCONNEL u. RICHARDS 1959).

Das »Exotoxin« läßt sich durch einfaches Zentrifugieren einer Submerskultur von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* gewinnen. Das Sediment enthält bei jungen Kulturen (12 bis 24 Std.) vegetative Zellen, bei älteren Kulturen (24 bis 36 Std.) den Sporen-Endotoxin-Komplex. Der Überstand enthält das »Exotoxin« in Lösung; er wird durch Entkeimungsfilter gegeben oder im Autoklav 10 min auf 120° C erhitzt. Nach McCONNEL u. RICHARDS (1959) beginnt die »Exotoxin«-Produktion gegen Ende der logarithmischen Phase und erreicht ihr Maximum zu Beginn der Sporulation (Abb. 6). Sie liegt somit zeitlich vor der Endotoxin-Bildung und wird von den vegetativen Zellen besorgt.

Nach BURGERJON u. de BARJAC (1960) soll die starke »Exotoxin«-Wirkung auf Kultur-Filtrate der Stämme von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* beschränkt sein. Ein Nachweis von »Exotoxin« gelang ihnen nämlich bisher nicht bei *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*, *Bac. thuringiensis* var. *alesti*, *Bac. entomocidus* var. *entomocidus* und *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus*. Demgegenüber kommt nach McCONNEL u. RICHARDS (1959) das »Exotoxin« nicht nur bei *Bac. thuringiensis* ganz allgemein, sondern auch bei *Bac. cereus* Fr. et Fr. vor. Die chemische Natur des »Exotoxins« ist noch unbekannt, doch ist es wahrscheinlich weder ein Protein noch ein Lipid (McCONNEL u. RICHARDS 1959). Es ist nicht löslich in organischen Lösungsmitteln, wohl aber in Wasser. Da das »Exotoxin« dialysierbar ist, dürften ihm niedrige Molekulargewichte zukommen.

c) Von den vegetativen Formen des *Bac. thuringiensis* wird eine Hemmwirkung auf andere Bakterien beschrieben (VAŇKOVÁ 1957). Dieses »Antibiotikum« war wirksam gegen Gram-positive Keime wie *Bac. subtilis* Cohn, *Sarcina lutea* Schroeter und *Staphylococcus aureus* Rosenbach. Keine Hemmung wurde beobachtet gegenüber Gram-negativen Keimen wie *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers und *Serratia marcescens* Bizio (vgl. auch S. 58).

d) Neben diesen im toxikologischen Test wirksamen Substanzen läßt sich in Kulturfiltraten von *Bac. thuringiensis*, nicht jedoch in solchen von *Bac. entomocidus*, ähnlich wie bei (insektenpathogenen) Stämmen von *Bac. cereus* Fr. et Fr. (KUSHNER u. HEIMPEL 1957) eine Lecithinase (Typ D) nachweisen. Nach Untersuchungen von CHU (1949) ist diese Lecithinase mit dem α -Toxin von *Clostridium perfringens* weitgehend identisch. Ihre Eigenschaften sind: p_H-Optimum 6,8 bis 7,2; Inaktivierung durch Formaldehyd; 10 Minuten Kochen zerstört etwa 68% der Aktivität. Wirkung auf Eidotter-Lipoprotein (s. S. 21) (besser als α -Toxin). Hämolytische Aktivität; nekrotischer Effekt auf Meerschweinchenhaut; Toxizität gegenüber Mäusen (jedoch geringer als α -Toxin). Wird durch $\frac{2}{3}$ gesättigte Ammoniumsulfatlösung präzipitiert.

Dieses Enzym wird von manchen Autoren (TOUMANOFF u. VAGO 1953) für die insektenpathogene Wirkung mit verantwortlich gemacht: Nach diesen Autoren sind nicht nur Sporenpräparate, sondern auch junge Kulturen von *Bac. thuringiensis* var. *alesti* fähig, Seidenraupen zu töten. Nach TOUMANOFF (1954) waren Filtrate von

Kulturen von *Bac. thuringiensis* var. *alesti* praktisch unwirksam gegenüber Wachsmotten-Larven und zwar bei peroraler und parenteraler Applikation. Fällte er aber die Lecithinase nach der Methode von CHU (1949), so wirkte das Präzipitat sowohl bei peroraler als auch bei parenteraler Applikation toxisch.

Vielleicht läßt sich auch der Befund von VAŇKOVÁ (1957) durch Lecithinase-Wirkung erklären: Sie berichtete über eine 90%ige Mortalität 8 Tage nach Verfütterung vegetativer Zellen von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* an *Euproctis chrysorrhoea* (L.). (Anm.: Es kann sich jedoch in diesem Falle auch um eine »Exotoxin«-Wirkung handeln.)

e) Im Kulturfiltrat von *Bac. thuringiensis*, *Bac. entomocidus* und *Bac. cereus* läßt sich ferner ein Proteinase-Komplex nachweisen. Nach BUCHER (1960) ist dieses Enzym entscheidend für die fakultativ pathogenetische Wirksamkeit von Bakterien gegenüber Insekten. Das Enzym soll die Phagocytose lähmen, wenn die Bakterien auf natürliche oder artifizielle Weise in die Haemocoele gelangen. (Bezüglich des Proteinase-Nachweises auf Gelatine s. u.)

5. Sonstige Eigenschaften und biochemische Leistungen

Sauerstoffbedürfnis: Bei *Bac. thuringiensis* und seinen Verwandten handelt es sich um fakultativ aerobe Bakterien. Vegetatives Wachstum kann bei ihnen auch unter anaeroben Bedingungen erfolgen, jedoch keine Sporulation. Die Sporulationsgeschwindigkeit ist weitgehend von der O₂-Sättigung des Nährbodens abhängig (bei Submerskultur wichtig!).

Wasserstoffionen-Konzentration: Das p_H-Optimum für das Gedeihen des Bazillus liegt bei 7,0 (Wachstumsbereich von p_H 5,0 bis 8,0). Im Verlauf des Wachstums in einem Kohlenhydrat- und Pepton-haltigen Nährmedium erfolgt zunächst Säuerung (Produktion organischer Säuren aus Kohlenhydraten) (p_H 7,2 → 5,2) und dann Alkalisierung (Produktion von Aminen und Ammoniak aus Aminosäuren) (p_H 5,2 → 8,6).

Nährbouillon: Bildung einer Kahmhaut bei sonst relativ klarer Brühe erfolgt nur bei *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Alle anderen Varianten von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* erzeugen dagegen leichte Trübung der Bouillon während Häutchen-Bildung fehlt.

Nähragar: Bildung großer, flacher, unregelmäßig begrenzter, rauher Oberflächen-Kolonien. Sie sind opak und matt, von cremeweißer Farbe im Durchlicht und von bräunlich-weißer Farbe im Auflicht. Tiefenkolonien sind klumpig, unregelmäßig, aber scharf begrenzt.

Gelatine: Verflüssigung durch Proteinase; starke Verflüssigung: var. *euxoaë*, var. *alesti*, var. *sotto*; mittelstarke Verflüssigung: var. *dendrolimus*, *Bac. entomocidus*; schwache Verflüssigung: var. *thuringiensis* (KRIEG 1959, 1960).

Essentielle Aminosäuren: (in Ammonium-Grundnährlösung) l-Asparagin, l-Prolin, l-Leucin, d-, l-Alanin, l-Glutaminsäure, d-, l-Serin und d-, l-Methionin (PROOM u. KNIGHT 1955).

Hyaluronsäure: Keine Hydrolyse; spez. Ferment fehlt (KRIEG 1960).

Stärke: Hydrolyse durch Amylase.

Zuckerfermentation: (in Ammonium-Grundnährlösung). Es werden innerhalb 48 Std. zu Säuren vergoren: Glucose, Maltose, Dextrin, Fructose, Saccharose (variable Reaktion bei Var. *alesti*) und Trehalose. Lactose bleibt unangegriffen. Säurebildung aus Cellobiose unterschiedlich: positiv: *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus* und negativ: *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Voges-Proskauer-Reaktion: Acetylmethylcarbinol wird von *Bac. thuringiensis* produziert, nicht dagegen von *Bac. entomocidus*.

Lecithinase (D) (= Phospholipase (C) = Phosphodiesterase): Sie spaltet Lecithin bzw. Kephalin zu Phosphorylcholin bzw. Phosphorylcolamin und Fettsäurediglycerid. Ihr Nachweis erfolgt auf koaguliertem Eidotter*). Als Folge der Lecithinase-Wirkung entstehen zunächst Trübung und dann weiß-glänzende Ausfällungen von unlöslichen Seifen. Bei starker Lecithinase-Wirkung sehen die opaken Ausfällungen Kolonie-artig aus. Starke Spaltung: *Bac. thuringiensis* var. *euxoae*, var. *dendrolimus*, var. *sotto*; schwache Spaltung: var. *thuringiensis*, var. *alesti*; keine Spaltung: *Bac. entomocidus* (KRIEG 1959, 1960).

Phosphatase (= Phosphomonoesterase): Sie spaltet Phosphorylcholin bzw. Phosphorylcolamin in Phosphorsäure und den entsprechenden Aminoalkohol. Ihr Nachweis erfolgt in Bouillon mit 1‰ Colaminphenolphthaleinphosphat. Nach 24 Std. Bebrütung bei 37°C wird 10‰iges NH₄OH zugesetzt. Die Stärke der dabei auftretenden Rotfärbung ist ein Maß für die Phosphatase-Aktivität. Starke Rotfärbung: *Bac. thuringiensis* var. *sotto*; mittelstarke bis schwache Rotfärbung: *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*. Rotfärbung kaum erkennbar: *Bac. thuringiensis* var. *alesti*, var. *euxoae*, *Bac. entomocidus* var. *entomocidus* (KRIEG 1960).

Hämolyse: Deutliche (β-)Hämolyse bei *Bac. thuringiensis* (var. *thuringiensis*, var. *sotto*, var. *dendrolimus*, var. *alesti*, var. *euxoae*) und *Bac. entomocidus* nach 24 Std. auf 2‰igem Menschenblut-Agar bei 22 bis 24°C (KRIEG 1960).

Pigment: Auf koaguliertem Eidotter*) wird nach 3—5 Tagen von *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und var. *euxoae* ein dunkelroter Wasser- und Äther-unlöslicher Pigment-Farbstoff gebildet (wahrscheinlich ein Chromoproteid auf Carotinoidbasis).

6. Taxonomie und Bestimmungsschlüssel

Von allen anderen Sporenbildnern unterscheidet sich die *Bac. cereus*-Gruppe durch die Bildung von Lecithinase D (= Phospholipase C) und Acetylmethylcarbinol (Voges-Proskauer-Reaktion positiv) und die Nicht-Vergärbarkeit von Xylose und Arabinose. Da *Bac. thuringiensis* diesen Kriterien entspricht, wurde er von SMITH u. Mitarb. (1946) zu *Cereus* gestellt.

Bac. thuringiensis und seine Verwandten unterscheiden sich jedoch von *Bac. cereus* durch die Bildung eines kristallinen Endotoxins (in Form eines parasporalen Körpers). Da die Kristallbildung ein stabiles Merkmal ist, entschlossen sich HEIMPEL u. ANGUS (1960) in Anlehnung an DELAPORTE u. BÉGUIN (1955) zur Abgrenzung von *Bac. thuringiensis* gegenüber *Bac. cereus*. Dabei ergaben sorgfältige Literaturstudien, daß die Priorität als »type species« dem *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner zukommt.

*) Bei 80°C koagulierter steriler Eidotter wurde von MÜLLER-KÖGLER 1959 zur Züchtung von Entomophthoraceen empfohlen; nach Versuchen von KRIEG (1959) eignet er sich besser als die bisher üblichen Eiernährböden zum Lecithinase-Nachweis und zum Nachweis der Pigmentbildung.

Ein von STEINHAUS (1951) isolierter Insekten-pathogener Kristallbildner, welcher aber im Gegensatz zu *Bac. thuringiensis* kein Acetylmethylcarbinol und keine Lecithinase D bildet, wurde von HEIMPEL u. ANGUS (1958b) *Bac. entomocidus* benannt.

Während die Mehrzahl der Untersucher in Übereinstimmung mit HEIMPEL u. ANGUS (1958b) in der Bildung der Endotoxin-Kristalle eine charakteristische Eigenschaft von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* sehen, will TOUMANOFF (1956) sie nicht als differentialdiagnostisches Kriterium anerkennen. TOUMANOFF u. Mitarb. (1955) beobachteten einen Kristallverlust bei *Bac. thuringiensis* var. *alesti*, z. B. nach längerem Wachstum auf Nähragar pH 9,0 bis 9,5. Bei Kultur auf neutralem Nähragar erwies sich der Stamm als a-sporogen und a-kristallophor. Wurden diese Bakterien jedoch in Raupen von *Galleria* injiziert, so erlangten sie ihre Sporulation und Kristallbildung wieder. Die re-isolierten Stämme waren jedoch gegenüber *Bombyx mori* schwächer wirksam als der originelle var. *alesti*-Stamm. Als FITZ-JAMES u. YOUNG (1959) einen solchen re-isolierten Stamm (B-1) von TOUMANOFF untersuchten, handelte es sich um einen typischen *Bac. thuringiensis*-Stamm und nicht mehr um einen var. *alesti*-Stamm, und zwar bezogen auf den Rest-P-Gehalt*, die Pigmentbildung und die Virulenz gegenüber *B. mori*. Dieser Befund und die Tatsache, daß KRIEG (1956) und ŠVECOVA (1958) aus *Galleria mellonella*-Raupen *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* isolieren konnten, sprechen dafür, daß TOUMANOFF einen anderen Stamm als den eingepflichten re-isolierte. Das gleiche gilt für das Experiment von TOUMANOFF (1956), bei dem er einen Stamm von *Bac. cereus* injizierte und einen kristallophoren Stamm (A-30) aus *G. mellonella*-Raupen re-isolierte. Auch hier wieder stellten FITZ-JAMES u. YOUNG (1959) fest, daß der sporogene Stamm sich in nichts von einem *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* unterschied, wohl aber u. a. im Rest-P-Gehalt deutlich von dem eingepflichten *Bac. cereus*. Ähnliche Experimente mit gleichen Ergebnissen wie TOUMANOFF unternahm sein Mitarbeiter Le CORROLLER (1958).

Andererseits konnten FITZ-JAMES u. YOUNG (1959) nur durch Einwirkung mutagener Agentien (wie Formalin) einen irreversiblen Verlust der Kristallbildung bei *Bac. sotto* induzieren. Hierbei änderten sich aber andere Eigenschaften, wie z. B. Rest-P-Gehalt, nicht. Die meisten Autoren stimmen darin überein, daß unter normalen Bedingungen auf Nähragar in Reinkulturen von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* die Kristallbildung überraschend stabil und offenbar konstitutiv genetisch verankert ist (s. auch HEIMPEL u. ANGUS 1960 a). Wenn VAŇKOVÁ (1957) einen Verlust der Kristallbildung nach 6 Monaten beschrieb, so nehmen HEIMPEL u. ANGUS (1960a) als Erklärung ein Überwachsen durch *Bac. cereus* an. Nach HEIMPEL (1960a) verdrängt *Bac. cereus* in Mischkulturen mit *Bac. thuringiensis* letzteren in einigen Monaten. Jedoch ist auch eine Überwachsung durch eine kristallfreie Mutante möglich, speziell da LYSENKO (1958) eine solche Mutante (#059) von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (#058) isolieren konnte.

Nach DELAPORTE u. BÉGUIN (1955) sowie HEIMPEL u. ANGUS (1958 b) ist der »Anduze«-Stamm von *Bac. thuringiensis* der var. *alesti* zuzuordnen.

Nach vergleichenden Untersuchungen von KRIEG besteht keine Notwendigkeit, den von ŠVECOVA aus *Galleria mellonella* isolierten Stamm als neue Varietät im Sinne von TOUMANOFF u. Le CORROLLER (1959) anzusprechen.

*) Var. *thuringiensis*-Sporen haben (nachdem RNS-P und DNS-P entfernt sind) einen etwa 10fach höheren Rest-P-Gehalt als var. *alesti*, var. *sotto* oder *Bac. cereus*. Der Kristall enthält kein P (FITZ-JAMES u. YOUNG 1959).

Zur Abgrenzung der *Bac. thuringiensis*-Verwandten untereinander und gegenüber anderen morphologisch und physiologisch ähnlichen Arten des Genus *Bacillus* Cohn kann der folgende Schlüssel (z. T. nach HEIMPEL u. ANGUS 1958b — verändert —, z. T. nach TOUMANOFF u. Le CORROLLER 1959 — verändert —) dienen:

Bestimmungsschlüssel für die *Bac. cereus*-Gruppe

Aerobe Bazillen vom *Bac. cereus*-Typ (plumpe Stäbchen; Sporen elliptisch bis zylindrisch, parazentral bis subterminal gelegen. Sporangien nicht aufgetrieben). Gram-positiv.

- (1) a) Mit parasporalem Körper → 2
 b) Ohne parasporalen Körper: *Bacillus megatherium* de Bary 1884
 oder *Bacillus anthracis* Cohn 1872
 oder *Bacillus cereus* Fr. et Fr. 1887
- (2) a) Parasporaler Körper fest mit Spore verhaftet, sogar noch nach einigen Monaten Lagerung. Nicht pathogen für verschiedene Lepidopteren-Raupen:
Bacillus finitimus Heimpele et Angus 1958
 b) Parasporaler Körper und Spore verlassen getrennt nach 2 bis 6 Tagen das Sporangium. Parasporaler Körper wirkt als spezifisches Endotoxin pathogen auf verschiedene Lepidopteren-Raupen → 3
- (3) a) Voges-Proskauer-Reaktion positiv. Lecithinase-Produktion → 4
 b) Voges-Proskauer-Reaktion negativ. Keine Lecithinase-Produktion → 8
- (4) a) Pigmentbildung auf koaguliertem reinen Eidotter → 5
 b) Keine Pigmentbildung auf koaguliertem Eidotter → 6
- (5) a) Pigmentbildung auch auf Eidotter-Serum-Agar; geringe Verflüssigung von koaguliertem Serum:
Bacillus thuringiensis var. *alesti* Toum. et Vago 1951
 b) Keine Pigmentbildung auf Eidotter-Serum-Agar; schnelle Verflüssigung von koaguliertem Serum:
Bacillus thuringiensis var. *euxoae* Toum. et Le Coroll. 1959*)
- (6) a) Schwache bis mäßige Lecithinase-Bildung, geringfügige Verflüssigung von koaguliertem Serum:
Bac. thuringiensis var. *thuringiensis* Berliner 1915
 (hierzu auch *Bacillus galleriae* von ŠVECOVA und der von KRIEG aus *Galleria* isolierte Stamm von *Bacillus thuringiensis***)).
 b) Starke Lecithinase-Bildung; weitgehende Verflüssigung von koaguliertem Serum → 7
- (7) a) Langsame Verflüssigung
Bac. thuringiensis var. *sotto* Ishiwata 1901***)
 b) Schnelle Verflüssigung
Bac. thuringiensis var. *dendrolimus* Talalaeve 1956

*) erstmals von KRIEG 1956 isoliert

**) erstmals bei KRIEG u. FRANZ 1959 erwähnt

***) s. STEINHAUS 1961

- (8) a) Säurebildung aus Fructose und Glucose (bei 32°C) noch nach 20 Tagen nachweisbar (sehr wirksam gegen *Bombyx mori*-Larven; schwach gegen *Pieris brassicae*-Larven):

Bacillus entomocidus var. *entomocidus* Heimpel et Angus 1958*)

- b) Säurebildung aus Fructose und Glucose (bei 32°C) nach 20 Tagen nicht mehr nachweisbar (schwach wirksam gegen *Bombyx mori*-Larven; stark wirksam gegen *Pieris brassicae*-Larven):

Bac. entomocidus var. *subtoxicus* Heimpel et Angus 1958*)

Aus den kristallophoren Arten und Varietäten heben sich verschiedene Gruppen mit ähnlichem Verhalten heraus:

1. *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Gruppe (hierzu var. *galleriae*)
2. *Bac. thuringiensis* var. *alesti*-Gruppe (hierzu var. *euxoae*)
3. *Bac. thuringiensis* var. *sotto*-Gruppe (hierzu var. *dendrolimus***))
4. *Bac. entomocidus*-Gruppe (mit var. *entomocidus* und var. *subtoxicus*)

7. Reaktion gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen (einschließlich Sterilisation und Desinfektion)

a) Temperatur-Einfluß

Es handelt sich hier um mesophile Bazillen mit gutem Wachstum zwischen 28 und 35°C; das Wachstums-Optimum liegt bei 30°C. Vegetative Keime ertragen 100 min lang 60°C und Sporen 10 sek lang 100°C. Die relative Hitzeresistenz der Sporen erleichtert die Isolierung des Bazillus: Raupen-Kadaver bzw. (bei Rückstands-Untersuchungen) behandelte Blätter werden erst kurze Zeit in 80 bis 100°C heißes Wasser gebracht, bevor Ausstriche auf Agarplatten hergestellt werden. Die Sterilisation von infiziertem Gerät erfolgt entweder 30 min in gespanntem Wasser-Dampf des Autoklaven bei 120°C (= 2 atü), wobei Sporen und das thermolabile Endotoxin zerstört werden, jedoch nicht das thermostabile »Exotoxin« in Kulturfiltraten von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

b) Strahlen-Wirkung

Infrarot: Die Wirkung ist als unspezifische Wärmewirkung aufzufassen; sie entspricht dem Vorgang der Trocken-Sterilisation und ist bei geeigneter Anordnung des Strahlers sehr wirksam gegenüber Sporen und Endotoxin.

Ultraviolett: Bei $\lambda = 260 \mu$ ist eine spezifische Strahlen-Wirkung auf Nukleoproteide bekannt (Absorptionsmaximum). Sie ist wohl der Hauptgrund dafür, daß *Bac. thuringiensis* und seine Sporen gegenüber UV sehr empfindlich sind. Die Strahlung eines Quecksilberbrenners kann daher zur Inaktivierung herangezogen werden. Hierbei werden nur die Sporen abgetötet, während das Endotoxin (das bei $\lambda = 260 \mu$ ein Absorptionsminimum hat) unangegriffen bleibt. In der UV-Behandlung des Sporen-Endotoxin-Komplexes besitzt man eine physikalische Methode zur Herstellung eines nichtinfektiösen Endotoxin-Präparates bei strahlenempfindlichen Stämmen (BONNEFOI u. BÉGUIN***).

*) erstmals von STEINHAUS 1951 isoliert

***) s. a. HEIMPEL u. ANGUS 1960b

***) Anm.: relativ strahlenresistente Mutanten sind bekannt

c) Säure- und Alkali-Wirkung

Behandlung mit n-HCl bewirkt bereits unterhalb 24 Std., n/10 HCl erst nach etwa 24 Std. eine Abtötung von Sporen-Präparaten. Unterhalb p_H 3 wird auch das Endotoxin zerstört. Nach Behandlung mit NaOH erfolgt innerhalb von 24 Std., bei Verwendung von n/10 NaOH erst nach 24 Std. eine Abtötung. Da es bereits gelingt, durch Anwendung von 0,02 bis 0,05 n-NaOH (p_H 11 bis 12) das Endotoxin zu extrahieren, sind Sporen-Präparate, sobald sie mit höherkonzentriertem Alkali behandelt wurden, auch wenn sie noch lebensfähig sind, Endotoxin-frei. Hieraus resultiert eine chemische Methode zur Herstellung eines Toxin-freien Sporen-Präparates.

d) Formaldehyd-Wirkung

Sehr wirksam als Desinfiziens erwies sich Formaldehyd. Die gebräuchliche 40%ige Lösung (sog. Formalin) wird angewandt in Verdünnung 1 : 5 bis 1 : 10. Formaldehyd zerstört nicht nur die Infektiosität der Bazillen, sondern auch die Giftwirkung des Endotoxins und toxisch wirkender Enzyme (Lecithinase, Proteinase), da es sich chemisch mit Proteinen verbindet. Die Inaktivierungszeit beträgt bei 4%iger Lösung weniger als 5 min. Für Laborzwecke (Desinfektion von Geräten, die hitzeempfindliche Teile besitzen, wie z. B. Insekten-Zuchtkästen, Dosierungsapparate) kann folgendes Desinfektions-Verfahren angewandt werden: (1) Eintauchen in oder Besprühen mit 4%iger Formalinlösung. Einwirkungszeit 5 min. (2) Neutralisierung des Formalins durch verdünnte Ammoniak-Lösung. (3) Gründliches Spülen mit Wasser.

8. Mikroökologie (Begrenzungsfaktoren; dazu Antibiotika, Phagen)

a) Allgemeines

Bei *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* läßt sich ökologisch eine pathogenetische Phase von einer saprophytischen Phase unterscheiden. In diesen Phasen herrschen unterschiedliche Bedingungen, so daß rein theoretisch eine bivalente Anpassung erfolgen kann. Die Annahme, daß die Bildung von Endotoxin-Kristallen einer solchen Anpassung unterliegt, scheint jedoch nicht zuzutreffen (s. S. 22). Worauf daher die von LEMOIGNE u. Mitarb. (1956), MAJUMDER u. Mitarb. (1956) sowie von VAŇKOVÁ (1957) beschriebenen Virulenzverluste von *Bac. thuringiensis*-Stämmen bei laufender Nährbodenpassage und ihre Behebung durch Tierpassagen beruhen, ist noch unklar.

Die Ökologie der Mikroorganismen wird grundsätzlich von ähnlichen Prinzipien beherrscht wie die Ökologie der Makroorganismen. Zu den abiotischen Begrenzungsfaktoren der Bakterien gehören vor allem die physikalischen und chemischen Umweltsbedingungen wie Strahlung, Temperatur, Hydratation, Wasserstoffionen-Konzentration, Redoxpotential, sonstige Chemikalien. Als biotische Begrenzungsfaktoren wirken neben intraspezifischen vor allem auch extraspezifische. Zu letzteren sind neben Nahrungs-Beschränkung (in Form von Wirten, organischen Nährstoffen) insbesondere Konkurrenten und natürliche Gegenspieler zu rechnen. Weiterhin können als Begrenzungsfaktoren die Immunitätsfaktoren der Wirte eine Rolle spielen. Auch ist mit antibiotischen Einflüssen anderer Organismen und mit der Einwirkung von Bakteriophagen zu rechnen.

Inwieweit diese Einflüsse das natürliche Geschehen, respektive das epizootische Auftreten von *Bac. thuringiensis* in der Natur bestimmen, ist noch nicht untersucht. Immerhin ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von HEIMPEL (1960)

interessant, daß *Bac. thuringiensis* gegenüber *Bac. cereus* auf künstlichem Nährboden in bezug auf die Selektion im Nachteil ist: in gemischten Kulturen verdrängt letzterer *Bac. thuringiensis* in einigen Monaten.

b) Antibiotika

KUSHNER u. HARVEY (1960) konnten nachweisen, daß antibakterielle Substanzen der Futterpflanzen noch im Darminhalt von Insekten-Larven wirksam sind und so möglicherweise deren Anfälligkeit gegenüber Bakterien beeinflussen. Speziell wirkten Preßsäfte aus *Abies balsamea* (L.) Mill. und *Larix laricina* (Du Roi) Koch im Plattentest antibiotisch gegenüber *Bac. thuringiensis*.

KRIEG u. MÜLLER-KÖGLER (1959) stellten antibakterielle Wirkungen gegenüber *Bac. thuringiensis* bei zwei Fungi fest: *Aspergillus flavus* Link et Fr. und *Penicillium frequentans* Westl. — Nach Untersuchungen von TOUMANOFF u. LAPIED (1954) ist das aus *Penicillium notatum* Westl. stammende Antibiotikum Penicillin gegenüber *Bac. thuringiensis* im Gegensatz zu *Bac. anthracis* unwirksam, da *Bac. thuringiensis* und seine Verwandten eine Penicillinase produzieren (vgl. auch S. 10).

Aus Streptomyceten sind eine Reihe gegenüber *Bac. thuringiensis* wirksame Antibiotika bekannt: aus *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waks. et Henr. das Streptomycin, aus *Streptomyces aurantiacus* (R.-D.) Waks. das Aureomycin, aus *Streptomyces venezuelae* Ehrlich et al. das Chloromycetin, aus *Streptomyces rimosus* Sobin et al. das Terramycin (TOUMANOFF u. LAPIED 1954). — Nach AFRIKIAN (1960) waren außer Streptomycin, Aureomycin, Chloromycetin und Terramycin noch stark wirksam: Aktinomycin, Erythromycin, Kanamycin, Amphomycin und Neomycin.

c) Bakteriophagen

Wirksame Phagen gegen *Bac. thuringiensis* wurden von AFRIKIAN (1960) aus Kulturen von *Bac. cereus* var. *mycoides* (#1), *Bac. cereus* var. *cereus* (#55) und von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (#81) isoliert. Der im EM abgebildete Phage aus *Bac. thuringiensis* gehört zur Gruppe der »großen Phagen« und besitzt deren klassische Form (ausgeprägter Kopf- und Schwanzteil).

Da mehrmals Phagen aus *Bombyx mori* isoliert wurden, nimmt AFRIKIAN an, daß diese Phagen in das pathogenetische Geschehen im Sinne einer Infektions-Hemmung eingreifen könnten. Eine wirksame Phagen-Therapie bei *B. mori* war allerdings nicht erfolgreich, da sehr schnell Phagen-resistente Bazillen selektioniert wurden.

Die von YODER u. NELSON (1960) isolierten Phagen bilden plaques (= »Löcher«) im homogenen Rasen einer Plattenkultur von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Die plaques des Phagen (a) messen 0,5 bis 4,0 mm im Durchmesser, die des Phagen (b) 8,0 bis 22 mm. Ein besonderes Kennzeichen des Phagen (b) ist, daß seine plaques von einem Halo umgeben sind. Die beiden Phagen zeigen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den verschiedenen Varianten von *Bac. thuringiensis*. Gegenüber dem Phagen (a) erwies sich auch *Bac. anthracis* Cohn empfindlich, nicht dagegen *Bac. cereus* Fr. et Fr.; gegenüber dem Phagen (b) war das Verhalten der letztgenannten Bazillen umgekehrt. Die Phagen-Sensibilität der untersuchten Bazillen ist weder mit ihrer Säuger-Pathogenität noch mit ihrer Insekten-Pathogenität korreliert. Die Sensibilitäts-Verhältnisse verschiedener Bazillen gegenüber Phagen, die u. a. auch gegen *Bac. thuringiensis* wirksam sind, werden in Tab. 1 wiedergegeben:

Tab. 1. Wirtsspektrum von *Bac. thuringiensis*-Phagen.

Wirts-Bacillus	Phagen-Typ				
	♯1*)	♯55*)	♯81*)	(a)**)	(b)**)
<i>Bac. thuring.</i> var. <i>thuringiensis</i>	+	+	+	+	+
<i>Bac. thuring.</i> var. <i>dendrolimus</i>	+	+	+	∅	∅
<i>Bac. thuring.</i> var. <i>sotto</i>	+	+	+	-	-
<i>Bac. thuring.</i> var. <i>alesti</i> (Alés)	∅	∅	∅	+	-
<i>Bac. thuring.</i> var. <i>alesti</i> (Anduze)	+	-	+	-	-
<i>Bac. entomocidus</i> var. <i>subtoxicus</i>	+	+	+	∅	∅
<i>Bac. cereus</i> var. <i>cereus</i>	+	+	+	-	+
<i>Bac. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	+	-	+	-	+
<i>Bac. anthracis</i> Cohn	∅	∅	∅	+	-
<i>Bac. megatherium</i> de Bary	∅	∅	∅	-	-
<i>Bac. laterosporus</i> Laubach	∅	∅	∅	-	+

*) Nach AFRIKIAN (1960)

**) Nach YODER u. NELSON (1960)

+ = sensibel

- = resistent

∅ = nicht untersucht

C. Wirksamkeit gegenüber Insekten

1. Kontaminationsbedingungen

a) Allgemeines

Die hier zur Diskussion stehenden »kristallbildenden Bazillen« nehmen eine Sonderstellung zwischen den hochspezifischen und schwer in vitro zu kultivierenden obligaten Pathogenen (wie z. B. *Bacillus popilliae* Dutky et Gooden) und den unspezifischen und leicht in vitro kultivierbaren fakultativen und potentiellen Pathogenen (wie z. B. *Bacillus cereus* Fr. et Fr.) ein.

Die Kontamination der Wirtstiere durch *Bac. thuringiensis* und seine Verwandten erfolgt peroral. Experimentell ist auch intracoelomale Injektion möglich. Eine vertikale, d. h. germinative Übertragung (z. B. via ovo) des Bazillus kommt nicht vor. Über eine horizontale Übertragung, d. h. eine Infektkette von Wirtstier zu Wirtstier berichtete BERLINER (1915) bei *Anagasta kühniella* und HERFS (1959) bei *Pieris rapae* in Laborversuchen. Eine solche Weiterverbreitung im Freilandversuch registrierte TALALAEV (1958, 1959) bei *Dendrolimus sibiricus*. Weiterhin muß eine horizontale Übertragung den natürlichen Epizootien zugrunde liegen. Im allgemeinen liegt der Krankheitserreger in Form seines Endotoxin-haltigen Sporenkomplexes vor. Jedoch kann auch zusätzlich noch ein »Exotoxin« vorhanden sein.

Während AOKI u. CHIGASAKI (1911) feststellten, daß nur sporulierte Kulturen und nicht vegetative Keime von *Bac. thuringiensis* var. *sotto* Seidenraupen paralytierten, konnten TOUMANOFF u. VAGO (1953) auch durch junge Kulturen und

nicht nur durch Sporen-Präparate von *Bac. thuringiensis* var. *alesti* Seidenraupen abtöten (s. S. 19). Auch VÁNKOVÁ (1957) berichtete über eine tödliche Wirkung negativer Keime von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* auf Raupen von *Euproctis chrysorrhoea* (L.).

Die Wirkung von Infektion bzw. Intoxikation ist (außer von der Applikationsart) abhängig von der Dosis, dem Bakterienstamm und seiner Zubereitung (vegetative Keime, Sporen-Endotoxin-Komplex oder »Exotoxin«-haltiges Präparat), der Wirtspopulation und deren Allgemeinzustand sowie der Temperatur u. a. Außeneinflüssen.

Im Zusammenhang mit der Infektionswirkung von Bakterien werden die Begriffe Pathogenität und Virulenz gebraucht. Bei der Pathogenität handelt es sich um eine erblich fixierte Anlage einer Species oder Varietät, bei der Virulenz hingegen um den Grad der Wirksamkeit des entsprechenden Merkmals (Infektiosität) bei verschiedenen Stämmen (KRIEG 1961).

b) Pathogenität

Beim Begriff der Pathogenität geht es um die qualitative Entscheidung: Ist eine Mikroorganismen-Art bzw. sind ihre Toxine und/oder Enzyme bei einer vorgegebenen Applikationsart (wie z. B. der peroralen) pathogen oder apathogen für eine Wirtsart (oder umgekehrt ausgedrückt, ist die Wirtsart gegenüber dem Mikroorganismus empfindlich oder resistent). Diese Prüfung erfolgt zweckmäßigerweise mit hohen Dosen des Erregers gegen alle Entwicklungsstadien des Wirtes. Die Ergebnisse solcher Prüfungen von Sporenpräparaten sind folgende:

Perorale Applikation

Bei der Prüfung an Insekten erwies sich der reine Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* (wenn er peroral appliziert wurde) lediglich gegenüber Lepidopteren pathogen (s. Wirtsliste). Diese werden jedoch nur als Raupen befallen, nicht dagegen im Imaginal-Stadium.

Eine ähnliche Wirkung läßt sich erzielen durch Verfütterung von Endotoxin allein. So konnte ANGUS (1956 c) zeigen, daß peroral appliziertes Endotoxin von *Bac. thuringiensis* var. *sotto* sich gegen 12 untersuchte Lepidopteren-Arten wirksam erwies, jedoch nicht gegenüber 4 in den Versuch einbezogene Hymenopteren-Arten.

Bei anderen Ordnungen als Lepidopteren wurde bei Applikation des reinen Sporen-Endotoxin-Komplexes im allgemeinen keine biologische Wirkung gefunden. So war *Bac. thuringiensis* unwirksam:

bei *Hymenoptera* [*Apis mellifera* L.: KRIEG 1956, KAESER 1957, LECOMTE u. MARTOURET 1958; *Diprion hercyniae* (Htg.): KRIEG 1956, ANGUS 1956 c; *Neodiprion sertifer* (Geoffr.): KRIEG 1957 c; *Neodiprion abietis* (Harr.): ANGUS 1956 c; *Neodiprion americanus banksianae* (Roh.): ANGUS 1956 c; *Pristiphora abietina* (Christ): KRIEG 1956; *Croesus septentrionalis* L.: KRIEG 1957; *Anilatus ebenivus* Graw.: BILIOTTI 1956 a; *Apanteles glomeratus* L.: BILIOTTI 1956 a, c, ISAKOVA 1958 b];

bei *Coleoptera* [*Leptinotarsa decemlineata* (Say): KRIEG 1957; *Melolontha* spp. (L.): KRIEG 1957, LEMOIGNE u. Mitarb. 1956; *Lilioceris lili* Scop.: LEMOIGNE u. Mitarb. 1956, *Rhizopertha dominica* (Fabr.): STEINHAUS u. BELL 1953; *Sitophilus (Calandra) granaria* (L.): BERLINER 1915, ISAKOVA 1958 b; *Sitophilus (Calandra) oryzae* (L.): BERLINER 1915; *Tenebrio molitor* L.: BERLINER 1915; *Tribolium ferrugineum* Fabr.: BERLINER 1915; *Dermestes lardarius* L.: BERLINER 1915; *Trogoderma granarium* Everts: DE u. KONAR 1955; *Acanthoscelides obtectus* (Say): METALNIKOV u. CHORINE 1929 c; *Gnathoceros cornutus* (Fabr.): BERLINER 1915];

bei *Diptera* [*Tipula paludosa* Meig.: KRIEG 1957; *Scutigera immaculata* (Newp.): TANADA 1957; *Aedes nigromaculis* (Ludlow): KELLEN u. LEWALLEN 1960; *Anopheles maculipennis* Meig.: METALNIKOV u. CHORINE 1929 c; *Culex pipiens* L.: METALNIKOV u. CHORINE 1929c, KELLEN u. LEWALLEN 1960; *Culex tarsalis* (Coq.): KELLEN u. LEWALLEN 1960];

bei *Heteroptera* [*Eurygaster integriceps* Put.: ISAKOVA 1958 b];

bei *Orthoptera* [*Chorthippus pulvinatus* F. W.: METALNIKOV u. CHORINE 1929c; *Chorthippus dorsatus* Zell.: METALNIKOV u. CHORINE 1929; *Stauroderus biguttulus* L.: METALNIKOV u. CHORINE 1929; *Calliptamus italicus* (L.): METALNIKOV u. CHORINE 1929 c, ISAKOVA 1958 b].

Diesen negativen Befunden stehen auch eine Anzahl von Erfolgen mit *Bac. thuringiensis*-Präparaten bei Nicht-Lepidopteren gegenüber, und zwar:

bei *Hymenoptera* [*Pristiphora erichsonii* (Htg.): HEIMPEL 1955; *Pristiphora rufipes* Lep. (syn. *Pristiphora pallipes* Lep.): BURGERJON u. de BARJAC 1960; *Pteronidea ribesii* Scop.: ISAKOVA 1958 b];

bei *Coleoptera* [*Hypera brunneipennis* (Boh.): HALL 1957, HALL u. DUNN 1958; *Sitophilus (Calandra) granaria* (L.): STEINHAUS u. BELL 1953; *Tribolium confusum* Duv.: STEINHAUS u. BELL 1953; *Oryctes rhinoceros* L.: STEINHAUS 1951 d];

bei *Diptera* [*Musca domestica* L.: HALL u. ARAKAWA 1959, DUNN 1960, BRIGGS 1960; *Aedes aegypti* (L.): LILES u. DUNN 1959; *Culex pipiens* L. und *Anopheles* spec.: VAŇKOVÁ 1960];

bei *Orthoptera* [*Carausius morosus* Brünner: ZERNOFF 1932].

Diese positiven Resultate haben offenbar ihren Grund darin, daß die verwendeten Präparate z. T. nicht nur Lepidopteren-spezifisches Endotoxin enthielten, sondern auch noch Lepidopteren-unspezifisches »Exotoxin« (BURGERJON u. de BARJAC 1960) (s. S. 54ff); in anderen Fällen, wie z. B. bei den Versuchen von LILES u. DUNN (1959), verfälschten Zusätze zu den Präparaten und ungünstige Versuchsbedingungen das Ergebnis (s. KELLEN u. LEWALLEN 1960).

Bei intracoelomaler Injektion von *Bac. thuringiensis* in Form vegetativer Zellen oder Sporen gehen auch andere Insekten als Lepidopteren-Raupen innerhalb 24 Std. ein, so z. B. *Locusta migratoria migratoria* (L.) — (*Orthoptera*), *Melolontha melolontha* (L.) — (*Coleoptera*), *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) — (*Hymenoptera*) u. a. Diese Wirkung ist aber unspezifisch: sie wird auch durch Injektion anderer fakultativ oder potentiell pathogener Bazillen erreicht, wie z. B. *Bac. cereus* Fr. et Fr.

Werden keine Bazillen, sondern Toxin-Fractionen injiziert, so kommt man zu unterschiedlichen Ergebnissen: Injektion von thermolabilem Endotoxin hat auf *Bombyx mori*-Larven keine (ANGUS 1956 c), auf *Pieris brassicae*-Larven geringe (MARTOURET 1960) Wirkung.

Wird hingegen das thermostabile »Exotoxin« der var. *thuringiensis* injiziert, so sterben nicht nur die Lepidopteren-Larven, sondern auch Nicht-Lepidopteren an Intoxikation (McCONNEL u. RICHARDS 1959).

c) Virulenz

Nach übereinstimmender Ansicht der meisten Autoren ist die Virulenz der einzelnen *Bac. thuringiensis*- und *Bac. entomocidus*-Stämme relativ konstant. Über unverminderte Toxin-Produktion berichtete STEINHAUS (1951) bei einem *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Stamm nach 25 jähriger Kultivierung auf Nähragar

sowie HEIMPEL u. ANGUS (1960) bei einem *Bac. thuringiensis* var. *sotto*-Stamm nach 45 jähriger Kultivierung auf Nähragar. Ähnliche, wenn auch kurzfristigere Beobachtungen über die Konstanz der Kristallbildung liegen von BERLINER (1915) und KRIEG (1960 a) an *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* vor. Die Tatsache, daß das Endotoxin unabhängig von der pathogenen Phase gebildet wird, ja sogar im allgemeinen besser auf künstlichen Nährboden als in Insekten (HEIMPEL u. ANGUS 1960), läßt auch keine pathogenetische Anpassung im Sinne einer Virulenzsteigerung durch Tierpassagen erhoffen.

In einem gewissen Gegensatz hierzu stehen Beobachtungen von LEMOIGNE u. Mitarb. 1956, MAJUMDER u. Mitarb. 1956, VAŇKOVÁ 1957, wonach ein Virulenzverlust durch Nährbodenpassagen resultierte. Diese Wirksamkeitsreduktionen waren jedoch reversibel und ließen sich durch Tierpassagen wieder aufheben.

Die Virulenz von *Bac. thuringiensis* gegenüber einem bestimmten Wirt (z. B. *Bombyx mori*) ist offenbar nicht für die Variation konstant, sondern für den Stamm: So berichtete STEINHAUS (1960 a) über einen Stamm von var. *thuringiensis*, der wirksamer als ein Stamm von var. *sotto* und *Bac. entomocidus* war, und über einen zweiten Stamm von var. *thuringiensis*, der weniger wirksam war als var. *sotto* und *Bac. entomocidus*. Dies ist erklärlich aus der Tatsache, daß verschiedene Stämme verschieden große Endotoxin-Kristalle ausbilden.

2. Wirksamkeitsbestimmung am spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplex

Vom insektenpathologischen Standpunkt (und ebenso vom Standpunkt der Anwendung) ist es wichtig, zwischen der spezifischen Wirkung aller *Bac. thuringiensis*-Verwandten auf Lepidopteren und einer von verschiedenen Autoren gelegentlich beobachteten zusätzlichen unspezifischen Wirkung auf Nicht-Lepidopteren zu unterscheiden. Da für die biologische Bekämpfung von Schadinsekten vor allem die spezifische Wirkung (wie sie allein dem gereinigten Sporen-Endotoxin-Komplex zukommt) interessiert, sei diese hier zunächst für sich behandelt. Über die Natur des Endotoxins s. S. 17.

a) Standardisierung und Dosierung der Präparate

Zur Standardisierung insektenpathogener Bazillen-Präparate können ebenso wie bei Giften Angaben der LD_{50} oder LD_{90} in mg Trockengewicht des Präparates dienen, wobei sich diese Angabe stets auf ein bestimmtes Larvenstadium der Testpopulation einer bestimmten Tierart bezieht. Die LD_{50} bzw. LD_{90} wird aus den Mortalitäts-Daten von mehreren Konzentrationen errechnet, und zwar durch Transformation der Mortalitäts-Summenkurve in eine Probit-Gerade. Unter dem Schnittpunkt dieser mit der LD_{50} - bzw. LD_{90} -Ordinate läßt sich die zugehörige Dosis auf der Abszisse ablesen. Beispielsweise arbeitet MENN (1960) zur Wirksamkeitsprüfung von verschiedenen Sporen-Endotoxin-Präparaten mit der LD_{50} bei L_3 -Raupen von *Plutella maculipennis* (Curt.) als Versuchstier (Tauchversuch) und BRIGGS (s. ANONYMUS 1960) mit der LD_{90} (mg %) bei 7 Tage alten Raupen von *Estigmene acrea* Drury (Tauchversuch). Ebenso wichtig wie die Wirksamkeitsbestimmung pro Gewichtseinheit Sporenpräparat ist die zahlenmäßige Erfassung der in einem Präparat vorkommenden wirksamen Elemente (Keime oder Sporen bzw. Endotoxin-Kristalle) pro Gewichtseinheit. Diese Angabe hat außerdem den Vorteil, nicht auf ein bestimmtes Tiermaterial bezogen zu sein. Beide Größen sind jedoch in gewissen Grenzen vergleichbar, da zwischen Sporenzahl und biologischer Wirksamkeit eine Relation besteht. Diese leitet sich daraus ab, daß pro Sporangium (Sporenmutterzelle) stets

eine Spore und ein Endotoxin-Kristall erzeugt werden. Ist das Verhältnis von keimfähigen zu nicht keimfähigen Sporen in einem Präparat bekannt, so läßt sich die Toxizität auch aus der ermittelten Keimzahl abschätzen. Die reine Infektionswirkung hingegen ist lediglich der Keimzahl proportional. Die Sporenzahl wird durch Auszählen der Sporen in einer Zählkammer (z. B. nach HELBER mit einer Kammerhöhe von 0,02 mm) mit Hilfe des Mikroskops (zweckmäßigerweise im Phasenkontrast-Verfahren) durchgeführt. Zur Bestimmung der Keimzahl durch Bakterienkultur dient das KOCHSche Plattenverfahren.

Da die Wirksamkeit von verschiedenen Präparaten gleicher Sporenzahl z. T. stark schwankt, wurde von MENN (1960) vorgeschlagen, ein Präparat nicht allein durch die Sporenzahl oder allein durch die biologische Wirksamkeit (z. B. LD₅₀), sondern durch Sporenzahl und biologische Wirksamkeit zu charakterisieren.

Angaben zur Dosierung von insektenpathogenen Bazillen-Präparaten erfolgen (der meist flächigen Ausbreitung des Fraßsubstrates entsprechend) im allgemeinen in g/m². In praxi wird diese Angabe in 2 Daten zerlegt: (1) die Konzentration (z. B. g/l) und (2) die Aufwandmenge (z. B. l/m²). Sind die Verluste an Bazillen-Präparat beim Aufbringen auf das Substrat (meist Blätter) bekannt, so läßt sich die Dosis am Wirkungsort abschätzen.

Eine exakte Sporenzahl-Bestimmung am Wirkungsort läßt sich bei geeigneter Konzentration des Mittels im Versuch durchführen. Hierzu dient die Plattenmethode: Man exponiert Platten (Petrischalen mit Nähragar) in der Objektebene (d. h. im Feldversuch in der Höhe der zu schützenden Blätter*), im Laborversuch an der Stelle der Dosierungsapparatur, an der die Blattstücke dem Präparat ausgesetzt werden).

Weitere Verfeinerung der Methode (Bestimmung der pro Tier aufgenommenen kontaminierten Blattfläche durch genau dimensionierte Blattstücke und anschließende Planimetrie der Fraßfläche) läßt Angaben über die pro Tier aufgenommene Sporenzahl zu.

Zu Wirksamkeitsbestimmungen im Labor werden relative und absolute Verfahren angewandt. Bei den relativen Verfahren (Tauchen — z. B. bei MENN 1960, BRIGGS 1960. Sprühen — z. B. bei WIEGAND 1959) werden unter Beibehaltung bestimmter Versuchsbedingungen zwar reproduzierbare Beziehungen zwischen Wirkung und Konzentration (Sporen/ml oder g/ml) erhalten, doch sind die so gewonnenen Wirksamkeits-Indices nur ein relatives Maß, da die Dosis pro Flächeneinheit nicht angegeben wird.

Zur Ermittlung absoluter Wirksamkeits-Indices, ausgehend von bestimmten Dosen (Sporen/m² oder g/m²), benötigt man geeignete Dosierungs-Apparaturen, die den in der Insektizidprüfung benutzten (Stäubeturm, Sprühturm) weitgehend gleichen (BURGERJON 1956, HERFS u. KRIEG 1960). — Ein Übergang vom relativen zum absoluten Verfahren läßt sich erreichen, wenn eine gewichtsmäßige Bestimmung der Belagsdichte möglich ist (WIEGAND 1960).

Voraussetzung für alle Keimzahl- und Wirksamkeitsbestimmungen von Sporenpräparaten ist eine möglichst homogene Verteilung der wirksamen Elemente in der Zubereitung. Da Sporen in getrockneter Form Agglomerationen bilden, müssen diese in Zubereitungen für quantitative Versuche zerteilt werden. Dies geschieht im Falle von Suspensionen im Homogenisator, im Falle von Pulvern in der Kugelmühle. Das Dispergieren der Zubereitung wird so lange fortgesetzt, bis die Keimzahl pro Volumeneinheit bei fortlaufender Bestimmung ein Maximum erreicht.

*) Vgl. KUDLER u. Mitarb. 1958

b) Bestimmungsmethoden

Zur Bestimmung der Disposition bzw. Toleranz verschiedener Wirte sind ebenso quantitative Untersuchungen nötig wie zum Vergleich der Virulenz verschiedener Mikroorganismen-Stämme. Eine Messung von Virulenz bzw. Toleranz wird dadurch möglich, daß für den eintretenden Erfolg die Beziehung maßgebend ist:

$$\text{Wirkung} = \frac{\text{Virulenz} \times \text{Dosis}}{\text{Toleranz}}$$

Man erhält also bei niedriger Virulenz und hoher Dosis die gleiche Wirkung wie bei hoher Virulenz und niedriger Dosis.

Bei *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* läßt sich unterscheiden zwischen mindestens zwei Virulenzfaktoren: Der eine betrifft die Intensität der Endotoxin-Produktion (die Stämme bilden unterschiedlich große Kristalle), der andere die Infektiosität der Keime*).

Je nach Art des Wirtes steht das Bild des pathogenetischen Geschehens mehr unter dem Eindruck einer Endotoxin-Wirkung oder einer Infektion. Dieser Tatsache entspricht das Vorkommen verschiedener pathologischer Typen (s. S. 52 f.).

Die Bestimmung der Wirksamkeit erfolgt zweckmäßig nach Dosis- oder Zeit-Wirkungs-Kurven. Die sich aus ihnen ergebenden Dosen (LD_{50}) oder Zeiten (LT_{50}), nach der 50% der Versuchstiere eingegangen sind, lassen sich in sog. Indexformeln einsetzen, die eine Beurteilung und einen numerischen Vergleich von verschiedenen Bazillen-Präparaten oder verschiedenem Versuchstier-Material erlauben:

$$\text{Toxizitäts-Index} = \frac{LD_{50} \text{ Standard}}{LD_{50} \text{ Muster}} \times 100$$

(Indexformel nach SUN 1950)

$$\text{Wirkungszeitindex} = \frac{LT_{50} \text{ Standard}}{LT_{50} \text{ Muster}} \times 100$$

(Indexformel nach UNTERSTENHÖFER 1953)

Anm.: Dem Standard kommt dabei immer der Indexwert 100 zu. Indices unter 100 entsprechen Wirksamkeiten, die unter der des Standards liegen, Indices über 100 übertreffen das Standard-Präparat an Wirksamkeit.

Die LD_{50} -Methode wurde von BURGERJON (1956, 1959) sowie von BONNEFOI u. Mitarb. (1958) in erster Linie zum Vergleich verschiedener Bazillen-Präparate angewandt. Dabei benutzen die Autoren eine Index-Formel, die der von SUN entspricht. Während jedoch das Verfahren von SUN ohne besondere Wirkungseinheiten arbeitet, wurde bei dem Verfahren nach BURGERJON eine vorläufige Bezugsgröße verwendet, die sog. UB (= unité biologique). Als Vergleichsmuster (étalon) benutzte BURGERJON ein Sporen-Präparat von *Bac. thuringiensis* var. *alesti*, dessen Titer zu 500 UB/mg festgelegt wurde. Nach dem Verfahren von BURGERJON ergibt das Vergleichspräparat bei einer 0,2%igen Verdünnung mit Wasser in der Eichkurve 50% Sterblichkeit, bezogen auf *Pieris brassicae*-Raupen (infiziert im 3. Stadium) als Testobjekt. Ohne auf die Prüfung nach BURGERJON im einzelnen einzugehen, sei festgestellt, daß dieser Test an eine bestimmte Dosierungsapparatur und andere

*) Eine Trennung zwischen Giftwirkung und Infektionswirkung läßt sich auf verschiedene Weise erzielen (s. S. 18).

bestimmte Voraussetzungen bei der Versuchs-Anstellung gebunden ist. MARTIGNONI (in litt. 1960) wies, unabhängig von uns, auf die Entbehrlichkeit des Korrektionsfaktors y' in der Formel von BURGERJON hin. Da die relative Wirksamkeit von Präparaten ziemlich konstant bleibt, hingegen die absolute Wirksamkeit starken Schwankungen ausgesetzt sein kann, ist die Verwendung von y' nicht unbedingt zu empfehlen.

Da die Verwendung der UB (ebenso wie die der Formel von BURGERJON), wie bereits erwähnt, auf eine bestimmte Versuchsanordnung beschränkt bleibt, wird angeregt, sie durch eine andere allgemeinere Einheit zu ersetzen, die entsprechend den internationalen toxikologischen Einheiten definiert und auf var. *thuringiensis* bezogen wird*). Eine solche Versuchstier-Einheit bezieht sich ursprünglich nur auf eine Art, kann aber später auf andere Arten umgerechnet werden (s. u.). Als Beispiel hierzu wird eine *Pieris brassicae*-Einheit (= PE) vorgeschlagen: »1 PE ist die *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Dosis, bezogen auf die Gewichtseinheit Tier (in Gramm), die nach peroraler Applikation innerhalb von 3 Tagen bei 22° C und 75% r. L. 50% der behandelten *Pieris brassicae*-Raupen abtötet«. Zweckmäßigerweise bestimmt man die Werte durch Kontamination der Raupen in einem bestimmten Stadium.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eines solchen Versuches ist allerdings davon abhängig, daß man entweder Versuchstiere gleicher Qualität und großer Stabilität oder ein gleiches Versuchsmuster zur Verfügung hat. Da die Empfindlichkeit der Versuchstier-Population von verschiedenen Laboratorien u. U. stark variieren kann (bei *Pieris brassicae* u. a. auch durch den Einfluß einer latenten Verseuchung durch Viren oder Mikrosporidien), dürfte es zweckmäßig sein, in allen Laboratorien ein Bazillen-Präparat von bestimmter Wirkung (ausgedrückt in Versuchstier-Einheiten) als Vergleichsmuster zu benutzen. Dieses soll möglichst über längere Zeit seine Virulenz unvermindert beibehalten. Nach Mitteilung von Prof. BONNEFOI u. Mitarb. ist das Institut Pasteur, Paris, bereit, ein Vergleichsmuster (étalon) herzustellen, vorrätig zu halten und an die interessierten Laboratorien abzugeben. Nach BURGERJON behielt ein als Vergleich (étalon) im *Pieris*-Test benutztes *Bac. thuringiensis* var. *alesti*-Präparat über 2 Jahre seine Virulenz unvermindert bei.

Die *Pieris*-Einheit ist durch die Wirksamkeit von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* gegenüber *Pieris brassicae*-Raupen festgelegt. Wenn die relative Empfindlichkeit der Raupen anderer Lepidopteren-Arten gegenüber *Bac. thuringiensis* bekannt ist, können jedoch aus der *Pieris*-Einheit auch andere Versuchstier-Einheiten abgeleitet werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß bei diesen Arten der gleiche pathologische Wirkungsmechanismus wie bei *Pieris* vorliegt (Typ II; s. S. 52). So dürfte nach Untersuchungen von BURGERJON und GRISON (1959) über die Empfindlichkeit von *Malacosoma neustria*, *Tortrix viridana* und *Arctia caja* (allerdings gegenüber *Bac. thuringiensis* var. *alesti*) 1 *Pieris*-Einheit etwa 1,0 *Malacosoma*-Einheit, 0,6 *Tortrix*-Einheiten und 0,5 *Arctia*-Einheiten entsprechen. — Bei der Prüfung von Raupenarten, bei denen nur oder fast nur das Endotoxin wirksam wird (vgl. S. 52), fragt es sich auch, ob es überhaupt zweckmäßig ist, ein begrenzt stabiles und in seiner Virulenz eventuell nachlassendes biologisches Präparat als toxikologischen Standard zu benutzen. Prüfwertvoll scheint daher der Vorschlag, als Vergleichsmuster eine definierte chemisch-reine Substanz mit ausgesprochener Fraßgiftwirkung

*) Diese Frage wurde eingehend auf der Arbeitstagung über *Bac. thuringiensis* am 23/24. Februar 1961 in Darmstadt zwischen Vertretern des INRA (Frankreich), des Institut Pasteur (Paris) und der BBA (Deutschland) diskutiert.

und einer Mortalitäts-Probirgeraden von etwa gleicher Steilheit wie die des *Bac. thuringiensis*-Endotoxins anzunehmen. Die Steilheit der Probirgeraden des Präparates darf sogar verschieden sein, wenn Vergleiche nur bei einer bestimmten Mortalität (z. B. 50% oder 90%) durchgeführt werden. Eine solche Einheit könnte u. U. durch eine bestimmte Dosis Natriumarsenat (= $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) repräsentiert werden. Die Auswertung könnte dann wieder üblicherweise nach der SUNSchen Formel für den Toxizitäts-Index erfolgen. Hierbei ist allerdings die Einschränkung wichtig, daß es noch nicht sicher ist, ob zwei auf verschiedenen Mechanismen beruhende Wirkungen in praxi vergleichbar sind, weil eine Resistenzänderung in der Wirtspopulation gegenüber dem einen Wirkstoff nicht notwendigerweise mit einer gleichsinnigen Resistenzänderung gegenüber dem anderen verbunden sein muß.

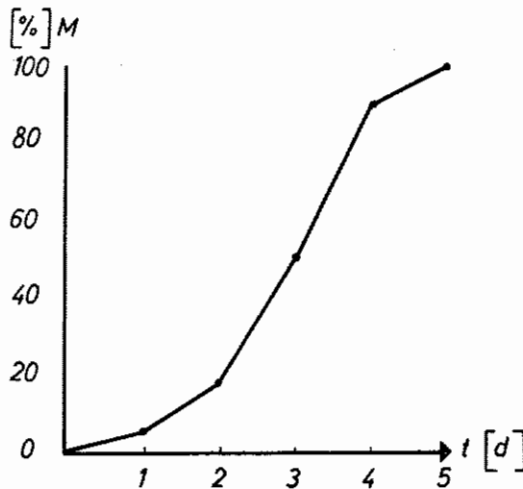


Abb. 7. Absterbekurve von *Pieris brassicae* (L.) nach Behandlung mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex aus *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Original)
 M [%] = Mortalität in Prozent
 t [d] = Zeit in Tagen

Die LT_{50} -Methode wurde von WIEGAND (1959, 1960) angewandt zur Ermittlung von Empfindlichkeits-Differenzen zwischen Raupen verschiedener Stadien bei einer bestimmten Versuchstierart. Er testete ein Sporen-Endotoxin-Präparat von *Bac. thuringiensis* an *Hyponomeuta malinella*. — Die erhaltenen Werte für die LT_{50} als Funktion der angewandten Dosis ergaben für jedes Larvenstadium eine hyperbolische Empfindlichkeitskurve. Auf doppelt-logarithmischem Papier läßt sich jede LT_{50} -Dosis-Kurve in eine Regressionsgerade transformieren und aus dieser eine Empfindlichkeits-Gleichung ableiten. Ein Vergleich der Regressionsgeraden verschiedener Larvenstadien untereinander (s. Abb. 8) zeigt, daß die Empfindlichkeit der Raupen gegenüber einer bestimmten Dosis mit dem Alter abnimmt. Nach WIEGAND (1960) bleibt die Empfindlichkeit jedoch annähernd konstant, wenn man der Betrachtung nicht die Dosis pro Raupe, sondern das Verhältnis von Dosis zu Körper-Volumen zugrunde legt. —

Bei einer LT_{50} von 6 bis 7 Tagen läßt sich ein Abbiegen der Kurven erkennen, wie sie BLISS (1939) für kombinierte Insektizide errechnet hat (WIEGAND 1960).

Bei extrem hohen Dosen geht die Empfindlichkeitskurve in eine Parallele zur Abszisse über (kürzeste LT_{50} als Sättigungs-Effekt). Doch kann in praxi unter solchen Bedingungen die LT_{50} mit zunehmender Dosis auch wieder etwas ansteigen. Dieser Befund spricht dafür, daß *Bac. thuringiensis* in hohen Dosen eine Art Repellentwirkung auszuüben vermag. Eine solche wurde von GRISON u. BÉGUIN (1954)

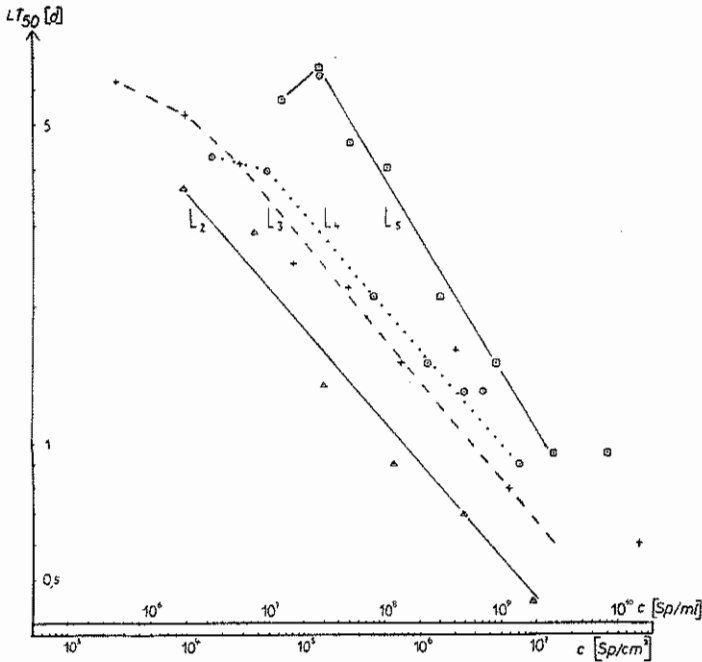


Abb. 8. Empfindlichkeit-Regressionsgerade verschiedener Larvenstadien (L_2 bis L_5) von *Hyponomeuta malinella* (Zell.) nach Behandlung mit Sporen-Endotoxin-Komplex aus *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (nach WIEGAND 1960).

LT_{50} [d] = Zeit, nach der 50% der Tiere gestorben sind, in Tagen

c [Sp/ml] = Konzentration in Sporen/ml Suspension

c [Sp/cm²] = Belagsdichte in Sporen/cm² Blatt

bei *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.), von HALL u. DUNN (1958) bei *Sabulodes caberata* Guén. und von WIEGAND (1959) bei *Hyponomeuta malinella* Zell. beobachtet.

Was die Brauchbarkeit der Indexmethoden zur Prüfung von Bakterien-Präparaten im allgemeinen betrifft, so kommt WIEGAND (1959) zu dem Schluß, daß diese Methoden nur dann (auf Grund der hyperbolischen Definition) brauchbare Ergebnisse liefern, wenn die Präparate in ihrer Wirksamkeit nahezu gleichwertig sind. Diese Forderung ergibt sich aus der Tatsache, daß die Wirkung einer anderen Progression folgt als die Dosis (vgl. hierzu das Reizmengen-Wirkungsgesetz von FECHNER). WIEGAND (1959) konnte bei *H. malinella* im Zusammenhang mit *Bac. thuringiensis* zeigen, daß die Indexwerte in der Progression 2^x ansteigen, wenn die Dosen bei

L₂-Raupen etwa mit der Potenz 10^x und bei L₅-Raupen etwa mit der Potenz 4,8^x anstiegen. Diese Schwierigkeiten, die bei der Testung nicht gleichwertiger Probanden auftreten, lassen sich jedoch beheben durch Beurteilung der Konzentration an Hand der Empfindlichkeits-Regressionsgleichung oder an Hand einer graphischen Darstellung der statistisch gesicherten Empfindlichkeitskurven. Diese müssen aber für das Versuchstier-Material (Tierart und Larvenstadium) eigens ermittelt werden. WIEGAND (1959) weist aber auch darauf hin, daß bei der Wahl größerer Raupen von geeigneten Arten eine Übereinstimmung der Wirkungszeit-Indexkurve mit der Empfindlichkeitskurve zu erwarten wäre und dann eine direkte Beurteilung der Wirkung nach der Zeitmethode möglich wird.

Neuerdings wurden neben den bisher in diesem Abschnitt genannten Testtieren von BURGERJON u. YAMVRIAS (1960) auch Eiraupen von *Anagasta kühniella* zur Prüfung von Sporen-Präparaten herangezogen. Dies ist deshalb wichtig, weil *A. kühniella* auf den Sporen-Endotoxin-Komplex anders reagiert als die meisten übrigen Lepidopteren (s. S. 53).

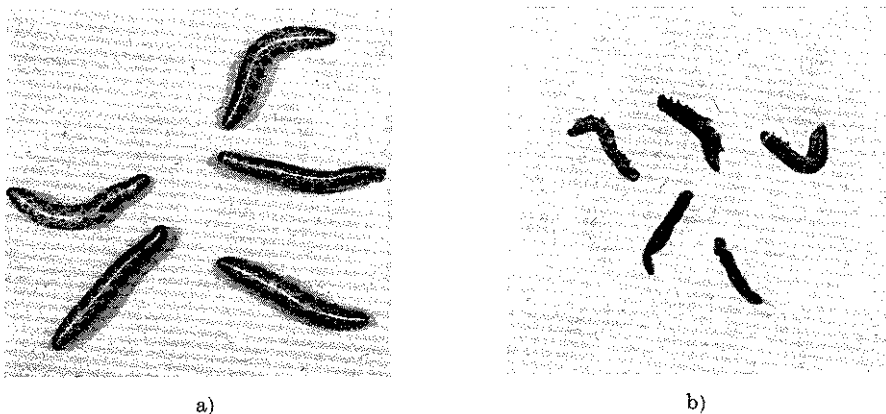


Abb. 9. Raupen von *Pieris brassicae* (L.)

a) unbehandelt

b) mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* behandelt (Original)

Alle diese Wirksamkeitsuntersuchungen wurden für Laborverhältnisse entwickelt und dienen der Grundlagenforschung und der Herstellung definierter Bazillen-Präparate für die Anwendung. Bei Feldversuchen, die die Bestimmung der Wirksamkeit eines Präparates bestimmter Dosierung unter anderen und weit ungünstigeren Bedingungen (unter Berücksichtigung von: Wuchsform, Entwicklungsstadium und Kultur der zu schützenden Pflanzen; Art, Entwicklungsstadium und physiologischen Eigenarten des Schädling; der Zubereitung des Präparates und Art seiner Ausbringung; der Verwendung von Zusätzen oder Kombination mit anderen Mitteln; klimatischen Einflüssen) zum Gegenstand haben, bedient man sich stichprobenartiger Erfolgskontrollen. Diese werden wie bei der Wirksamkeitsbestimmung von chemischen Insektiziden an Hand der Formel von ABBOT (1925), die die natürlichen Abgänge berücksichtigt, ausgewertet:

$$\text{Wirksamkeit} = \frac{\text{überlebende Kontrolltiere} - \text{überlebende Behandelte}}{\text{überlebende Kontrolltiere}} \times 100$$

c) Ergebnisse

Die von VAŇKOVÁ (1957) an Raupen von *Euproctis chrysorrhoea* (L.) durchgeführten Versuche mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* zum Vergleich der Wirkung von nativem Sporen-Endotoxin-Komplex, reinen Sporen und reinen Endotoxin-Kristallen ergaben für die LT_{50} folgende Werte: Sporen + Endotoxin-Kristalle: ~ 3,2 Tage, reine Sporen: ~ 6,5 Tage und isolierte Endotoxin-Kristalle: ~ 2,0 Tage.

Aus den Zeit-Wirkungskurven, die TOUMANOFF u. VAGO (1955) publizierten, ergeben sich für *Bombyx mori*-Raupen (L_4) und einer Konzentration von 4×10^8 Sporen/ml folgende Werte für die LT_{50} : *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*: ~ 6 Std. und *Bac. thuringiensis* var. *alesti*: ~ 1,5 Std.

Ein Vergleich der Virulenz verschiedener Stämme bzw. Variationen an Hand von Dosis-Wirkungskurven liegt von ANGUS (1956 a) vor, der einen Stamm von *Bac. thuringiensis* var. *sotto* mit einem Stamm von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* an

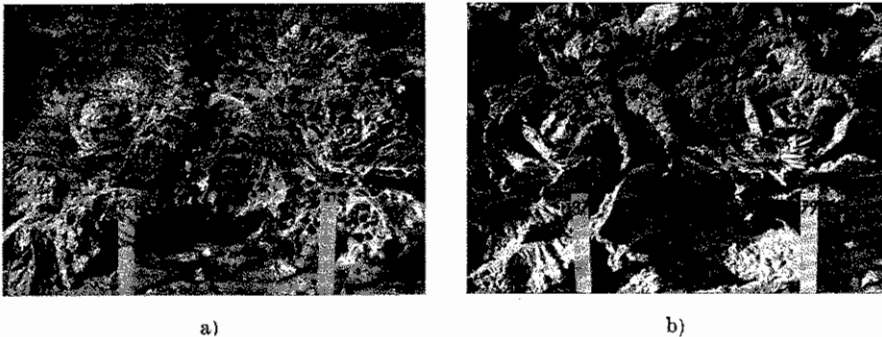


Abb. 10. Fraßbilder von Raupen von *Pieris brassicae* (L.) an
 a) unbehandeltem Kohl (*Brassica oleracea* var. *capitata*)
 b) mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* behandeltem Kohl (Original)

B. mori-Larven testete. Die LD_{50} betrug 2×10^6 Sporen/Larve für var. *thuringiensis* und $3,4 \times 10^4$ Sporen/Larve für var. *sotto*. Weiterhin fanden HEIMPEL u. ANGUS (1958b), daß *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und *Bac. entomocidus* var. *entomocidus* wirksamer gegenüber Larven von *B. mori* sind als *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* und *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus*.

Diese Ergebnisse lassen sich weder im Hinblick auf die kritischen Höhen der Dosen noch hinsichtlich der Wirksamkeits-Verhältnisse auf andere Wirte übertragen. So ist z. B. *Pieris rapae* (L.) gegen var. *sotto* weit weniger anfällig als gegen var. *thuringiensis*. Die LD_{50} von var. *thuringiensis* betrug nach TANADA (1953) für Raupen von *Pieris rapae* etwa $4,4 \times 10^4$ Sporen/Larve.

Ebenfalls zu einer anderen Virulenz-Einschätzung als ANGUS u. HEIMPEL bei *B. mori* kamen de BARJAC u. BURGERJON (1960) beim Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Varianten gegenüber *Pieris brassicae*. Hier erwiesen sich *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* und *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus* weit wirksamer als *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und *Bac. entomocidus* var. *entomocidus*.

Ob dem Vergleich der Toxizität verschiedener Varianten eine reale Bedeutung zukommt, ist fraglich, da die Virulenz der einzelnen Stämme einer Variation großen Schwankungen unterliegen kann (s. S. 30).

Vergleichende Untersuchungen über die Empfindlichkeit verschiedener Wirts-Arten an Hand von Dosis-Wirkungskurven liegen von BURGERJON u. GRISON (1959) vor, die mit einem Endotoxin-Standard (E 58) von *Bac. thuringiensis* var. *alesti* (Stamm Anduze) gewonnen wurden. Benutzt man anstatt der »unité biologique« von BURGERJON den SUNSchen Index (allerdings jetzt nicht als Toxizitäts-, sondern als Sensibilitäts-Index), so erhalten wir, wenn wir *Pieris brassicae* als Standardtier (Index = 100) benutzen, für *Malacosoma neustria* (L.) die gleiche Empfindlichkeit (Index = 100), dagegen eine wesentlich geringere für *Tortrix viridana* L. (Index = 66) und für *Arctia caja* L. (Index = 50). Über die Ergebnisse weiterer Wirksamkeitsbestimmungen in Labor- und Feldversuchen gibt Tab. 2 S. 39—49 (= Wirtsspektrum des Sporen-Endotoxin-Komplexes) Auskunft.

BUCHER (1956) verglich die Wirkung von *Bac. thuringiensis* mit einigen anderen insektenpathogenen Mikroorganismen einerseits und mit chemischen Insektiziden andererseits an Hand der Steigung von Dosis-Mortalitäts-Probits. Die Steigung der Probitgeraden dürfte ein brauchbares Maß zum Vergleich heterogener Reaktionspaare (Gift bzw. Pathogen/Tier) sein. Während bei den untersuchten chemischen Insektiziden (Rotenon, Dichlor-diphenyl-trichlor-äthan (= DDT), Arsen-trioxyd, Nikotin) die Steigung allgemein sehr groß ist (5,0 bis 9,6), ist sie bei den untersuchten pathogenen Protozoen (*Nosema locusta* Canning in *Melanoplus bivittatus* (Say); LD₅₀ = 9 × 10³ Sporen/Tier), Viren (*Borrelinavirus spec.* in *Malacosoma disstria* Hbn.; LD₅₀ = 300 × 10³ Polyeder/Tier) und Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) Migula in *Melanoplus bivittatus* (Say); LD₅₀ = 19 × 10³ Bakterien/Tier) gering (0,83 bis 0,86). Zwischen den Insektiziden und den genannten pathogenen Mikroorganismen liegt die Steigung der Probitgeraden, die mit dem Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* nach Untersuchungen von TANADA (1953) an *Pieris rapae* (L.) (LD₅₀ = 41 × 10³ Sporen/Tier, Steigung 2,58) und von *Bac. thuringiensis* var. *sotto* nach Untersuchungen von ANGUS (1956a) an *Bombyx mori* L. (LD₅₀ = 38 × 10³ Sporen/Tier, Steigung 3,10) gewonnen wurden. Noch höher liegt die Steigung bei reinem Endotoxin-Präparat (LD₅₀ = 2 × 10⁻⁷ g/Tier) aus *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, das von ANGUS (1956b) gegen *Bombyx mori* getestet wurde (Steigung 5,5); es erreicht damit die Wirkung von Insektiziden (wie z. B. DDT ÷ LD₅₀ = 2,9 × 10⁻⁶ g/Tier bei *Musca domestica* L.). Bei geringerer Wirksamkeit z. B. von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* auf *Bombyx mori* (nach Untersuchungen von ANGUS (1956b); LD₅₀ = 2 × 10⁶ Sporen/Tier) werden hingegen ähnlich flach liegende Geraden (Steigung 2,25) erhalten, wie mit DDT gegenüber relativ resistenten Fliegen (LD₅₀ = 4 × 10⁻⁵ g/Tier).

3. Wirtsspektrum des spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplexes

Angaben über die Wirksamkeit von Präparaten kristallophorer Bazillen sind in den letzten Jahren so zahlreich geworden, daß sie nicht mehr einzeln besprochen werden können. Daher werden die bisher gewonnenen Ergebnisse im folgenden tabellarisch wiedergegeben, wobei die Wirte alphabetisch geordnet wurden. Zur Charakterisierung der Erreger wurden Kurzzeichen benutzt: A = *Bac. thuringiensis* var. *alesti*; D = *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus*; E = *Bac. entomocidus* var. *entomocidus*; S = *Bac. thuringiensis* var. *sotto*; T = *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*; U = *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus*.

Für die Wirksamkeiten bei mittleren Anwendungsdosen gelten folgende Bezeichnungen: o = unwirksam; + = 0—50% Mortalität; ++ = 25—75% Mortalität; +++ = 50—100% Mortalität.

Tab. 2. Wirksamkeit von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidas* im Labor- und Feldversuch

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Acrolepia assectella</i> (Zell.)	A	+		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Adisura atkinsoni</i> Moore (von Verff. als <i>Heliothis armigera</i> (<i>obsolata</i> , auct.) an-gesprochen)	T	+++	+++	MAJUMDER, S. K., MUTHU, M., u. PINGALE 1955 dito 1957
<i>Agrotis spec.</i>	T	o		KLEMENT, Z., 1951
<i>Agrotis ypsilon</i> (Rott.)	A	o		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Alsophila aescularia</i> (Schiff.)	A	+++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Alica ambiens</i> (Le C.)	T	+		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Amortia essigana</i> Busck	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Anagasta (Ephesia) kuhniella</i> (Zell.)	T	+++		BERLINER, E., 1911
	T	+++		MATTES, O., 1927
	T	+++	++/++++	JACOBS, S. E., 1950
	T	++/++++		KRIEG, A., 1958
	A	+++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	T	++/++++		GOLEBIEWSKA, Z., 1960
<i>Anisota rubicunda</i> (Fabr.)	T	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
	S	+++	+++	dito
	T	++	+++	ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
	S	++	+++	dito
<i>Anisota senatoria</i> (J. E. Smith)	T	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
	S	+++		dito
	E	+++	+++	ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
	S	++	+++	dito
	T	++	+++	dito

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Antheraea pernyi</i> (Guér.)	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Aphomia gularis</i> (Zell.)	T	++/++++		HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1959
<i>Aporia crataegi</i> (L.)	E	+++		STEINHAUS, E. A., 1951 a, b
	T	+++		METALNIKOV, S., u. CHORINE, V., 1929 c
	T	+++		KRIEG, A., 1957
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
<i>Arctia caja</i> (L.)	A	++	++	BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	A	++	++	MARTOURET, D., 1959
	T		++	McEWEN u. Mitarb. 1960
<i>Argyrotaenia velutinana</i> (Walk.)	T	+		ISAKOVA, N. P., 1958 b
<i>Barathra (Mamestra) brassicae</i> (L.)	A	o		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	T	o/+		HERFS, W., u. KRIEG, A., 1960
	T	+		BURGERJON, A., u. de BARJAC, M., 1960
<i>Bombyx mori</i> L.	S	+++		ISHIWATA, S., 1902
	S	+++		AKI, K., u. SHIGASAKI, Y., 1915
	T	++		KLEMENT, Z., 1951 b
	T ?	o		TOUMANOFF, C., u. VAGO, C., 1952 a
	A	++/++++		TOUMANOFF, C., u. VAGO, C., 1955
	S	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
	T	++/++++		STEINHAUS, E. A., 1957
	T	++/++++		VANKOVÁ, J., 1957
	S	+++		HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1958
	E	+++		ditto
	U	+		ditto
	T	++		ditto
	E	+++		De BARJAC, M., u. BURGERJON, A., 1960
	T	++		ditto
<i>Brachionga sphinx</i> Hen.	A	++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Bucculatrix thurberella</i> Busck	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Archips</i> (= <i>Cacoecia</i>) <i>crataegana</i> (Hbn.)	D	+++	++	KUDLER u. Mitarb. 1958
<i>Carpocapsa pomonella</i> (L.)	T	+++	○	TADIĆ, M., u. VASILJEVIĆ, L., 1956
	T		○	KRIEG 1957 c
	T		+	McEWEN u. Mitarb. 1960
<i>Chloridea peltigera</i> (Schiff.)	A		+ / ++	MARTOURET, D., 1959
<i>Choristoneura fumiferana</i> (Clem.)	S	○		ANGUS, T. A., 1956 c
<i>Choristoneura murinana</i> (Hbn.)	T	++		KRIEG, A., 1956
<i>Clysia ambigua</i> (Hbn.)	T	○		BERLINER, E., 1915
	T	++		METALNIKOV, S., 1937
	T		+++	METALNIKOV, M. S., 1938
<i>Colias lesbia</i> Fabr.	T	+++	+++	FALDINI, J. D., u. PASTRANA, J. A., 1952
<i>Colias philodice eurytheme</i> Boisd.	T	+++	+++	STEINHAUS, E. A., 1951 a, b
	T	+++	+++	STEINHAUS, E. A., u. JERREL, E. A., 1954
	T	+++	+++	STERN, V. M., HALL, I. M., u. PETERSON, G. D., 1959
<i>Crambus bonifatellus</i> Hulst.	T	+++		HALL, I. M., 1954
<i>Crambus sperryellus</i> Knots	T	+++	+++	HALL, I. M., 1957
<i>Dasychira pudibunda</i> (L.)	T	○ / +		KRIEG, A., 1957 c
<i>Datana integerrima</i> (G. et R.)	T	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Datana ministra</i> (Drury)	T	+ / ++		ANGUS, T. A., 1955
	S	+++		ANGUS, T. A., 1956 a, c
	E	+++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
	T		+++	dito
	S		+++	dito

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Dendrolimus sibiricus</i> Tschety.	D	+++	+++	TALALAEV, E. V., 1957, 1959
<i>Desmia funeralis</i> (Hbn.)	T		++	STAFFORD, E. M., u. Mitarb. 1960
<i>Diacrista virginica</i> (Fabr.)	T	+		STEINHAUS, E. A., 1957
<i>Diatarsia oleracea</i> (L.)	T	+		BURGERJON, A., u. de BARJAC, M., 1960
<i>Elarias insulana</i> Boisd.	A	+		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Erannis tiliaria</i> (Harr.)	S	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
<i>Estigmene acrea</i> (Drury)	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Euphydryas chalcedona</i> (D. u. H.)	T	+		STEINHAUS, E. A., 1957
<i>Euproctis chrysorrhoea</i> (L.) [syn. <i>Nygmia</i>	T	○		BERLINER, E., 1915
<i>phacorrhoea</i> (Don.)]	T	++		KRIEG, A., 1957 c
	T	++		VANKOVÁ, J., 1957
	T	+		ISAKOVA, N. P., 1958 b
	A	+		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	A	++		GRISON, P., 1956 a, b
	A	++		BILIOTTI, E., 1956 b
<i>Eucoea</i> spec.	T	○		KLEMENT, Z., 1951
<i>Galerucella vanthomelaena</i> (Schr.)	T	+		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Galleria mellonella</i> (L.)	T	++		ZERNOFF, V., 1931
	A	+		TOUMANOFF, C., 1954 a
	T	○		TOUMANOFF, C., u. Mitarb. 1955
	S	○		TOUMANOFF, C., u. Mitarb. 1955
	S	○		ANGUS, T. A., 1956
	T	++		TOUMANOFF, C., u. MALMANCHE, L., 1956
	T	++		STEINHAUS, E. A., 1957
	T	++		KRIEG, A., u. FRANZ, J., 1959

Wirtsort	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Gelechia gossypiella</i> (Saund.)	T		++ +++	METALNIKOV, S., 1933 MATALNIKOV, S., 1937
<i>Gnorimoschema operculella</i> (Zell.)	A	++/++++		TOUMANOFF, C., u. GRISON, P., 1954
<i>Hatisidota caryae</i> (Harr.)	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Harrisina brillians</i> B. et McD.	T	++	+++	HALL, I. M., 1955
<i>Heliothis</i> spec.	T	+++	○	THOMPSON u. LOGAN 1955 RABB, R. L., STEINHAUS, E. M., u. GUTHRIE, F. E., 1957
<i>Heliothis zea</i> (Boddie)	T	++		TANADA, Y., 1957
<i>Hellula undatis</i> (Fabr.)	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. A., 1958
<i>Hibernia defoliaria</i> (L.)	T	++/++++	++/++++	TANADA, Y., 1956 b
<i>Himera marginata</i> Fabr.	A	+++		BILICOTTI, E., 1956 b
<i>Himera pennaria</i> (L.)	A	+++		GRISON, P., 1956 a, b
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
	A	+++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	A	++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	A	+++		BILICOTTI, E., 1956 b
	A	+++		GRISON, P., 1956 a, b
	A	+++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Hyphantria cunea</i> (Drury)	T	+++		KLEMENT, Z., 1951 a, b
	T	+		WEISER, J., u. VEJBER, J., 1954
	T	+++		VASILJEVIĆ, L. A., 1957
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
	E	+++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
	S	++		ditto
<i>Hyponomeuta cognatella</i> Hbn.	A	+++		TOUMANOFF, C., 1954 a
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur	
<i>Hyponomeuta malinella</i> (Zell.)	T	+++	+++	KRIEG, A., 1956 b	
	T	+++	+++	ISAKOVA, N. P., 1958 b	
	T		+++	LESKOVA, A. J., 1958, 1959	
	T		+++	PETRUCHINA, M. T., 1958, 1959	
	T	+++	+	ŠVECŮVA, N. P., 1959	
	T		++	STEIN, W., 1959	
	T		+++	GÜNTHER, S., 1960	
	T		++	HERFS, W., 1960	
	T		+++	WIEGAND, H., 1960, 1961	
	A	+++	+++	TOUMANOFF, C., 1955 b	
<i>Hyponomeuta padella</i> Hbn.	E	++/++++		STEINHAUS, E. A., 1951 a	
	T	+		dito	
<i>Junonia coenia</i> Hbn.	T	+		STEINHAUS, E. A., u. JERRELL, C. R., 1954	
	T	++/++++	++/++++	HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1959	
<i>Lambina fuscicollaria fuscicollaria</i> (Hulst)	S	○		ANGUS, T. A., 1956 a	
<i>Lambina fuscicollaria lugubrosa</i> (Hulst)	T	++/++++		HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1959	
	T	++/++++		HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1959	
<i>Lambina somnaria</i> (Hulst)	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958	
	T	+++	○	HALL, I. M., u. ANDERS, I. A., 1959	
<i>Lophygma exigua</i> (Hbn.)	T	+++		METALNIKOV, S., u. CHORINE, V., 1929 c	
	T	+++		METALNIKOV, S., 1930	
<i>Lymantria (Porthetria) dispar</i> (L.)	T	+++		KLEMENT, Z., 1951	
	T	+++		ANGUS, T. A., 1955	
	T	++/+++		ANGUS, T. A., 1956 a, c	
	S	+++		BILIOPI 1956 b	
	A	+		GRISON, P., 1956 a, b	
	T	+		KRIEG, A., 1956 b	
	A	+		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959	
	T	+		USDA (ANONYMUS 1950)	
				++	

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Lymantria monacha</i> (L.)	T	+	+++	KRIEG, A., 1956 b
<i>Malacosoma americanum</i> (Hbn.)	S	++	++	ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959 dito
<i>Malacosoma dissitria</i> (Hbn.)	T	+++	+++	HEIMPEL, A. M., u. ANGUS, T. A., 1959 ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959 dito
<i>Malacosoma neuustria</i> (L.)	A	++	+++	TOUMANOFF, C., 1955 BILJOTTI 1956 b GRISON, P., 1956 a, b v. DAMME, E. G., u. v. d. LAAN, P. A., 1959 BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959 BURGERJON, A., u. de BARJAC, M., 1960 HERFS, W., u. KRIEG, A., 1960 ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Malacosoma pluviale</i> (Dyar)	S	++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
<i>Mesographe forficalis</i> (L.)	T	+++		ANGUS, T. A., 1956 a
<i>Nymphalis antiopa</i> (L.)	S	+++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Operophtera (Cheimatobia) brumata</i> (L.)	A	++/++++		BILJOTTI, E., 1956 b
	A	++/++++		GRISON, P., 1956 a, b
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
	A	++	++	BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959 KÜTHE, H., 1959
<i>Oria musculosa</i> (Hbn.)	A	o		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Pannene juliana</i> (Stephens)	T	+++		MÜLLER, O., 1957
<i>Papilio philenor</i> L.	T	+++		STEINHAUS, E. A., 1957
<i>Peridroma margaritosa</i> (Haw.)	T	+		STEINHAUS, E. A., 1951 a

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Phalera bucephala</i> (L.)	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
<i>Phigalia pedaria</i> (Fabr.) (syn. <i>Phigallia pilosaria</i> (Schiff.))	A	++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
<i>Phlegelonthus quinque maculatus</i> (Haw.)	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Phryganidia californica</i> Packard	T	++		STEINHAUS, E. A., 1951 a
<i>Pieris brassicae</i> (L.)	T	+++		METALNIKOV, S., 1930
	A	+++	+++	TOUMANOFF, C., u. GRISON, P., 1954
	A	+++	+++	DELAPORTE, B., u. BÉGUIN, S., 1955
	T	+++	+++	KRIEG, A., 1956 b
	A	+++	+++	LEMOIGNE, M., BONNEFOI, A., BÉGUIN, S., GRISON, P., MARTOURET, D., SCHENK, A., u. VAGO, C., 1956
	T	+++	+++	TOUMANOFF, C., u. MALMANCHE, L., 1956
	T	+++	+++	KRIEG, A., 1957 a
	T	+++	+++	ISAKOVA, N. P., 1958 b
	A	+++	+++	BURGERJON, A., 1959
	A	+++	+++	MARTOURET, D., 1959
	T	+++	+++	dito 1960
	T	+++	+++	HERFS, W., 1959
	T	+++	+++	STEIN, E., 1959
	T	+++	+++	De BARJAC, M., u. BURGERJON, A., 1960
	U	+++		dito
	S	+++		dito
	A	++		dito
	A	++		dito
	E	++		dito
	T	+++	+++	TANADA, Y., 1953
	T	+++	+++	TANADA, Y., 1956 a, b
	T	+++	+++	ISAKOVA, N. P., 1958 b
	T	+++	+++	HALL, I. M., u. ANDRES, I. A., 1959
	T	+++	+++	HERFS, W., 1959
	T	+++	+++	McEWEN u. Mitarb. 1960
<i>Pieris rapae</i> (L.)	T	+++	+++	

Wirtsort	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Pieris</i> spp.	T ?	+++	+ / +++	POSEPELOV, V. P., 1936
<i>Platynota stultana</i> Wlshrn.	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Platypilia carduiactyla</i> (Riley)	T	+++ / +++	++ / +++	TANADA, Y., 1957 TANADA, Y., u. REINER, C., 1960
<i>Plodia interpunctella</i> (Hbn.)	T T	+++ +++		STEINHAUS, E. A., 1951 a, b KANTACK, B. H., 1959
<i>Plutella maculipennis</i> (Curt.)	T T T T	+++ / +++ +++ +++ +++	+++	TANADA, Y., 1956 b OKA, I. N., 1957 ISAKOVA, N. P., 1958 b MENN, J. J., 1960
<i>Polychrosis botrana</i> (Schiff.)	T T	○ ++		BERLINER, E., 1915 METALNIKOV, M. S., 1938
<i>Prodenia praefica</i> Grote	T E	++ ++ / +++		STEINHAUS, E. A., 1951 a dito
<i>Protoparce quinque maculata</i> (Johan.)	T S T	++ +++ +++	+++	ANGUS, T. A., 1955 ANGUS, T. A., 1956 a, c RABB, R. L., STEINHAUS, E. A., u. GUTHRIE, F. E., 1957
<i>Protoparce sexta</i> (Haw.)	T S T	++ +++ ++	+++	ANGUS, T. A., 1955 ANGUS, T. A., 1956 a, c RABB, R. L., STEINHAUS, E. A., u. GUTHRIE, F. E., 1957
<i>Pseudaleia (Leucania) unipuncta</i> (Haw.)	S S	+ ○		ANGUS, T. A., 1956 a ANGUS, T. A., 1956 b

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Pyrausta nubilalis</i> (Hbn.)	S	o		HUSZ, B., 1928
	S	o		METALNIKOV, S., u. CHORINE, V., 1928
	T	+++		METALNIKOV, S., u. CHORINE, V., 1929 a
	S	+		dito 1929 b
	T		++	HUSZ, B., 1930
	T		++	CHORINE, V., 1930
	T		++	METALNIKOV, S., HERGULA, B., u. STRAIL, D. M., 1930
	T	+++		METALNIKOV, S., ERMOLAEV, J., u. SKOBALIZYN, V., 1930
	T		++	HUSZ, B., 1931
	T		+++	CHORINE, V., 1931
	T	+++		ZERNOFF, V., 1931
	T			ECKSTEIN, F., 1934
	T?		o	POSPELOV, V. P., 1936
	T	+++	+	McCONNELL, E., u. CUTKOMP, L. K., 1954
<i>Sabulodes caberata</i> (Guén.)	T		++	BRIGGS, J. D., 1960
	T		++	YORK, G. T., 1958
	A		++	BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	A		++	MARTOURET, D., 1959
	T	++		STEINHAUS, E. A., 1957
	T	o/+++		STEINHAUS, E. A., u. BELL, C. R., 1953
	T	o		BERLINER, E., 1915
	T	++		METALNIKOV, S., 1937
	T		++	METALNIKOV, M. S., 1938
	T	+++		ISAKOVA, N. P., 1958 b
<i>Spilosamia mentica</i> L.	A	++		BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	T	+++	+++	ISAKOVA, N. P., 1958 b

Thamnomoma wauvaria L.

Wirtsart	Erreger-Typ	Labor	Feld	Literatur
<i>Thaumetopoea pityocampa</i> (D. et S.)	A	+++	+/++	GRISON, P., u. BÉGUIN, A., 1954 BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959 MARTOURET, D., 1959
	A	++	++	
	A	+		
<i>Thaumetopoea processionea</i> L.	T	0		BERLINER, E., 1915 GRISON, P., u. BÉGUIN, A., 1954 BILLOTTI, E., 1956 b GRISON, P., 1956 a, b BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959
	T	++		
	A	+++		
<i>Tortrix viridana</i> L.	A	+++	++	BURGERJON, A., u. GRISON, P., 1959 BURGERJON, A., u. KLINGER, K., 1959 CRAMER, H., 1959 MARTOURET, D., 1959
	A	++	++	
	T	++	++	
<i>Trichoplusia ni</i> (Hbn.)	A	++	++	TANADA, Y., 1956 b HALL, I. M., 1957 GRIGARICK, A. A., u. TANADA, Y., 1959 HALL, I. M., u. ANDERS, I. A., 1959 McEWEN u. Mitarb. 1960
	T	+++	++/+++	
	T	++/+++	++/+++	
	T	++	+++	
	T	++	++	
<i>Udea rubigalis</i> (Guén.)	T	+++		HALL, I. M., u. DUNN, P. H., 1958
<i>Vanessa (Pyrameis) cardui</i> (L.)	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959
<i>Vanessa urticae</i> (L.)	T	+++		METALNIKOV, S., u. CHORINE, V., 1929
<i>Zevraphera ratzeburgiana</i> (Ratz.)	S	++		ANGUS, T. A., u. HEIMPEL, A. M., 1959

4. Pathologie des spezifischen Sporen-Endotoxin-Komplexes

a) Äußere Symptome

Zu den ersten unspezifischen Symptomen einer Endotoxin-Wirkung gehört es, daß die Raupen ihre Nahrungsaufnahme einstellen. Das ist zu unterscheiden von einer gelegentlich bei hohen Dosen zu beobachtenden Repellent-Wirkung. Ebenfalls unspezifisch ist eine anfängliche Bewegungsunruhe der Raupen. Im fortgeschrittenen Stadium tritt dann die typische Erschlaffung des sonst turgeszenten Raupenkörpers ein. Dieses von BERLINER erstmals beobachtete Symptom ist charakteristisch für viele Raupenkrankheiten und gab die Vulgärbezeichnung für diese Bakteriose ab: »Schlaffsucht«. In diesem Zustand reagieren die Raupen nur noch schwach auf Berührungs- und Temperatur-Reize. Bei Seidenraupen (*B. mori*) tritt relativ schnell eine Art Paralyse ein, weswegen man in Japan von »Sotto« (was soviel bedeutet, wie »plötzlicher Kollaps«) spricht. Im moribunden Zustand verfärben sich die befallenen Tiere bräunlich bis schwarz. Während bei manchen Arten (z. B. *P. brassicae*) die Kutikula der Raupenkadaver leicht zerreißt und ihr bakteriell zersetzter Körperinhalt austritt, trocknen andere Raupenkadaver (z. B. *A. kühniella*) zu einer Mumie ein. Die Leichen weisen einen charakteristischen penetranten Geruch nach bakteriellen Stoffwechsel-Endprodukten (organische Säuren, Ptomaine) auf, den BERLINER als »weich-säuerlich« beschrieben hat.

b) Histopathologie

Ausführliche histologische Angaben zur Infektion mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* liegen von MATTES (1927) vor, und zwar an *A. kühniella*. Danach findet Sporeneimung und starke Vermehrung der Bazillen im Intestinaltrakt statt. Die darauf folgende Einwanderung von Keimen in die Haemocoel führt zu einer tödlichen Septikämie.

TOUMANOFF u. VAGO untersuchten 1953 histologisch die Infektion von *B. mori* durch *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und erwähnen neben einer bakteriellen Septikämie erstmals eine toxische Reaktion.

Nach Ingestion von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* durch Raupen von *Pieris rapae* beschrieb TANADA (1953), daß, kurz nachdem die Sporen aufgenommen worden waren, der hinter der peritrophischen Membran gelegene Anteil des Mitteldarm-Epithels zerstört wurde und daß sich die Epithelzellen von der Wand des Mitteldarmes lösten.

HEIMPEL u. ANGUS (1959) schließlich untersuchten die Affektion von *B. mori* durch *Bac. entomocidus* var. *entomocidus*. Sie fanden ebenso wie TANADA eine Endotoxin-bedingte Zerstörung des Mitteldarm-Epithels, die etwa 45 Minuten nach Aufnahme des Sporen-Präparates erfolgte.

Diese z. T. verschiedenen histopathologischen Befunde nach peroraler Aufnahme von *Bac. thuringiensis* lassen sich zwanglos durch physiopathologische Ergebnisse (s. u.) erklären.

Im Anschluß an eine parenterale Applikation von *Bac. thuringiensis* entwickelt sich bei allen geprüften Insekten einheitlich eine unspezifische Septikämie.

c) Physiopathologie

1953 entdeckte HANNAY bei *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, dem Erreger der »Sotto«-Krankheit in Seidenraupen einen »diamond-shaped crystal«, analog dem »Restkörper«, den BERLINER (1915) und MATTES (1927) in *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* beobachtet hatten. Anknüpfend an die Untersuchungen von AOKI u. CHIGASAKI (1915) konnte er zeigen, daß bakterienfreie Filtrate einer Mischung von sporulierenden

Kulturen der »var. sotto« und Verdauungssaft aus Seidenraupen ein Toxin enthielt, welches Seidenraupen in etwa 1 Std. paralytierte. Er stellte damit erstmals fest, daß die Alkali-löslichen parasporalen Kristalle offenbar mit dem toxischen Prinzip identisch sind. ANGUS (1955) gelang es dann, dieses Toxin zu isolieren. In der Folgezeit zeigte sich, daß alle *Bac. cereus*-ähnlichen und auf Seidenraupen toxisch wirkenden Bazillen im sporulierten Zustand einen Alkali-löslichen parasporalen Körper enthalten, so auch die von VAGO u. TOUMANOFF isolierte var. *alesti* (DELAPORTE u. BÉGUIN 1955). Weitere Beobachtungen hinsichtlich einer ausschließlichen Vergiftung von Raupen durch das Endotoxin liegen von BONNEFOI u. BÉGUIN (1959) an Raupen von *Pieris brassicae* mit *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und von HERFS u. KRIEG (1960) bei der Kontamination der Raupen von *Pieris rapae* mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* vor. Die Mehrzahl der Autoren ist heute geneigt, auch noch bei anderen Lepidopteren-Arten dem Endotoxin den Hauptanteil an der Wirkung von *Bac. thuringiensis* zuzuschreiben.

Die Lyse von Endotoxin-Kristallen im Darmsaft konnte HANNAY (1953) bei *Bombyx mori* und MARTOURET (1960) bei *P. brassicae* beobachten. Da sich das Endotoxin von *Bac. thuringiensis* nur bei sehr hohem p_H löst (z. B. var. *thuringiensis* bei p_H 11,8 (HANNAY u. FITZ-JAMES 1955), var. *sotto* bei p_H 10 (ANGUS 1956), var. *alesti* von p_H 11,0 bis p_H 12,2 (FITZ-JAMES u. Mitarb. 1958)), erhebt sich die Frage, wie die Lyse im Raupendarm erfolgen kann, da selbst der sehr alkalische Verdauungssaft von *B. mori*-Raupen nur ein p_H von 9,8 erreicht und der von *P. brassicae* sogar nur p_H 8,9. MARTOURET (1960) macht für die Lyse vor allem Darm-Proteinasen verantwortlich, HEIMPEL u. ANGUS (1959) ziehen dafür außerdem noch stark reduzierende Substanzen in Betracht. Im ganzen war nach MARTOURET (1960) die Wirkung von Alkali-gelöstem Endotoxin geringer als Darmsaft-gelöstes. Wahrscheinlich bewirkt die Alkali-Hydrolyse eine partielle Inaktivierung.

Daß das Endotoxin speziell Darm-wirksam ist, geht bereits aus der Tatsache hervor, daß die Nahrungsaufnahme und Darmtätigkeit alsbald nach der Kontamination aufhört. Ersteres läßt sich bei jedem Infektionsversuch feststellen, letzteres konnten HEIMPEL u. ANGUS (1959a) u. a. an Hand von Röntgen-Kontrastdarstellungen am Darm von *B. mori* belegen. — Bezüglich des Mechanismus der Darmlähmung nimmt MARTOURET (1960) eine neurotoxische Aktion des Endotoxins auf den Darm an. Damit bliebe die Wirkung auf die Darmmotorik beschränkt und ließe die Exkretionsfunktion unbeeinflusst. — HEIMPEL u. ANGUS (1951) sehen die Toxinwirkung auf den Darm als eine fermentativ-destruktive Wirkung an. Ausgehend von den histopathologischen Befunden von TANADA bei *P. rapae* und von HEIMPEL u. ANGUS (1959) bei *B. mori*, daß bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung sich die Darmepithelzellen voneinander und von der Basalmembran ablösen, interpretieren sie die Toxinwirkung als fermentative Auflösung von Zellkitt und Zellmembran, die aus Muco-Polysaccharid bestehen dürfte.

Zu erwähnen ist noch, daß nach ANGUS (1956c) bei der Injektion von gelöstem Endotoxin in die Haemocoel dieses bei *B. mori*-Raupen wirkungslos bleibt. Demgegenüber konnte MARTOURET (1960) bei Raupen von *P. brassicae* auch eine Wirkung erzielen, wenn er alkalisch gelöstes Endotoxin in die Haemocoel injizierte.

Nach ANGUS (1956) soll das pathologische Geschehen bei der *Bac. sotto*-Infektion von Seidenraupen etwa folgendermaßen ablaufen: Perorale Aufnahme der Sporen und Endotoxin-Kristalle → Lösung der Endotoxin-Kristalle bei gleichzeitiger Inhibition der Sporenkeimung durch den alkalischen Darmsaft → primäre Darmschädigung durch Endotoxin-Wirkung → Anstieg des Haemolymph- p_H bewirkt sekundäre Paralyse → Tod des Wirtes.

Ähnliche Verhältnisse dürften nach HEIMPEL u. ANGUS (1959) bei *Antheraea pernyi* Guér. und *Protoparce quinquemaculata* (Joh.) herrschen.

KRIEG (1957 c) konnte jedoch bei Raupen von *P. brassicae* keinen Anstieg des Haemolymph-p_H im Anschluß an eine *Bac. thuringiensis*-Infektion nachweisen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen HEIMPEL u. ANGUS (1959) bei anderen Lepidopteren-Raupen. Somit dürfte der Anstieg des Haemolymph-p_H nicht eine allgemeine Voraussetzung für die Wirksamkeit einer *Bac. thuringiensis*-Infektion sein.

Neben der Endotoxin-Wirkung darf jedoch die Infektiosität der Sporen bei verschiedenen Wirten nicht vernachlässigt werden: BURGERJON u. YAMVRIAS (1959) behandelten *P. brassicae* und *A. kühniella* mit nativen und UV-bestrahlten (somit inaktivierten) Sporen-Präparaten. Dabei stellten sie bei *P. brassicae* keine Unterschiede zwischen unbestrahltem und bestrahltem Sporen-Präparat fest, was für eine reine Endotoxin-Wirkung spricht (s. o.). Bei *A. kühniella* jedoch hatte das bestrahlte Präparat nur eine Wirkung von 16%, verglichen mit dem unbestrahlten, das eine 86%ige Mortalität bewirkte. Bei *A. kühniella* ist also offenbar nicht die Endotoxin-Wirkung, sondern die Infektions-Wirkung für den Erfolg ausschlaggebend. — Ganz entsprechende Ergebnisse erhielten HEIMPEL u. ANGUS (1959 a) an *A. kühniella*-Raupen. Behandelten sie die Raupen mit reinem Sporen-Präparat, so betrug die Mortalität 0,8%; bei Verwendung von reinem Endotoxin erhielten sie sogar nur eine Mortalität von 0 bis 4%. Wurde dagegen den Raupen eine Mischung von Sporen und Endotoxin (1 : 1) appliziert, so stieg die Mortalität auf 80 bis 86% an. — Da nach BERLINER (1915) und MATTES (1927) eine Keimung von Sporen im Darmtraktus von *A. kühniella* stattfindet, spricht die Tatsache, daß auch Endotoxin-freie Sporen hier wirksam sind, für eine echte Infektionswirkung. Dem Endotoxin kommt bei *A. kühniella* lediglich die Rolle eines Schrittmachers zu.

Ausgehend von der geschilderten unterschiedlichen Reaktionsweise verschiedener Lepidopteren-Arten auf eine *Bac. thuringiensis*-Applikation, lassen sich in Anlehnung an HEIMPEL u. ANGUS (1959 a) grob 3 Reaktions-Typen unterscheiden:

Reaktionstyp I: Bei den hierher gehörigen Arten beträgt das p_H des Raupen-Mitteldarmes etwa 8,5 bis 10,7 (HEIMPEL u. ANGUS 1958 a). Die Raupen stellen nach Ingestion von *Bac. thuringiensis* bzw. seines Sporen-Endotoxin-Komplexes sofort die Nahrungsaufnahme ein und werden alsbald von einer generellen Paralyse betroffen. Sie sterben innerhalb von 1 bis 7 Std. Es wird angenommen, daß die Paralyse bedingt ist durch das bei diesen Raupen auffällige Ansteigen des Haemolymph-p_H post infectionem um 1 bis 1,5 p_H-Einheiten. Der Anstieg des Haemolymph-p_H erfolgt im Anschluß an die Endotoxin-bedingte Zerstörung des Mitteldarm-Epithels und dann auf Kosten der Darm-Alkalität.

Reaktionstyp II: Bei den hierher gehörigen Arten beträgt das p_H des Raupen-Mitteldarmes etwa 6,4 bis 9,3. Daß sich aber auch hier (trotz des niedrigen p_H des Darmsaftes) das Endotoxin löst, konnte MARTOURET (1960) in vitro mit ausgespucktem Darmsaft von *P. brassicae* (p_H 8,9) nachweisen. Die Raupen hören nach Ingestion von *Bac. thuringiensis* bzw. seines Endotoxins sofort zu fressen auf (Lähmung des Darmtraktes). Stunden später tritt dann auch eine äußere Lähmung auf. Eine Änderung des Blut-p_H, gefolgt von schneller Paralyse wird nicht beobachtet (HEIMPEL u. ANGUS 1959 a). Die Raupen sterben innerhalb 2 bis 4 Tagen.

Die Arten, die nach Typen I und II reagieren, können durch das Endotoxin allein getötet werden, nicht jedoch durch Endotoxin-freie Bazillen-Sporen allein.

Reaktionstyp III: Bei den hierher gehörigen Arten beträgt das p_H des Raupen-Mitteldarmes weniger als 8,9. Die Raupen erinnern in den Symptomen an den Typ II (keine Paralyse). Sie gehen jedoch nicht vom Endotoxin allein, sondern nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von keimfähigen *Bac. thuringiensis*-Sporen innerhalb 2 bis 4 Tagen zugrunde. Offenbar müssen hier die Sporen bei gleichzeitiger Gegenwart des Endotoxins keimen, um den Tod des Wirtes herbeizuführen. Eine Sporenkeimung *in vivo* ist jedoch nur dadurch möglich, daß die zum Typ III gehörigen Raupen kein hohes Mitteldarm- p_H besitzen.

Der Typ I wird repräsentiert durch *B. mori*, *Protoparce quinque maculata* (Joh.) und *Antheraea pernyi* Guér., der Typ III durch *A. kühniella*. Die überwiegende Mehrzahl der Lepidopteren-Raupen, z. B. *Pieris* spp., reagieren aber nach Typ II.

DRILHON u. VAGO (1960) berichteten über Veränderungen im Elektrophoresemuster von *Bombyx mori*-Raupen im Zusammenhang mit der *Bac. thuringiensis* var. *alesti*-Infektion. Im Verlaufe von Intoxikation und Paralyse bei L_5 -Larven beobachteten sie eine Reduktion der Protein-Fractionen von 11 im gesunden Tier auf 7 im paralyzierten Tier (5–8 Stunden post infectionem). Diese Veränderungen waren begleitet von einer Abnahme der Melanisierungsfähigkeit der Haemolymph, wie sie auch von bakteriellen Infektionen anderer Insekten her bekannt ist. Wodurch diese Abweichungen von der Norm bedingt sind, ob durch direkte oder indirekte Toxinwirkung oder infolge der im Verlauf der Intoxikation speziell bei Seidenraupen auftretenden Alkalisierung der Haemolymph, lassen die Autoren offen.

d) Immunität, Resistenz und Toleranz

Die natürliche Immunität (Resistenz) der Insekten gegenüber *Bac. thuringiensis* und auch anderen Mikroorganismen ist gewährleistet durch eine passive Keimabwehr, die vor allem in der Abgeschlossenheit der Körperhöhle gegenüber der Umwelt besteht. Wird dieser Schutz (in den sich Integument und Darmwand teilen) experimentell durchbrochen, z. B. durch intracoelomale Injektion, so lassen sich nach den bisherigen Erfahrungen praktisch alle Insekten sämtlicher Stadien mit *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus*, aber auch mit *Bac. cereus* u. a. fakultativen Pathogenen wirksam infizieren.

Bei der natürlichen (peroralen) Infektion durch *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* hingegen erfolgt (im Gegensatz etwa zur *Bac. cereus*-Infektion) primär eine schwere Darmschädigung durch das Endotoxin. Damit bricht im Bereich des Mitteldarmes die passive Keimabwehr weitgehend zusammen, und die Bazillen können dadurch in das Haemocoel eindringen. Im Zusammenhang mit einer Vermehrung von *Bac. thuringiensis* im Organismus können Exotoxin, Lecithinase und Proteinase als Schrittmacher der Infektion wirksam werden.

Die aktive Keimabwehr des Wirtsorganismus (Phagozytose, Bakterizidie-Steigerung) ist nach BUCHER (1960) nur gegenüber solchen (= apathogenen) Bakterien wirksam, die keine Septikämie bewirken, wenn sie in das Haemocoel injiziert werden. Bei den anderen (= pathogenen) Bakterien hingegen wird eine Phagozytose-Lähmung beobachtet, die nach BUCHER auf Proteinase-Wirkung beruhen soll. Daher ist, was die zelluläre Keimabwehr gegenüber *Bac. thuringiensis* und seinen Verwandten anbetrifft, nach Injektion dieser Bazillen in Larven von *Bombyx mori*, *Melolontha melolontha* oder *Neodiprion sertifer* eine Phagozytose ebenso unwirksam wie nach einer Injektion von *Bac. cereus* (KRIEG 1957 b).

Eine Erhöhung der Bakterizidie der Haemolymph vakzinierter Raupen von *Galleria mellonella* (L.) im Sinne von BRIGGS (1958) und STEPHENS (1959) konnte nach Injektion von *Bac. thuringiensis*- oder *Bac. cereus*-Vakzine als Antigen nicht festgestellt werden (KRIEG 1958).

Eine Produktion echter Antikörper als Ausdruck einer humoralen Keimabwehr bei Insekten wurde nach Injektion von *Bac. thuringiensis* oder *Bac. cereus* ebensowenig wie nach Injektion anderer Antigene beobachtet (KRIEG 1957 b).

Die Empfindlichkeit bestimmter Insekten und spezieller Stadien gegenüber den Toxinen von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* läßt sich mit Hilfe der EHR-LICHschen Seitenketten-Theorie erklären: Offenbar besitzt nur der Raupendarm Endotoxin-empfindliche Rezeptoren*).

Eine selektierte natürliche Immunität (Toleranz) bei Raupen an sich empfindlicher Lepidopteren-Arten (infolge Selektion Rezeptoren-armer Rassen gegenüber *Bac. thuringiensis*) wurde bisher nach 3jährigen Versuchen im Freiland nicht beobachtet (ANONYMUS 1960).

In Insekten, die gegenüber dem Endotoxin relativ unempfindlich sind, wie z. B. *Cicada plebeia* (Scop.) kann sich eine inapparente Darminfektion durch *Bac. thuringiensis* entwickeln (VAGO 1951 a).

5. Das unspezifische »Exotoxin«

a) Allgemeines

McCONNEL u. RICHARDS gelang 1959 der Nachweis einer für Insekten toxischen Wirkung in Kulturfiltraten des *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Dieses »Exotoxin« erwies sich als thermostabil und relativ unspezifisch. Da es sich nur bei parenteraler Applikation wirksam erwies und das Toxin in ähnlicher Form auch bei nicht-entomophagen Stämmen von *Bac. cereus* nachgewiesen werden konnte, sprachen McCONNEL u. RICHARDS ihm eine insektenpathogene Bedeutung ab.

BURGERJON u. de BARJAC (1960) fanden hingegen, daß Filtrate bzw. Überstände von Kulturen auch peroral wirksam sein können. Diese perorale Wirkung tritt jedoch im Gegensatz zur Endotoxin-Wirkung nicht sofort ein. Außerdem fanden BURGERJON u. de BARJAC (1960), daß eine perorale »Exotoxin«-Wirkung nicht so allgemein vorkommt, wie die von McCONNEL u. RICHARDS beschriebene parenterale »Exotoxin«-Wirkung. BURGERJON u. de BARJAC prüften verschiedene Varianten von *Bac. thuringiensis* und von *Bac. entomocidus*, ferner 5 andere *Bacillus*-Stämme. Hierbei fanden sie, daß eine starke »Exotoxin«-Wirkung lediglich bei *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* nachweisbar war. Kein »Exotoxin« produzierten *Bac. thuringiensis* var. *sotto*, var. *alesti*, var. *dendrolimus*, *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus*, 2 Stämme von *Bac. cereus* und *Bac. finitimus*.

Auch KRIEG, HERFS u. HUGER (1960) fanden eine perorale Wirksamkeit von Überständen nach Zentrifugation von *Bac. thuringiensis*-Kulturen. Hiervon waren Filtrate der var. *thuringiensis* besonders wirksam. Ferner berichtete BRIGGS (1960) über eine peroral wirksame »exotoxische« Komponente in Überständen bzw. Kulturfiltraten von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Kultur-Filtrate von *Bac. thuringiensis* var. *sotto* und *Bac. cereus* waren weniger wirksam.

Welche effektive Bedeutung dem »Exotoxin« bei natürlichen Infektionen durch *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* zukommt, ist noch ebensowenig geklärt, wie die effektive Wirkung der Lecithinase und Proteinase aus vegetativen Zellen. — Über die Natur des »Exotoxins« s. S. 18f.

*) Rezeptoren für das »Exotoxin« im Bereich des Haemocoels scheinen nach den Untersuchungen über das Wirtsspektrum dieses Toxins (s. S. 55) hingegen weiter verbreitet zu sein.

b) Wirksamkeitsvergleiche

Beim Vergleich von äquivalenten Mengen »Exotoxin« (Überstand) und Sporen-Endotoxin-Komplex (Sediment) von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Suspension des Sediments in einem dem Überstand entsprechenden Volumen Wasser), stellten BURGERJON u. de BARJAC (1960) bei einer Reihe von Lepidopteren-Arten sogar eine höhere Wirksamkeit des »Exotoxins« fest. Im Falle von *Barathra* (*Mamestra*) *brassicae* (L.) ergaben sich z. B. folgende Versuchsergebnisse: ca. 20% Mortalität bei Verwendung des Sporen-Endotoxin-Komplexes, ca. 35% Mortalität bei Verwendung des »Exotoxins« (äquivalente Menge) und ca. 90% Mortalität bei Verwendung des Gesamtpräparates (Sporen + Endotoxin + »Exotoxin«). Ähnlich lagen die Verhältnisse bei *Agrotis* (*Euxoa*) *segetum* (Schiff.), *Diataraxia* (*Polio*) *oleracea* (L.) und *Malacosoma neustria* (L.). Speziell in diesen Fällen war das Sediment weniger wirksam als der Überstand.

c) Wirtsspektrum

Das »Exotoxin« ist weit weniger spezifisch als das Endotoxin: Injiziert ist es nach McCONNEL u. RICHARDS außer gegen Raupen von *Galleria mellonella* (L.) und *Pyrausta nubilalis* (Hbn.) auch wirksam gegen Larven von *Sarcophaga bullata* Park (*Diptera*), gegen *Periplaneta americana* (L.) und *Blatta orientalis* L. (*Orthoptera*). Bei peroraler Applikation war es nach den gleichen Autoren unwirksam gegen Raupen von *Galleria mellonella* (L.), Larven von *Aedes aegypti* (L.) und gegen *Periplaneta americana* (L.). — Nach Angaben von BURGERJON u. de BARJAC ist das »Exotoxin« jedoch auch bei peroraler Applikation wirksam z. B. gegen Raupen folgender Lepidopteren: *Barathra* (*Mamestra*) *brassicae* (L.), *Agrotis* (*Euxoa*) *segetum* (Schiff.), *Diataraxia* (*Polio*) *oleracea* (L.), *Peridroma margaritosa* Hbn., *Lymantria* (*Porthetria*) *dispar* (L.), *Malacosoma neustria* (L.), *Bombyx mori* L., *Pieris brassicae* (L.) und *Anagasta* (*Ephestia*) *kühniella* (Zell.), ferner gegen Larven von *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (*Coleoptera*) und *Pristiphora rufipes* (syn. *Pristiphora pallipes*) Lep. (*Hymenoptera*).

Nach Untersuchungen von KRIEG, HERFS u. HUGER (1960) sind Überstände von *Bac. thuringiensis*-Kulturen nach peroraler Applikation wirksam gegenüber Larven von *Pieris rapae* (L.) und *Agrotis* (*Euxoa*) *segetum* (Schiff.). Eine Wirkung wurde speziell bei Filtraten von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* beobachtet. Der Erfolg trat bei *Pieris rapae* (L.) etwa zwischen dem 3. und 20. Tage auf, bei *Agrotis segetum* (Schiff.) etwa zwischen dem 5. und 30. Tage.

Bei Versuchen mit Kulturfiltraten an Nicht-Lepidopteren zeigte sich keine insektizide Reaktion bei Imagines von *Blatta orientalis* L. (*Orthoptera*) und nur eine geringe Reaktion bei Imagines von *Sitophilus* (*Calandra*) *granaria* (L.) (*Coleoptera*). Eine deutliche Wirkung hatten die Filtrate auf Larven von *Aedes aegypti* (L.) und *Musca domestica* L. sowie Imagines der letztgenannten Art. Gegenüber diesen Dipteren waren neben Kulturfiltraten von var. *thuringiensis* z. T. auch die anderen Varietäten wirksam.

Auch von BRIGGS (1960) wurden Versuche zur Prüfung der peroralen Wirksamkeit von Kultur-Filtraten an *Musca domestica* durchgeführt. Die Entwicklung der Larven wurde stark unterdrückt durch »Exotoxin«-Präparate von *Bac. thuringiensis*, hingegen weniger stark durch Kultur-Filtrate von *Bac. cereus*.

Ausgedehnte Versuche über die »Exotoxin«-Wirkung auf andere Insekten liegen noch nicht vor, jedoch dürften die gelegentlich beschriebenen Erfolge mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Präparaten gegen Nicht-Lepidopteren (s. S. 29) weitgehend dem »Exotoxin« zuzuschreiben sein (BURGERJON u. de BARJAC 1960).

d) Pathologie

Über die Pathologie der »Exotoxin«-Wirkung liegen keine eingehenden Untersuchungen vor. Jedenfalls aber ist das »Exotoxin« von *Bac. thuringiensis* im Gegensatz zu seinem Endotoxin kein ausgesprochenes Darm-Gift. So erfolgt auch im Gegensatz zum Sporen-Endotoxin-Komplex nach peroraler Applikation des »Exotoxins« keine Einstellung der Fraßtätigkeit. Offenbar wird das »Exotoxin« erst nach seiner Resorption wirksam; hierfür spricht seine starke Wirksamkeit nach intracoelomaler Injektion (im Gegensatz zum Endotoxin) und die von BURGERJON u. de BARJAC (1960) festgestellte relativ spät einsetzende Wirkung (4. bis 10. Tag) nach peroraler Applikation.

6. Epizootiologie und geographische Verbreitung

Bac. thuringiensis und *Bac. entomocidus* wurden bei Epizootien isoliert aus folgenden Lepidopteren-Arten:

Pyralidae: *Anagasta kühniella* (Zell.): *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (BERLINER 1915, MATTES 1927, STEINHAUS u. JERREL 1954, KRIEG 1957).

Aphomia gularis Zell.: *Bac. entomocidus* var. *entomocidus* (STEINHAUS 1951).

Galleria mellonella (L.): *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (syn. *Bac. galleriae* No. 2) (METALNIKOV 1922); *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (KRIEG 1956), *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (syn. *Bac. galleriae*) (ŠVECOVA 1958).

Plodia interpunctella (Hbn.): *Bac. entomocidus* var. *subtoxicus* (STEINHAUS 1951); *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (WEISER 1957).

Pyrausta nubilalis (Hbn.): *Bac. thuringiensis* var. (syn. *Bacterium pyraustae* No. 1 bis 7 bzw. *Bac. cereus* Stamm P 3) (METALNIKO V u. CHORINE 1929 b) (syn. *Bacterium cazaubon*) (METALNIKOV u. Mitarb. 1930) (syn. *Bacterium italicum* No. 2) (METALNIKOV u. Mitarb. 1930); *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (STEINHAUS u. JERREL 1954).

Gelechiidae: *Gelechia gossypiella* (Saund.): *Bac. thuringiensis* var. (syn. *Bacterium gelechiae*) (METALNIKOV u. METALNIKOV 1933).

Noctuidae: *Agrotis (Euxoa) segetum* (Schiff.): *Bac. thuringiensis* var. *euxoae* (KRIEG 1959).

Adisura adkinsoni Moore*): *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* (MAJUMDER u. Mitarb. 1956).

Lasiocampidae: *Dendrolimus sibiricus* (Tschetv.): *Bac. thuringiensis* var. *dendrolimus* (TALALAEV 1956).

Bombycidae: *Bombyx mori* L.: *Bac. thuringiensis* var. *sotto* (ISHIWATA 1901, AOKI u. CHIGASAKI 1915); *Bac. thuringiensis* var. *alesti* (TOUMANOFF u. VAGO 1951 u. 1952); *Bac. thuringiensis* var. *alesti* (syn. *Bac. thuringiensis* Stamm »Anduze«) (DELAPORTE u. BÉGUIN 1955); *Bac. thuringiensis* (AFRIKIAN 1960).

Welche Bedeutung dem *Bac. thuringiensis* als Krankheitserreger bei Seidenraupen in Südfrankreich und Italien sowie in Japan und China zukommt, ist noch nicht klar.

*) Von den Autoren als *Heliothis armigera (obsoleta, auct.)* angesprochen.

In der 2. Hälfte des vorigen Jahrhunderts gingen viele Seidenraupen in Italien und Frankreich an einer Krankheit ein, die als »Flacherie« bezeichnet wurde. Zwischen 1865 und 1870 beobachtete PASTEUR in erkrankten Seidenraupen aus dem Gebiet der Cévennen (Südfrankreich) einen Sporenbildner, den er als Ursache der »Flacherie« ansah. Infektionsversuche durch Kontamination gesunder Raupen mit Material aus kranken Zuchten gelangen ihm. Nach TOUMANOFF (1954) ist *Bac. thuringiensis* var. *alesti* weitgehend mit dem von PASTEUR entdeckten Sporenbildner identisch. Auch VAGO (1959) sieht die Primär-Ursache der »Flacherie« der Seidenraupen in einer — wenn auch unterschwellig bleibenden — *Bac. thuringiensis* var. *alesti*-Infektion. Die zu beobachtende Dysenterie der Seidenraupen führt er jedoch auf eine sekundäre Übervermehrung des ubiquitär im Darm von Seidenraupen vorkommenden *Streptococcus bombycis**) als Folge der primären toxischen Darmschädigung zurück.

1901/1902 beobachtete ISHIWATA bei einer Krankheit der Seidenraupen, die in Japan als »Sotto« bezeichnet wird, ebenfalls einen Sporenbildner, der heute als *Bac. thuringiensis* var. *sotto* angesprochen wird.

Aus Armenien (UdSSR) liegen von AFRIKIAN (1960) Beobachtungen über natürliche Infektionen bei Seidenraupen durch *Bac. thuringiensis* vor. Er stellte auch Versuche zur Bekämpfung dieser Infektionen bei *Bombyx mori* an (s. S. 63).

Epizootiologisch interessant ist das Vorkommen von *Bac. thuringiensis* in einer homopteren Wanze: *Cicada plebeia* (Scop.). VAGO beobachtete 1951 (a) ein solches Auftreten in der Provence (Südfrankreich). Für die Wanze scheint der Bazillus nur fakultativ pathogen zu sein, da er bei 55% aller untersuchten gesunden Tiere im Darm nachweisbar war (wo er sich offenbar auch vermehrte). Daneben wurde von VAGO aber auch eine Erkrankung bei dieser Wanze (»Flacherie«) durch *Bac. thuringiensis*-Infektion beobachtet.

Ähnliche Verhältnisse wie bei *Cicada plebeia* dürften bei solchen Lepidopteren herrschen, die gegenüber dem Sporen-Endotoxin-Komplex weniger empfindlich sind. In ihnen könnte sich ein Gleichgewicht zwischen Wirt und Erreger einstellen, und vielleicht kommt solchen Arten eine Bedeutung als Reservoir für *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* zu.

Das Auftreten von Epizootien bei Insekten durch *Bac. thuringiensis* spricht gegen die oft geäußerte Ansicht, daß die Infektion gegenüber der Toxin-Wirkung allgemein vernachlässigt werden könne. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von TALALAEV (1958, 1959), wonach sich bei *Dendrolimus sibiricus* durch experimentelle Infektion eine Epizootie im Freiland erzielen ließ.

Interessant ist die geographische Verbreitung der einzelnen Gruppen von kristallophoren Sporenbildnern (vgl. hierzu auch HEIMPEL u. ANGUS 1960 b):

Die *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Gruppe wurde isoliert bei Epizootien in Europa: Deutschland, Frankreich, ČSR, UdSSR (Ruthenien, Armenien).

Die var. *alesti* — var. *euxoae*-Gruppe fand sich bisher nur in Westeuropa: Frankreich, Deutschland.

Die var. *sotto* — var. *dendrolimus*-Gruppe wurde bisher nur in Asien angetroffen: Japan, Ost-UdSSR (Sibirien).

Die *Bac. entomocidus*-Gruppe stammt ausschließlich aus Amerika: West-USA (Californien).

*) *Streptococcus bombycis*-Stämme sind nach LYSENKO (1958) Intermediär-Formen zwischen *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium*.

Diese geographische Isolation der einzelnen Gruppen dürfte jedoch in naher Zukunft durch die zu erwartende Anwendung speziell von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*-Präparaten in allen Erdteilen durchbrochen werden.

7. Mischinfektionen

Natürliche Mischinfektionen von *Bac. thuringiensis* mit fakultativ pathogenen Bakterien scheinen selten vorzukommen. Ihr Auftreten ist auch unwahrscheinlich, soweit Gram-positive Keime in Betracht gezogen werden, da von *Bac. thuringiensis* ein gegen sie gerichtetes Antibiotikum produziert wird (s. S. 19).

Über eine künstliche Mischinfektion von Raupen mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* und Gram-negativen Bakterien, und zwar *Serratia marcescens* Bizio, berichtete STEINHAUS (1950 b u. 1960).

Bei einem Infektionsversuch an *Galleria mellonella* mit beiden Erregern wiesen 24% der *Galleria*-Raupen eine Doppelinfektion auf. 60% starben an einer *Serratia*-Infektion und 12% an einer reinen *Bac. thuringiensis*-Infektion. Im Vergleich dazu starben an *Bac. thuringiensis* von der Versuchsgruppe, die nur mit *Bac. thuringiensis* behandelt waren, 76% und von der Versuchsgruppe, die nur mit *S. marcescens* allein behandelt worden war, 12% der Tiere (STEINHAUS 1959 b). Bei einem anderen Infektionsversuch an *Bombyx mori* mit beiden Erregern starben 84% meist an einer Doppelinfektion, wobei in 25% mehr *Bac. thuringiensis*, in 25% mehr *S. marcescens* und in 50% der Fälle beide Bakterien etwa gleich stark vertreten waren. Im Vergleich dazu starben an *Bac. thuringiensis* von der Versuchsgruppe, die nur mit *Bac. thuringiensis* behandelt war, 100% und von der Versuchsgruppe, die nur mit *S. marcescens* allein behandelt worden war, 0% der Tiere (STEINHAUS 1960 a). Einerseits hemmt also das gleichzeitige Vorliegen einer *Serratia*-Infektion die Wirkung von *Bac. thuringiensis*, andererseits scheint *Bac. thuringiensis* jedoch eine sekundäre Bakteriose durch *S. marcescens* zu begünstigen.

Diese Versuche ließen keine Verbesserung der Wirksamkeit von *Bac. thuringiensis* durch zusätzliche Infektion der Wirtstiere mit *S. marcescens* erkennen.

D. Ungefährlichkeit gegenüber Säugetieren und Mensch

1. Untersuchungen an Säugetieren

Infolge der hohen Spezifität des Sporen-Endotoxin-Komplexes von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* innerhalb des Stammes der Arthropoden war eine Wirkung auf Wirbeltiere im allgemeinen und auf Säuger speziell unwahrscheinlich.

Orientierende Versuche in dieser Hinsicht wurden bereits von BERLINER (1915) an Mäusen und von STEINHAUS (1951a) an Kaninchen durchgeführt, wobei nach peroraler Aufnahme keinerlei Anzeichen einer Erkrankung registriert werden konnten. LEMOIGNE u. Mitarb. (1958) behandelten mit 100 ml einer Suspension von 140×10^6 Sporen/ml Kohlblätter und verfütterten diese an Kaninchen. Es ergaben sich keinerlei pathologische Effekte. Auch an Schafen, die im Freiland zufällig an behandeltem Kohl fraßen, stellten sich keinerlei nachteilige Folgen ein. FISHER u. ROSNER (1959) verfütterten von einem *Bac. thuringiensis*-Präparat mit 9×10^9 Sporen/g

Ratten Dosen bis zu 24 g/Tier mit einer Magensonde. Auch bei dieser massiven Kontamination war keine akute orale Toxizität festzustellen. Weitere perorale Tests wurden nach Angaben von FISHER u. ROSNER von verschiedenen Autoren mit Schweinen, Hühnern, Enten und auch Fischen durchgeführt, ohne nachteilige Wirkung. Nach BRIGGS (1959) erhielten Hennen über 23 Monate, täglich 0,5 bis 10 g eines *Bac. thuringiensis*-Präparates ohne daß Unterschiede bezüglich Gewicht, Allgemeinzustand und Eiablage gegenüber den Kontrollen auftraten (s. auch BRIGGS 1960). — DUNN (1960) verfütterte in einem Versuch etwa 10^{12} Sporen pro Tag und Tier an Jungrinder (Stiere), ohne daß nachteilige Wirkungen zu beobachten waren. — Wichtig für diesen Fragenkomplex einer peroralen Wirksamkeit von Endotoxin für Wirbeltiere sind noch Ergebnisse von HOLTSMANN (1960), wonach das Endotoxin durch die wichtigsten Proteinase des Magen-Darmtrakts, nämlich Pepsin und Trypsin, zerstört wird.

Von FISHER u. ROSNER wurden 1959 Inhalationsversuche an Mäusen durchgeführt. Hierbei wurden 10 g eines Präparates mit etwa 9×10^9 Sporen/g in einem Raum von 27 l vernebelt. Dem Aerosol wurden bei dem 6tägigen Versuch Mäuse 4mal 15 min lang exponiert. Dabei wurde weder eine Infektion der Mäuse noch eine Intoxikation derselben beobachtet.

Auch subcutane und intraperitoneale Injektionen hatten bei Kaninchen (STEINHAUS 1951) und weißen Mäusen (STEINHAUS 1951, FISHER u. ROSNER 1959) keinerlei Wirkung.

Untersuchungen, die von FISHER u. ROSNER (1959) an Meerschweinchen unternommen wurden, zeigten auch keinen Hinweis auf allergische Reaktionen bei verschiedenen Applikationsarten.

2. Untersuchungen an Menschen

Nach einem Bericht von STEINHAUS (1951) trank eine Versuchsperson die Flüssigkeit eines Kulturröhrchens mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, ohne daß irgendwelche Krankheitserscheinungen auftraten. Von KRIEG u. FRANZ (1959) wurde ein Experiment an 7 Versuchspersonen durchgeführt, wobei mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* versetzte Nahrungsmittel verzehrt wurden (einmalige Dosis etwa 10^9 bis 10^{10} Sporen/Person). Nach der peroralen Applikation konnten die Versuchspersonen subjektiv keinerlei gesundheitlich nachteilige Wirkungen oder Beeinträchtigungen ihres Befindens feststellen.

Ausgedehnte Untersuchungen am Menschen wurden von FISHER u. ROSNER (1959) mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* durchgeführt; dabei wurde neben der peroralen Applikation auch die Inhalation von Sporen zur Anwendung gebracht. 18 Versuchspersonen nahmen 5 Tage lang 1 g Sporenpulver (3×10^9 Sporen/g) täglich peroral zu sich. 5 der Versuchspersonen inhalierten zusätzlich 0,1 g täglich ebenfalls 5 Tage lang und wurden einer Röntgenbestrahlung als Stressor ausgesetzt. Physiologische und klinische Untersuchungen an den Versuchspersonen wurden zu Beginn und am Ende des 5tägigen Versuches durchgeführt. Im einzelnen wurden registriert: Gewicht, Temperatur, Blutdruck, Pulsfrequenz, Atemfrequenz, Vitalkapazität (in der Inhalationsgruppe); klinische Untersuchungen des Gastrointestinal-, Urogenital-, Cardiopulmonal- und Nerven-Systems; klinisch-chemische Untersuchungen von Blut und Harn: Blutbild, BSG, Thymol-Trübungstest, Harn-N, Glucose, Bilirubin und Urobilinogen. Nach 4 bis 5 Wochen erfolgte eine Nachuntersuchung. Die Ergebnisse zeigten kein Abweichen von der physiologischen Norm.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist der Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* (unabhängig von der Applikationsart) für Wirbeltiere apathogen. Untersucher der US-Food and Drug Administration (FDA) haben die toxikologischen Experimente von anderer Seite (FISHER u. ROSNER 1959 u. a.) wiederholt und hinsichtlich der nichtinfektiösen Natur von *Bac. thuringiensis*-Präparaten für Wirbeltiere bestätigt. Außerdem wurde festgestellt, daß nur extrem hohe Dosen von *Bac. thuringiensis* (wenn z. B. 20 bis 25% der Diät von Ratten aus *Bac. thuringiensis* besteht), über längere Zeit verfüttert, eine leichte Leberschädigung bewirken (ANONYMUS 1960).

3. Variabilität

Auf Grund theoretischer Erörterungen und experimenteller Erfahrungen wird von STEINHAUS (1959 a) diskutiert, ob eine Mutation von *Bac. thuringiensis* in eine Wirbeltier-pathogene Form möglich ist.

Der Autor kommt dabei zu der Feststellung, daß dies nach den heutigen Ergebnissen der Bakterien-Genetik unwahrscheinlich ist. Jedenfalls ist eine (offenbar nur durch eine ganze Reihe von Mutationsschritten erreichbare) Transmutation von *Bac. thuringiensis* etwa zu dem Säuger- und Menschen-pathogenen *Bac. anthracis* ebenso unwahrscheinlich, wie eine solche von *Streptococcus lactis* (der in Molkereiprodukten vorkommt) zu dem Säuger- und Menschen-pathogenen *Streptococcus pyogenes*. Die Wahrscheinlichkeit der Mutation in eine humanpathogene Form ist bei *Bac. thuringiensis* jedenfalls viel geringer als die Möglichkeit eines Rückschlages in die gefährliche Stammform bei den in der Humanmedizin für Aktiv-Schutzimpfungen benutzten abgeschwächten Varianten (sog. Lebend-Vakzinen) an sich humanpathogener Viren. Im letzten Falle ist offenbar nur ein Mutationsschritt bis zur humanpathogenen Form nötig.

Trotz vieler Ähnlichkeiten unterscheiden sich speziell *Bac. anthracis* und *Bac. thuringiensis* beträchtlich, und zwar hinsichtlich ihres Verwendungs-Stoffwechsels (PROOM u. KNIGHT 1955) und vor allem in ihrem pathogenetischen Mechanismus (ZWARTOUW u. SMITH 1956, THORNE u. Mitarb. 1960). Weitere Unterschiede: *Bac. anthracis* ist stets unbeweglich, bildet Kapseln und mucoide Kolonien unter CO₂-Einwirkung, wirkt nicht haemolisierend und wird von γ -Phagen spezifisch angegriffen (Phage W und Phage 201 unspezifisch!); unter dem Einfluß von Penicillin bildet er large bodies (Perlschnur-Test) (LEISE u. Mitarb. 1959).

Interessant sind für unser Problem auch Selektionsversuche mit dem Ziel, in einer heterogenen Bazillen-Population eine versteckte Wirbeltier-Pathogenität aufzudecken. BROWN (1958, 1959) hat solche Versuche vergleichend mit *Bac. anthracis*, *Bac. cereus* und *Bac. thuringiensis* durchgeführt.

Bei diesen Versuchen wurden nach Serienpassagen über ein Blut-Glucose-Medium die zu prüfenden Stämme auf Säuger-Pathogenität (gegenüber Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen) getestet. Es zeigte sich dabei, daß nicht nur *Bac. anthracis*, sondern auch *Bac. cereus* virulente Passagen liefert. 28 der geprüften *Cereus*-Stämme erwiesen sich als Säuger-pathogen (BROWN u. Mitarb. 1958). Es handelt sich bei diesen Versuchs-Ergebnissen jedoch nicht etwa um künstlich induzierte Mutationen, sondern um eine Selektion unter heterogenen Zellen von an sich Säuger-pathogenen Varietäten des *Bac. cereus*. Diese Auslese wird jedoch auf gewöhnlichem Nähragar wieder rückgängig gemacht. Die »erworbene« Virulenz kann sich somit wieder verlieren, während ihre Anlage (die Pathogenität der Varietät) bleibt.

In gleicher Weise wurden von BROWN (1959) auch *Bac. thuringiensis* (var. *thuringiensis*, var. *sotto*, var. *alesti*) und *Bac. entomocidus* (var. *entomocidus* und var. *subtoxicus*) gegenüber Mäusen getestet nach Serien-Passagen über Blut-Glucose-Medium. Im Gegensatz jedoch zu *Bac. anthracis* und *Bac. cereus* ließen sich bei *Bac. thuringiensis*- und *Bac. entomocidus*-Stämmen keine Säuger-wirksamen Bakterien-Populationen selektionieren. Diese Ergebnisse sind für eine human-hygienische Beurteilung der Anwendung von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* sehr wichtig (s. S. 65).

Weiterhin wurden von FISHER u. ROSNER (1959) noch Experimente an Mäusen zur Beurteilung der Persistenz von *Bac. thuringiensis* im Blut und einer denkbaren Virulenzsteigerung in vivo durchgeführt. In diesem Zusammenhang gelangten Dosen von etwa 5×10^7 Sporen/Maus zur intraperitonealen Injektion; es trat weder eine Intoxikation noch eine fatale Infektion auf. Im Blut von Mäusen ließ sich der Erreger nicht länger als 48 Std. post (i. p.) injectionem nachweisen. Mit den wiederholt durchgeführten Mäuse-Passagen ließ sich keine signifikante Virulenz bei *Bac. thuringiensis* nachweisen.

E. Anwendung

1. Spezifische biologische Bekämpfung von Schadinsekten

In ausgedehnten Untersuchungen wurde das Wirtsspektrum von Sporen-Endotoxin-Präparaten von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* ermittelt (s. Wirtstabelle, S. 39 f.). Dabei zeigte sich, daß die Empfindlichkeit bei peroraler Aufnahme gegenüber solchen Präparaten innerhalb der Klasse der Insekten praktisch auf die Larven von Lepidopteren beschränkt ist und mit deren zunehmendem Alter (resp. höheren Larvenstadien) abnimmt.

Alle in diesem Kapitel behandelten Anwendungsfragen beziehen sich auf (»Exotoxin«-freie) Sporen-Endotoxin-Präparate, die als spezifisch wirksam und hygienisch unbedenklich zu betrachten sind.

Die Anwendung von *Bac. thuringiensis* in der Praxis geschieht ähnlich wie die von chemischen Fraßgiften, da der Bazillus, um seine Wirkung zu entfalten, in den Darmtrakt aufgenommen werden muß. Aus diesem Grunde ist er nur gegen diejenigen empfindlichen Raupen mit Erfolg anwendbar, die eine Voraussetzung für die Wirkung von Fraßgiften mitbringen. So ist es z. B. wenig sinnvoll, *Bac. thuringiensis* gegen Knospenschädlinge einzusetzen oder gegen minierende Insekten (wie beispielsweise gegen den an sich empfindlichen Apfelwickler (*Carpocapsa pomonella* (L.))): Beim Einbohren in die Knospen, Blätter, Stengel oder Früchte nehmen minierende Raupen im allgemeinen nicht die notwendige Dosis letalis auf. So sind auch die in der Literatur immer wieder beschriebenen Fehlschläge bei der Bekämpfung von *Pyrausta nubilalis* darauf zurückzuführen, daß die empfindlichen Eiraupen sich vor dem Einbohren nicht ausreichend zu infizieren vermochten.

Was die epizootiologischen Folgen einer mikrobiologischen Schädlingsbekämpfung mit *Bac. thuringiensis* betrifft, so ist nach den bisherigen Erfahrungen (im Gegensatz zum Einsatz obligat-pathogener Krankheits-Erreger) im allgemeinen keine Dauerwirkung in der Weise zu erwarten, daß es gelingt, in geeigneten Biozöosen beständige Infektionsherde zu schaffen und zu erhalten. Daß trotzdem neben einer direkten kurzfristigen Wirkung auch unter günstigen Bedingungen Dauerwirkung vorkommen kann, zeigen Versuche von TALALAEV (1958) an dem sibirischen Arvenspinner (*Dendrolimus sibiricus* Tschetv.). Die Dauerwirkung beruhte hier auf einem Verbleiben toter Raupen in den Gespinsten, die damit zu einer neuen Infektionsquelle wurden. Weitere Beobachtungen über die Persistenz von *Bac. thuringiensis* auf

behandelten Waldflächen liegen von KUDLER u. Mitarb. (1958) aus Freilandversuchen zur Bekämpfung von *Archips (Cacoecia) crataegana* (Hbn.) vor. Diese Autoren konnten jedoch keine Ausbreitung des Erregers über die Grenzen des behandelten Areals hinaus feststellen.

Da sich nach den Erfahrungen an landwirtschaftlichen Schädlingen auf kurzlebigen Kulturpflanzen die Schädlings-Dichte im allgemeinen durch Anwendung von *Bac. thuringiensis* nicht permanent senken läßt, wird man hier, ähnlich wie bei der Benutzung chemischer Insektizide, darauf angewiesen sein, ständig den Bazillus nachzuführen. Aber selbst wenn sich im Forst bei verschiedenen Schädlingen eine langfristige Wirkung erzielen ließe, würden größere Mengen von Bazillen für den Start und den Nachholbedarf benötigt werden. In jedem Fall ergibt sich die Notwendigkeit einer industriellen Produktion von Sporen-Endotoxin-Präparaten für die praktische Anwendung im Pflanzenschutz.

Die Fälle der erfolgreichen Anwendung von *Bac. thuringiensis* und seinen Verwandten in der biologischen Schädlingsbekämpfung von Lepidopteren-Raupen sind so zahlreich geworden, daß sie nur noch aufgezählt, jedoch nicht mehr einzeln besprochen werden können. Deshalb sind in der Wirts-Tabelle (S. 39f.) alle die Schädlinge angeführt, bei denen bisher Bekämpfungen in der Literatur beschrieben worden sind. In der Tabelle bedeutet das Symbol +++ Arten, gegen die ein *Bac. thuringiensis*-Präparat bei mittlerer Anwendungs-Dosis (0,1%ige Zubereitung eines Präparates von 10^7 Sporen/mg; davon etwa 600 l/ha) gut wirksam war. Eine geringere oder fehlende Wirksamkeit (++/+ oder o) im Feldversuch bei anderen Lepidopteren-Arten beruht immer dann auf einer geringeren Empfindlichkeit des Wirtes (speziell bei einem Teil der Noctuiden und Pyraliden), wenn die Laborversuche ebenfalls nicht besser ausfielen. In allen anderen Fällen dürften ungünstige Bekämpfungstermine und Applikationsformen die Ursache für den mäßigen oder ausgebliebenen Erfolg bilden.

Wichtig für die Beurteilung des Behandlungserfolges ist, daß die meisten der empfindlichen Raupen zwar die toxinbedingte Darmparalyse noch 1—2 Tage zu überleben vermögen, jedoch kurz nach der Aufnahme von *Bac. thuringiensis* ihre Nahrungsaufnahme einstellen, so daß der Fraß-Schaden gering bleibt.

Die Entwicklung einer Resistenz (Toleranz) bei empfindlichen Insekten wurde bisher nach 3jähriger Testung im Freiland nicht beobachtet (ANONYMUS 1960).

Was die zur wirksamen Bekämpfung von Lepidopteren-Raupen notwendigen Aufwandmengen betrifft, so werden z. B. für THURICIDE, einem kommerziellen *Bac. thuringiensis*-Präparat, in Form eines Stäubemittels mit 3×10^9 Sporen/g etwa 11 bis 44 kg/ha und in Form eines Spritzmittels mit 30×10^9 Sporen/g etwa 1,1 bis 4,4 kg/ha empfohlen (ANONYMUS 1960). Wäßrige Spritzbrühen sollten noch am gleichen Tag versprüht werden, da sie sonst infolge ihrer organischen Bestandteile verderben.

2. Wirkung auf Nutzinsekten und übrige Insektenfauna

Werden spezifische Sporen-Endotoxin-Präparate verwendet, so bestehen keine Gefahren für Nutzinsekten, soweit sie Nicht-Lepidopteren sind. — Vorsicht ist nur in den Ländern geboten, in denen Seidenbau betrieben wird, da Seidenraupen (von *B. mori* und anderen Seidenspinnern) gegenüber *Bac. thuringiensis* empfindlich sind*). In der Nähe von Seidenbau-genützten *Morus*-Beständen ist daher eine Verwendung von *Bac. thuringiensis* tunlichst zu vermeiden. —

*) Nach KLEMENT (1951b) beträgt die durchschnittliche Mortalität 50 bis 60% bei Verwendung mittlerer Dosen von *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Eine Chemoprophylaxe und -therapie von Seidenraupen gegen Erkrankungen durch *Bac. thuringiensis* ist nach AFRIKIAN (1960) mittels Antibiotika möglich. Hierfür kommen in Frage Streptomycin, Aureomycin oder Tetracycline. Blätter, die in 500 E/ml Antibiotika getaucht waren, erzielten nach ihrer Aufnahme eine wirksame bakteriostatische Konzentration im Raupendarm, die 16 bis 24 Std. anhielt. Selbst hohe Antibiotika-Dosen hatten keine Giftwirkung auf die behandelten Seidenraupen.

Gegenüber anderen Nutzinsekten ist das *Bac. thuringiensis*-Endotoxin seines schmalen Wirkungsspektrums wegen ungefährlich.

Nach Versuchen von KRIEG (1955) und KAESER (1957) wurde keine Giftwirkung auf Honigbienen (*Apis mellifera* (L.)) festgestellt, wenn diesen Waben angeboten wurden, die zuvor mit *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* in der Anwendungsdosis von 0,2% behandelt worden waren. KAESER registrierte weder eine verzögerte Eiablage durch die Königin noch eine toxische oder hemmende Wirkung auf die Brut, noch eine sonstige negative Beeinflussung des Bienenvolkes. Auch STUTE (1960) konnte weder eine Kontaktgift-Wirkung noch eine Atemgift-Wirkung, noch eine Beeinträchtigung von Bienen durch direktes Besprühen feststellen. Die LD₅₀ per os lag so hoch, daß eine Gefährdung der Bienen durch *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* in praxi ausgeschlossen ist. — Zu ähnlichen Ergebnissen kamen LECOMTE u. MARTOURET (1958) bei *Bac. thuringiensis* var. *alesti* und amerikanische Autoren (s. FISHER u. ROSNER 1959).

Auch an nützlichen Insekten wurden bisher keine Schäden bekannt. Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von *Bac. thuringiensis* auf Schlupfwesen wurden u. a. von BILLIOTTI (1956 a, b) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß als Folge einer Bekämpfung von *Pieris rapae* (L.) sekundär in parasitierten Raupen weder die Larven der Ichneumonide *Anilastus ebeninus* Grav. noch die der Braconide *Apanteles glomeratus* L. abgetötet wurden. Auch ISAKOVA (1958) fand keine Wirksamkeit von *Bac. thuringiensis* gegenüber *A. glomeratus*.

Der Einfluß von *Bac. thuringiensis* auf die Arthropoden-Fauna des Apfelbaums wurde von STEINER (1960) untersucht: Bei einem kurzfristigen und einem langfristigen Versuch wurde *Bac. thuringiensis* in einer 0,2%igen Spritzbrühe verwendet. Berücksichtigt wurden 15 Arten oder Gruppen von schädlichen, 24 Arten oder Gruppen von nützlichen und 20 Arten oder Gruppen von indifferenten Arthropoden. Nach 3 Tagen (kurzfristiger Versuch) betrug die Reduktion der Gesamtf fauna bei *Bac. thuringiensis*-Behandlung 0%. Der zum Vergleich angewandte organische Phosphorsäureester E 605 forte (in 0,035%iger Konzentration) bewirkte eine 60%ige Reduktion der Gesamtf fauna, darunter 49% Schädlinge, 57% Nützlinge, 74% indifferente Arten. Nach 42 Tagen (langfristiger Versuch) betrug die Wirkung von *Bac. thuringiensis* 15%ige Reduktion der Schädlinge (3 von 15 Arten oder Gruppen waren hiervon empfindliche Lepidopteren-Larven) und 0% bei Nützlingen und indifferenten Arten. Bei den geschonten Nützlingen handelt es sich um:

Coleopteren: *Staphylinidae*, *Coccinellidae* (Larven, Imagines), Hemipteren: *Orius minutus* (L.), *Temnostethus pusillus* H. S., *Anthocoris nemoralis* F., *Phytocoris demidiatus* Klem., *Camptobrochis lutescens* (Schill.), *Deraecoris olivaceus* F., *Pilophorus perplexus* D. et S., *Orthotylus marginalis* Reut., *Psallus ambiguus* Fall., *Atractotomus mali* Mey. D., Larven von *Anthocoridae*, Larven von *Miridae*, andere Hemipteren (Imagines), sonstige Nützliche: parasitische Hymenopteren, *Syrphidae*, *Tachinidae*, *Itonididae* (Larven, Imagines), *Chrysopa spec.* (Imagines), andere Neuropteren (Imagines), Neuropteren-Larven.

3. Wirkung auf Pflanzen und andere Anwendungsfragen

Die Einwirkung von *Bac. thuringiensis* und *Bac. entomocidus* auf Pflanzen hat für diese keinerlei nachteilige Folgen. Dies geht sowohl aus eigenen Versuchen (KRIEG 1956, 1957, 1958) hervor als auch aus Erfahrungen unseres Arbeitskreises (CRAMER 1959, HERFS 1959, STEIN 1959, HERFS 1960 und STEIN 1960). Auch bei den Bekämpfungsversuchen in den USA, bei denen ca. 500 kg *Bac. thuringiensis*-Präparate in den Jahren 1957 und 1959 verbraucht wurden, waren keine Schäden an den behandelten Pflanzen festzustellen (FISHER u. ROSNER 1959). Eine Schädwirkung auf Pflanzen infolge Infektion ist nicht zu erwarten, da nach STAPP (1958) bisher keine Art des Genus *Bacillus* als pflanzenpathogen erkannt worden ist.

Versuche, die den Einfluß von *Bac. thuringiensis* auf die Boden- und Wasser-Mikrobiologie sowie landwirtschaftlich wichtige Gärungen zum Gegenstand haben, müssen noch durchgeführt werden.

Zum »Lebensmittel-chemischen« Nachweis wirksamer Behandlungsrückstände von *Bac. thuringiensis* — soweit nicht reine Toxinpräparate verwendet werden — eignet sich nach Untersuchungen von HOLTSMANN (1960) sehr gut der kulturelle Erregernachweis. Hierzu werden die Beläge von behandelten Blättern in 30°C warmem Wasser ½ Std. lang auf der Schüttelmaschine abgewaschen (20 g Blatt auf 300 ml Wasser). Bei scharfem Zentrifugieren des Waschwassers sedimentieren die Sporen und Blattreste. Das Sediment wird in wenig Wasser aufgenommen, durch ein grobes Filter gegeben und 30 sek auf 85°C erhitzt. Die Bestimmung der Keimzahl erfolgt dann nach dem KOCHSchen Plattenverfahren.

Die Haltbarkeit von *Bac. thuringiensis*-Belägen auf den behandelten Pflanzen ist abhängig von der Witterung, der Art der Ausbringung des Mittels (Spritzen oder Stäuben) und seinen Zusätzen (Haftmittel wie z. B. 1⁰/₁₀₀ Methylzellulose; Netzmittel wie z. B. 2⁰/₁₀₀ Alkylphenol; Suspensionsmittel: Wasser oder Spezial-Mineralöl; Streckmittel: Talkum). Im allgemeinen sollte der Belag bei gutem Wetter etwa eine Woche wirksam bleiben. Über den Einfluß von Regen auf die Haltbarkeit von *Bac. thuringiensis*-Belägen s. LEMOIGNE u. Mitarb. (1956), KRIEG (1957 a), MARTOURET (1959). Keimfähige Sporen sind noch wochenlang auf behandelten Blättern nachweisbar (KRIEG 1957 c, HERFS 1960, HOLTSMANN 1960).

Der Verwendung von *Bac. thuringiensis* zusammen mit bestimmten im Pflanzenschutz benutzten Fungiziden und Insektiziden steht nach den bisherigen Ergebnissen im allgemeinen nichts entgegen. Nach MARTOURET (1959) hatten die Fungizide Kupferoxychlorid und Dithiokarbamat keine nachteilige Wirkung auf *Bac. thuringiensis*. McEWEN u. Mitarb. (1960) untersuchten die Mischbarkeit von *Bac. thuringiensis* mit Insektiziden (Parathionin, Sevin, Demeton, Trithionin) und Fungiziden (Chloranil, Captan, COSC, Dodine, Ferbam, Glyodin, Sulfur, Tag). Mit Ausnahme von Chloranil konnte keinerlei Wirkungs-Beeinträchtigung bei *Bac. thuringiensis* festgestellt werden (wenn die Mischungen nicht länger als 3 Std. unbenutzt stehenblieben). Chloranil jedoch setzte die toxische Wirkung von *Bac. thuringiensis* (auf *Trichoplusia ni* (Hbn.) und *Pieris brassicae* (L.)) merklich herab und reduzierte die Zahl der keimfähigen Sporen fast um 90%. Weiterhin eignen sich von Insektiziden zur Zumischung: Phosdrin, Toxaphen, Guthion, Endrin und DDT, dagegen nicht TEPP. Von Fungiziden sind nicht zumischbar Chloranil, Kupferkalkbrühe und Spergon und von sonstigen Chemikalien Alkohole und Äther (ANONYMUS 1960).

4. Die Zulassung von Bazillen-Präparaten zur Schädlingsbekämpfung

Für den Einsatz von *Bac. thuringiensis* zur Schädlingsbekämpfung in der Bundesrepublik Deutschland sind die gesetzlichen Regelungen zu beachten, die darauf abzielen, gesundheitliche Schäden für den Menschen und seine Nutztiere durch potentiell pathogene Krankheitserreger zu verhindern.

Die entsprechende Verordnung zur Ergänzung der Vorschriften über Krankheitserreger vom 16. März 1936 (RGBl. I, S. 178) verbietet die Verwendung solcher bakterienhaltiger Mittel, durch die beim Menschen oder beim Vieh (hierunter sind alle nutzbaren Haustiere einschließlich Bienen zu verstehen) übertragbare Krankheiten hervorgerufen werden. Diese Auslegung ergibt sich aus § 27 des Gesetzes, betreffend die Bekämpfung gemeingefährlicher Krankheiten vom 30. Juni 1900 (RGBl. I, S. 306) und § 17 Ziff. 16 des Viehseuchengesetzes vom 26. Juni 1909 (RGBl., S. 519), auf die sich die Ermächtigung zum Erlass der Verordnung zur Ergänzung der Vorschriften über Krankheitserreger vom 16. März 1936 stützt.

Diese Verordnung steht der Anwendung von Präparaten wie *Bac. thuringiensis* jedoch nur so lange entgegen, wie eine Gefahr gesundheitlicher Schäden für den Menschen und seine Nutztiere (einschließlich Bienen) zu befürchten ist. Nachgewiesenermaßen liegt aber bei sorgfältig zubereiteten Sporen-Endotoxin-Präparaten der *Bac. thuringiensis*-Gruppe eine solche Gefährdung, sowohl von Säugern und Menschen als auch von Bienen, nicht vor (s. Abschn. D u. E 2).

Um im Sinne des Gesetzes auf alle Fälle sicherzustellen, daß die gewerbsmäßig hergestellten und vertriebenen Zubereitungen von *Bac. thuringiensis* frei von Säuger- und Menschen-pathogenen sowie Bienen-pathogenen Keimen sind, ist für deren Herstellung und Angabe zu fordern:

- a) Eigenbetriebliche bakteriologische Kontrolle auf Reinkultur des Ansatzes. Prüfung auf Apathogenität gegenüber weißen Mäusen nach Injektion einer Dosis von mindestens 10^6 Sporen/Tier. Prüfung auf Bienen-Ungefährlichkeit durch Besprühen oder Bestäuben von leeren Waben mit der Anwendungsdosis des Bazillen-Präparates und deren Einbringen in Bienenstöcke.
- b) Stichprobenartige Überwachung der im Handel befindlichen Präparate durch amtliche Stellen auf Apathogenität gegenüber weißen Mäusen (die Prüfung erfolgt durch Injektion einer Dosis von mindestens 10^6 Sporen/Tier), auf mögliche Verunreinigungen durch Säuger-pathogene Enterobakterien (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) und Bienen-pathogene Enterobakterien (*Hafnia alvei*).

Strengere Vorschriften jedoch als die Handelsbestimmungen für Lebensmittel erscheinen nicht erforderlich, da letztere (wie z. B. Fleischwaren, Eier und Milch) bessere Nährböden für pathogene Keime abgeben als das zur Diskussion stehende Bazillen-Präparat.

Anm. Ähnliche Vorschläge machte STEINHAUS (1957 b) für die Zulassung von *Bac. thuringiensis*-Präparaten in den USA.

In Amerika wurden *Bac. thuringiensis*-Präparate (Thuricide) vom US Department of Agriculture (USDA) für die Bekämpfung von *Pieris rapae* (L.) und *Trichoplusia ni* (Hbn.) an Kohl, Lattich, Sellerie und Kartoffeln sowie von *Protoperce* spec. an Tabak anerkannt. Weiterhin wurden für die Anwendung von bestimmten Präparaten des *Bac. thuringiensis* gegen obige und eine Reihe weiterer Pflanzen (Luzerne, Äpfel, Artischocken, Bohnen, Baumwolle und Spinat) im Gegensatz zu chemischen Pflanzenschutzmitteln vom USDA keine Karenzzeiten und Toleranzen gefordert, so daß das Präparat bis zur Ernte angewandt werden darf. Für die Behandlung einer Reihe weiterer Pflanzen wurde eine befristete Ausnahmegenehmigung erteilt (Näheres hierüber s. ANONYMUS 1960).

Im Rahmen der amtlichen Anerkennung von Schädlings-Bekämpfungsmitteln sollten demnach zur Schonung der Biozönose nur solche *Bac. thuringiensis*-Präparate anerkannt werden, die als spezifische Sporen-Endotoxin-Präparate keine sonstige Beimischung enthalten. Grundsätzlich sollte den Herstellern die Angabe der Sporenzahl pro Gramm im Präparat zur Auflage gemacht werden, wie dies auch in den USA vom Department of Agriculture verlangt wird.

5. Ausblick

In dem genannten Sporen-Endotoxin-Präparat steht erstmalig in großem Maßstab ein Mittel zur Verfügung, das manche Vorteile der biologischen Methode (Selektivität, keine toxischen Nebenwirkungen) mit der leichten Anwendbarkeit der chemischen Methode verbindet:

1. Der Bazillus in Form seines Sporen-Endotoxin-Präparates ist gegenüber dem Menschen, den Nutztieren und Nutzpflanzen ungefährlich; daher gibt es weder bei der Behandlung noch danach Schäden durch Rückstände.
2. Nach den bisherigen ausgedehnten Untersuchungen werden von dem Sporen-Endotoxin-Präparat selbst bei hohen Dosierungen von allen Insekten im wesentlichen nur Lepidopteren-Raupen wirksam angegriffen. Jedenfalls sind Bienen u. a. Blütenbestäuber sowie entomophage Insekten nicht gefährdet. Die demnach unbeeinflusst bleibenden natürlichen Feinde können sich also in der behandelten Population weiterhin gegen die betreffenden Schädlinge auswirken.

Wenn auch jede Verminderung des Schädlingsbestandes unvermeidlich deren Feinde beeinflußt, gilt es im modernen Pflanzenschutz nach Verfahren zu suchen, die solche Eingriffe in das regulatorische Gefüge einer Lebensgemeinschaft auf das erträgliche Mindestmaß einschränken. Wie wenig die meisten der heute üblichen chemischen Mittel dieser Forderung nach vorsichtigem Eingriff in das Ökosystem entsprechen und welche wirtschaftlich unerfreulichen Folgen daraus entstehen können, ist in den letzten Jahren mehrfach gezeigt worden (z. B. SCHNEIDER 1955, RIPPER 1956). Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen ist zu erwarten, daß das genannte *Bac. thuringiensis*-Präparat einen Entwicklungsschritt zum »spezialisierten Kompromiß« (FRANZ 1961) darstellt, der für den heute sich anbahnenden Ausgleich zwischen chemischem und biologischem Verfahren kennzeichnend und für den modernen Pflanzenschutz wünschenswert ist.

F. Literatur

- ABBOTT, W. S., A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Ent.* 18. 1925, 265—267.
- AFRIKIAN, E. G., Causal agents of bacterial diseases of the silkworm and use of antibiotics in their control. *J. Insect Path.* 2. 1960, 299—304.
- ANGUS, T. A., An bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature* 173. 1954, 545—546.
- ANGUS, T. A., Studies on the toxin of *Bacillus sotto* Ishiwata and on its toxicity against certain insects. Ph. D. thesis, McGill University, Montreal 1955.
- ANGUS, T. A., General characteristics of certain insect pathogens related to *Bacillus cereus*. *Canad. J. Microbiol.* 2. 1956 a, 111—121.
- ANGUS, T. A., Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Canad. J. Microbiol.* 2. 1956 b, 122—131.
- ANGUS, T. A., The reaction of certain lepidopterous and hymenopterous larvae to *Bacillus sotto* toxin. *Canad. Ent.* 88. 1956 c, 280—283.
- ANGUS, T. A., Extraction, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Canad. J. Microbiol.* 2. 1956 d, 416—426.
- ANGUS, T. A., Comparative solubility of *Bacillus sotto* and *Bacillus thuringiensis* toxins. *Canad. Sci. Serv. Div. Forest Biol. bi-monthly Progr. Rept.* 12. (1), 1956 e.
- ANGUS, T. A., Separation of bacterial spores and parasporal bodies with a fluorocarbon. *J. Insect Path.* 1. 1959, 97—98.
- ANGUS, T. A., and HEIMPEL, A. M., An effect of *Bacillus sotto* on the larvae of *Bombyx mori*. *Canad. Ent.* 88. 1956, 138—139.
- ANGUS, T. A., and HEIMPEL, A. M., Further observations on the action of *Bacillus sotto* toxin. *Canad. Sci. Serv. Div. Forest Biol. bi-monthly Progr. Rept.* 14. (4), 1958.
- ANGUS, T. A., and HEIMPEL, A. M., Inhibition of feeding, and blood pH changes, in lepidopterous-larvae infected with crystal-forming bacteria. *Canad. Ent.* 91. 1959, 352—358.
- ANONYMUS, Thuricide, the microbial insecticide. *News Bioferm Corp. Inform. Bull.*, Sept. 1960.
- AOKI, K., und CHIGASAKI, Y., (Zur Anwendung der Agglutinationsreaktion bei der bakteriologischen Untersuchung der Seidenraupen. Weitere Aufklärung zu der Frage der Identität von *Bacillus sotto* (Ishiwata), *Bacillus alvei* (Chesire et Cheyne) und *Bacillus megatherium*.) *Ber. kaiserl. Seidenzucht-Vers.anst. Nokano, Tokyo*, 1. 1915 a, 1—126.
- AOKI, K., und CHIGASAKI, Y., (Über die Pathogenität der sog. *Sotto*-Bacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen.) *Mitt. med. Fak. kaiserl. Univ. Tokyo* 13. 1915 b, 419—440.
- De BARJAC, H., et BURGERJON, A., Études d'efficacité comparatives des différentes souches de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Verh. XI. int. Ent.kongr., Wien* 1960.
- BÉGUIN, S., et MARTOURET, D., Essais de traitement microbiologique par poudrage. *Verh. IV. int. Pfl.schutz-Kongr., Hamburg* 1957. 1. 1959, 885—887.

- BERLINER, E., Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. Ztschr. ges. Getreidewesen 3. 1911, 63—70.
- BERLINER, E., Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Ztschr. angew. Ent. 2. 1915, 29—56.
- BILIOTTI, E., Entomophages et maladies des insectes. Entomophaga, Paris, 1. 1956 a, 45—53.
- BILIOTTI, E., Mise au point d'une méthode de lutte biologique utilisant des suspensions de spores de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) souche »Anduze«. Entomophaga, Paris, 1. 1956 b, 95—98.
- BILIOTTI, E., Relations entre agents pathogènes et entomophages. Entomophaga, Paris, 1. 1956 c, 101—103.
- BLISS, C. I., The toxicity of poisons applied jointly. Ann. appl. Biol. 26. 1939, 585—615.
- BONNEFOI, A., et BÉGUIN, S., Recherches sur l'action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* Berliner souche »Anduze«. Entomophaga, Paris, 4. 1959, 194—199.
- BONNEFOI, A., BURGERJON, A., et GRISON, P., Titrage biologique des préparations de spores de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 247. 1958, 1418—1420.
- BRIGGS, J. D., Humoral immunity in lepidopterous larvae. J. exp. Zool., Philadelphia, 138. 1958, 155—188.
- BRIGGS, J. D., 1959, zit. nach FISHER u. ROSNER 1959.
- BRIGGS, J. D., Pathogens for the control of pests. Biological and chemical control of plant and animal pests. Amer. Assoc. Adv. Science, Washington, D. C. 1960 a, 137—148.
- 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. 1960 b, 418—432.
- BROWN, E. R., 1959 zit. nach STEINHAUS 1959 a.
- BROWN, E. R., MOODY, M. D., TREECE, E. L., and SMITH, C. W., Differential diagnosis of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* var. *mycoides*. J. Bact., Baltimore, 75. 1958, 499—509.
- BUCHER, G. E., General summary and review of utilization of disease to control insects. Proc. 10th int. Congr. Ent., Montreal 1956. 4. 1958, 695—701.
- BUCHER, G. E., Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. J. Insect Path. 2. 1960, 172—195.
- BURGERJON, A., Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. Ann. Épiphyties, Paris, 7. 1956, 675—684.
- BURGERJON, A., L'utilisation des chenilles de *Pieris brassicae* (L.) comme »Insecte test« de laboratoire dans un service de contrôle de préparations pathogènes insecticides. Entomophaga, Paris, 2. 1957, 129—135.
- BURGERJON, A., Titrage et définition d'une unité biologique pour les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga, Paris, 4. 1959, 201—206.
- BURGERJON, A., et de BARJAC, 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.

- BURGERJON, A., et GRISON, P., Sensibilité de différents lépidoptères à la souche »Anduze« de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Entomophaga, Paris, 4. 1959, 207—209.
- BURGERJON, A., et KLINGER, K., Détermination au laboratoire de l'époque de traitement de *Tortrix viridana* L. avec une préparation à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Ent. exp., appl., Amsterdam, 2. 1959, 100—109.
- BURGERJON, A., et YAMVRIAS, 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.
- BURGERJON, A., et YAMVRIAS, C., Méthode de titrage biologique des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* avec *Anagasta kühniella* Zell. Verh. XI. int. Ent. kongr., Wien 1960.
- CHAPMAN, G. B., Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. II. Sporulation of *Bacillus megatherium* und *Bacillus cereus*. J. Bact., Baltimore, 71. 1956, 348.
- CHAPMAN, G. B., and HILLERS, J., Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria. J. Bact., Baltimore, 66. 1953, 362—373.
- CHORINE, V., New bacteria pathogenic to the larvae of *Pyrausta nubilalis* Hb. Int. Corn Borer Invest. Sci. Rept. 2. 1929, 39—53. (s. auch Ann. Inst. Pasteur, Paris, 43. 1929, 1657—1678).
- CHORINE, V., On the use of bacteria in the fight against the corn borer. Int. Corn Borer Invest. Sci. Rept. 3. 1930 a, 94—98.
- CHORINE, V., De l'utilisation des microbes entomophytes dans la lutte contre les insectes nuisibles et de la destruction par ces microbes des chenilles de la pyrale du maïs. Acta bot. Inst. Univ. Zagreb 5. 1930 b, 7—17.
- CHORINE, V., Sur l'utilisation des microbes dans la lutte contre la pyrale du maïs. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 46. 1931, 326—336.
- CHU, H. P., The lecithinase of *Bacillus cereus* and its comparison with *Clostridium welchii* α -toxin. J. gen. Microbiol. 3. 1949, 255—273.
- 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, Paris, 94. 1958, 670—673.
- Van DAMME, E. N. G., and van der LAAN, P. A., Some observations on the effect of E-58 powder (*Bac. thuringiensis* Berliner) on *Malacosoma neustria* L. (Lepidop.). Entomophaga, Paris, 4. 1959 a, 221—225.
- Van DAMME, E. N. G., and van der LAAN, P. A., Some observations on the effect of E-58 powder (*Bac. thuringiensis* Berliner) on *Malacosoma neustria* L. (Lepidop.). Ent. Ber., Amsterdam, 19. 1959 b, 104.
- DE, R. K., and KONAR, G., Effect of *Bacillus thuringiensis* on *Trogoderma granarium*. J. econ. Ent. 48. 1955, 773—774.
- DELAPORTE, B., et BÉGUIN, S., Étude d'une souche de *Bacillus*, pathogène pour certains insectes, indentifiable à *Bacillus thuringiensis* Berliner. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 89. 1955, 632—643.
- DRILHON, A., et VAGO, C., Recherches sur le mécanisme d'action de *Bacillus thuringiensis*. — Effet de la toxémie sur les fractions protéiques de l'hémolymphe. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol., Serol. 26. 1960, 407—412.

- 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.
- ECKSTEIN, F., Untersuchungen zur Epidemiologie und Bekämpfung von *Pyrausta nubilalis* Hb. und *Platyparea poeciloptera* Schr. Arb. physiol., angew. Ent. Berlin-Dahlem 1. 1934, 109—131.
- FALDINI, J. D., y PASTRANA, J. A., *Bacillus thuringiensis* B. come agente entomofago de *Colias lesbia* F. Rev. argent. Agron. 19. 1952, 154—165.
- FISHER, R. and ROSNER, L., Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide. J. agric., Food Chem., Washington, 7. 1959, 686—688.
- FITZ-JAMES, P. C., TOUMANOFF, C., and YOUNG, E., Localization of a toxicity for silkworm larvae in the parasporal inclusion of *Bacillus cereus* var. *alesti*. Canad. J. Microbiol. 4. 1958, 385—392.
- 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., Baltimore, 78. 1959, 743—754.
- FRANZ, J. M., Biologische Schädlingsbekämpfung. In: SORAUER, Handb. Pfl.krankh. 6. Bd., 3. Lfg. P. Parey, Berlin 1961, 2. Aufl., 1—302.
- GOLEBIEWSKA, Z., (Preliminary studies on the possibility of using *Bacillus thuringiensis* Berliner to the control of mediterranean flour moth (*Ephestia künniella* Zeller.) Biul. Inst. Ochr. Rośl., Poznań, 8. 1960, 55—68.
- GRIGARICK, A. A., and TANADA, Y., A field test for control of *Trichoplusia ni* (Hbn.) on celery with several insecticides and *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. econ. Ent. 52. 1959, 1013—1014.
- GRISON, P., Quelques aspects de la lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures. Ann. Épiphyties, Paris, 4. 1956 a, 543—562.
- GRISON, P., Rapport. Colloques d'Antibes, Comm. int. Lutte biol., 1956 b, Nov. 20—22, hektogr., 119—124.
- GRISON, P., et BÉGUIN, A., Premiers essais sur une méthode d'emploi et sur l'efficacité de *Bacillus cereus* contre les chenilles processionnaires. Compt. rend. Acad. Agric. France 40. 1954, 413—416.
- GÜNTHER, S., Über einen Bekämpfungsversuch mit *Bacillus thuringiensis* Berliner gegen *Hyponomeuta malinella* Zell. Ztschr. Pfl.krankh. 67. 1960, 475—478.
- GUKASJAN, A. B., (Die Anfälligkeit der Bienen für die Erreger der Krankheit des Sibirischen Spinners.) Pčelovodstvo (Bienenzucht), Vjatka, 11. 1958, 46—48.
- GUKASJAN, A. B., und KOLOMIEC, N. G., (Versuche zur Verwendung des Lepidopteren-Bacillus für die biologische Bekämpfung des Sibirischen Spinners (*Dendrolimus sibiricus*.) Lesn. Choz. (Forstw. UdSSR) 10. 1957, 38.
- GUTHRIE, F. E., RABB, R. L., and BOWERY, T. G., Evaluating of candidate insecticides and insect pathogens for tobacco hornworm control, 1956—1958. J. econ. Ent. 52. 1959, 798—804.
- HALL, I. M., Studies of microorganisms pathogenic to the sod webworm. Hilgardia, Berkeley, 22. 1954, 536—565.
- HALL, I. M., The use of *Bacillus thuringiensis* Berliner to control the western grapeleaf skeletonizer. J. econ. Ent. 48. 1955, 675—677.

- HALL, I. M., 1957, zit. nach STEINHAUS 1957.
- HALL, I. M., and ANDERS, I. A., Field evaluation of commercially produced *Bacillus thuringiensis* Berliner used for control of lepidopterous larvae on crucifers. J. econ. Ent. 52. 1959, 877—880.
- HALL, I. M., and ARAKAWA, K. Y., The susceptibility of the house fly, *Musca domestica* Linnaeus, to *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Insect Path. 1. 1959, 351—355.
- HALL, I. M., and DUNN, P. H., Susceptibility of some insect pests to infection by *Bacillus thuringiensis* Berliner in laboratory tests. J. econ. Ent. 51. 1958, 296—298.
- HANNAY, C. L., Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. Nature, London, 172. 1953, 1004.
- HANNAY, C. L., Inclusions in bacteria. In: Bact. Anatomy, Symp. Soc. gen. Microbiol. 6. 1956, 1004 p.
- HANNAY, C. L., u. FITZ-JAMES, P., The protein crystals of *Bac. thuringiensis* Berliner. Canad. J. Microbiol. 1. 1955, 694—710.
- HEIMPEL, A. M., 1960, zit. nach HEIMPEL and ANGUS 1960.
- HEIMPEL, A. M. and ANGUS, T. A., Recent advances in our knowledge of some bacterial pathogens of insects. Proc. 10th int. Congr. Ent., Montreal, 4 (1956). 1958a, 711—722.
- HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A., The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. Canad. J. Microbiol. 4. 1958 b, 531—541.
- HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A., The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Path. 1. 1959 a, 152—170.
- HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A., The susceptibility of certain geometrids to crystalliferous bacteria. Canad. Sci. Serv., Div. Forest Biol., bi-monthly Progr. Rept. 15 (6). 1959 b, 2.
- HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A., Bacterial insecticides. Bact. Rev. 24. 1960 a, 266—288.
- HEIMPEL, A. M., and ANGUS, T. A., On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria. J. Insect Path. 2. 1960 b, 311—319.
- HERFS, W., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1959.
- HERFS, W., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1960.
- HERFS, W., und KRIEG, A., unveröffentlicht, 1959.
- HERFS, W. und KRIEG, A., unveröffentlicht, 1960.
- HOLTMANN, K. H., Der Nachweis von *Bacillus thuringiensis* auf Gemüsepflanzen sowie das Verhalten seines Endotoxins gegenüber einigen Fermenten. Diss. Goethe-Univ. Frankfurt/M. 1960.
- HOSKINS, W. M., Bioassay in entomological research. Ztschr. Pfl.krankh. 64. 1957, 498—505.
- HUSZ, B., *Bacillus thuringiensis* Berl., a bacterium pathogenic to corn borer larvae. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 1. 1928, 191—193.
- HUSZ, B., On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 2. 1929, 99—110.
- HUSZ, B., Field experiments on the application of *Bacillus thuringiensis* against the corn borer. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 3. 1930, 91—98.

- HUSZ, B., Experiments during 1931 on the use of *Bacillus thuringiensis* Berliner in controlling the corn borer. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 4. 1931, 22—23.
- ISAKOVA, N. P., (Eine neue Varität von Bakterien eines für Insekten pathogenen Typs von *Bac. cereus* Fr.) Dokl. vses. Akad. sel'choz. Nauk Lenina (Proc. Lenin. Acad. agric. Sci. USSR) 23. 1958 a, 26—27.
- ISAKOVA, N. P., (Die Wirkung eines sporenbildenden Bakteriums vom Typ *Bacillus cereus* an einigen schädlichen Insekten.) Ent. Obozr. (Rev. Ent. USSR) 38. 1958 b, 846—855.
- ISHIWATA, S., Dainihon Sanshi Kaiho 9 (114), 1901, 1—5.
Koyoto Sanyo Koshujo Sanji Hokoku (2). 1902, 346—347.
Dainihon Sanshi Kaiho 14 (160). 1905, 24—28.
Dainihon Sanshi Kaiho 14 (161). 1905, 24—26.
- JACOBS, S. E., Bacteriological control of the fluor moth, *Ephestia kuehniella* Z. Proc. Soc. appl. Bact. 13. 1950, 83—91.
- KAESER, W., 1957, zit. nach KRIEG und FRANZ 1959.
- KANTACK, B. H., Laboratory studies with *Bacillus thuringiensis* and its possible use for control of *Plodia interpunctella* (Hbn.). J. econ. Ent. 52. 1959, 1926—1927.
- KELLEN, W. R., and LEWALLEN, L. L., Response of mosquito larvae to *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Insect Path. 2. 1960, 305—306.
- KLEMENT, Z., (Experimente zur Verwendung von Bakterien zur biologischen Bekämpfung des amerikanischen Bärenspinners (*Hyphantria cunea* Drury).) Jahrb. Zentralst. landw. Vers.wesen, Budapest, 3. 1951 a, 118—127.
- KLEMENT, Z., (Weitere Experimente zur Verwendung von *Bacillus thuringiensis* zur biologischen Bekämpfung von *Hyphantria cunea* Drury.) Jahrb. Zentralst. landw. Vers.wesen, Budapest, 6. 1951 b, 177—183.
- KRIEG, A., unveröffentlicht, 1955.
- KRIEG, A., Diskussionsbeitrag Symp. Insektenpath. Darmstadt 1956 (anonym berichtet durch J. FRANZ u. E. MÜLLER-KÖGLER). Entomophaga, Paris, 1. 1956, 98.
- KRIEG, A., Über die Möglichkeit einer Bekämpfung des Kohlweißlings (*Pieris brassicae*) durch künstliche Verbreitung einer Bakteriose. Ztschr. Pfl.krankh. 64. 1957 a, 321—327.
- KRIEG, A., Versuch eines Nachweises von echten Antikörpern in Insektenhämolymphe mit Hilfe klassischer Methoden. Naturwissenschaften 44. 1957 b, 309.
- KRIEG, A., unveröffentlicht, 1957 c.
- KRIEG, A., unveröffentlicht, 1958.
- KRIEG, A., unveröffentlicht, 1959.
- KRIEG, A., unveröffentlicht, 1960.
- KRIEG, A., Grundlagen der Insektenpathologie. Viren-, Rickettsien- und Bakterien-Infektionen. D. Steinkopff, Darmstadt 1961, 304 S.
- KRIEG, A., und FRANZ, J., Versuche zur Bekämpfung von Wachsmotten mittels Bakteriose. Naturwissenschaften 46. 1959, 22—23.
- KRIEG, A., HERFS, W., und HUGER, A., 1960, unveröffentlicht.
- KRIEG, A., und MÜLLER-KÖGLER, E., Über eine pilzbedingte Hemmung von *Bacillus thuringiensis* in Submerskulturen. Naturwissenschaften 46. 1959, 630—631.

- KRYWIENCZYK, J., and ANGUS, T. A., A serological comparison of the parasporal bodies of three insect pathogens. *J. Insect Path.* 2. 1960, 411—417.
- KUDLER, J., LYSENKO, O., und HOCHMUT, R., Versuche mit der Anwendung von einigen bakteriellen Suspensionen gegen den Wickler *Cacoecia crataegana* Hb. *Trans. 1. int. Conf. Insect. Path. biol. Control, Praha 1958.* 1959, 73—79.
- KÜTHER, H., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1959.
- KUSHNER, D. J., 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.
- LECOMTE, J., et MARTOURET, D., Non toxicité pour les abeilles des traitements à base de *Bacillus thuringiensis*, souche Anduze. (Bactérie pathogène pour les larves des Lépidoptères). *Ann. épiphyt. abeille* 2. 1959, 171—175.
- LEISE, J. M., CARTER, C. M., FRIEDLÄNDER, H., and FREED, S. W., Criteria for the identification of *Bacillus anthracis*. *J. Bact.*, Baltimore, 77. 1959, 655—660.
- LEMOIGNE, M., BONNEFOI, A., BÉGUIN, S., GRISON, P., MARTOURET, D., SCHENK, A., et VAGO, C., Essais d'utilisation de *Bacillus thuringiensis* Berliner contre *Pieris brassicae* L. *Entomophaga, Paris*, 1. 1956, 19—34.
- LESKOVA, A. J., (Versuch zur Anwendung eines Bakterienpräparates im Kampf gegen *Hyponomeuta malinella* Zell.) In: *Biol. Methoden Schädl.bekämpfung, Kišinev 1958*, 25—26.
- LESKOVA, A. J., (Untersuchungen über die Anwendung von Bakterienpräparaten zur Bekämpfung der Apfelbaum-Gespinstmotte unter den Bedingungen des Voronež-Gebietes. In: *Biol. Methode Bekämpfung Pfl.schädl. Ukrain. Akad. Landw.wiss., Kiev 1959*, 70—75.
- LILES, J. N., and DUNN, P. H., Preliminary laboratory results on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Linnaeus) to *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Insect Path.* 1. 1959, 309—310.
- LYSENKO, O., ČAS, *Inst. Biol. Lab. Insect Path. (Prague), Catalogue of strains of bacteria, Febr. 1958.*
- MAJUMDER, S. K., MUTHU, M., and PINGALE, S. V., A bacterial disease of *Heliothis obsoleta* F. *Curr. Sci., Bangalore*, 24. 1953, 122—123.
- MAJUMDER, S. K., MUTHU, M., and PINGALE, S. V., Bacterial control of insects. I. Studies on the field control of the lablab pod-boring caterpillar. *Indian J. Ent.* 18. 1957, 397—407.
- MARTIGNONI, M. E., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1960.
- MARTOURET, D., Applications diverses et normes d'utilisation de *Bacillus thuringiensis* Berliner souche »Anduze«. *Entomophaga, Paris*, 4. 1959, 211—220.
- MARTOURET, D., Études préliminaires sur le mode d'action de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner vis à vis de *Pieris brassicae* L. *Verh. XI. int. Ent.kongr., Wien 1960.*
- MATTES, O., Parasitäre Krankheiten der Mehlmotten-Larven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologische Bekämpfungsmittel (Zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien). *Sitzungsber. Ges. Beförderung ges. Naturwiss., Marburg*, 62. 1927, 381—417.
- McCONNELL, E., The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects. *Diss. Abstr.* 18. 1958, 1220.

- McCONNELL, E., and CUTKOMP, L. K., Studies with *Bacillus thuringiensis* in relation to the European corn borer. J. econ. Ent. 47. 1954, 1074—1082.
- 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.
- McEWEN, F. L., and HERVEY, G. E. R., Microbial control of two cabbage insects. J. Insect Path. 1. 1959, 86—94.
- MENN, J. J., Bioassay of a microbial insecticide containing spores of *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Insect Path. 2. 1960, 134—138.
- METALNIKOV, S., Une épizootie chez les chenilles de *Galleria mellonella*. Compt. rend. Hdbdom. Acad. Sci. 175. 1922, 68—70.
- METALNIKOV, S., Utilisation des microbes dans la lutte contre *Lymantria* et autres insectes nuisibles. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 105. 1930, 535—537.
- METALNIKOV, S., Utilisation des spores dans la lutte contre les insectes nuisibles. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 125. 1937, 1020—1023.
- METALNIKOV, S., Utilisation des microbes dans la lutte contre les insectes nuisibles. Compt. rend. Acad. Agric. France 24. 1938, 652—660.
- METALNIKOV, S., and CHORINE, V., The infectious disease of *Pyrausta nubilalis* Hb. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 1. 1928, 41—69.
- METALNIKOV, S., and CHORINE, V., On the natural and acquired immunity of *Pyrausta nubilalis* Hb. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 2. 1929a, 22—38.
- METALNIKOV, S., and CHORINE, V., Experiments on the use of bacteria to destroy the corn borer. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 2. 1929 b, 54—59 (s. auch Ann. Inst. Pasteur, Paris, 43. 1929, 136—151; 1391—1395; 1657—1678).
- METALNIKOV, S., and CHORINE, V., On the infection of the gypsy moth and certain other insects with *Bacterium thuringiensis*. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 2. 1929 c, 60—61.
- METALNIKOV, S., ERMOLAEV, J., and SKOBALTZYN, V., New bacteria pathogenic to the larvae of *Pyrausta nubilalis* Hb. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 3. 1930, 28—36 (s. auch Ann. Inst. Pasteur, Paris, 46. 1931, 467—479).
- METALNIKOV, S., HERGULA, B., and STRAIL, D. M., Experiments on the application of bacteria against the corn borer. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 3. 1930, 148—151 (s. auch Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 191. 1930, 738—740).
- METALNIKOV, S., et METALNIKOV, S. S., Maladies des vers du coton (*Gelechia gossypiella* et *Prodenia litura*). Compt. rend. Acad. Agric. France 18. 1932, 203—207.
- METALNIKOV, S., 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., The formation of protein inclusions in *Bacillus thuringiensis*. Ph. D. Thesis, Univ. Cambridge (Abstr. in: J. gen. Microbiol. 1960).
- MÜLLER, O., Biologische Studien über den frühen Kastanienwickler *Pammene juliana* (Stephens) (*Lep.*, *Tortricidae*) und seine wirtschaftliche Bedeutung für den Kanton Tessin. Ztschr. angew. Ent. 41. 1957, 71—111.

- NORRIS, J. R., 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.
- OKA, I. N., (Laborversuche zur biologischen Bekämpfung von *Plutella maculipennis* Curt. mit *Bacillus thuringiensis* Berl.) Technik Pertanian, Bogor, 6. 1957, 113—114.
- PAILLOT, A., On the natural equilibrium of *Pyrausta nubilalis* Hb. Int. Corn Borer Invest., Sci. Rept. 1. 1928, 77—106.
- PASTEUR, L., Études sur la maladie des vers à soie (flacherie). Gauthier-Villars 1870.
- PETRUCHINA, M. T., (Untersuchung der Wirkung des Präparates »Entobakterin 3« auf *Hyponomeuta malinella*.) In: Biol. Methoden Schädl. bekämpfung, Kišinev 1958, 31—32.
- PETRUCHINA, M. T., (Untersuchungen über die Wirksamkeit eines Bakterienpräparates gegen Raupen der Apfelbaum-Gespinnstmotte in der Moldau-SSR.) In: Biol. Methode Bekämpfung Pfl. schäd. Ukrain. Akad. Landw. wiss., Kiev 1959, 101—105.
- POSPELOV, V. P., (Zusammenfassung wissenschaftlicher Forschungsarb. des Instituts für Pflanzenschutz i. J. 1935.) Lenin-Akad. Landw. wiss. 1936, 318—321.
- 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.
- RABB, R. L., STEINHAUS, E. A., and GUTHRIE, F. E., Preliminary tests using *Bacillus thuringiensis* Berliner against hornworms. J. econ. Ent. 50. 1957, 259—262.
- RIPPER, W. E., Effect of pesticides on balance of arthropod populations. Ann. Rev. Ent. (Calif.) 1. 1956, 403—438.
- SCHNEIDER, F., Beziehungen zwischen Nützlingen und chemischer Schädlingsbekämpfung. Verh. dtsh. Ges. angew. Ent. 13. Mitgl. vers. 1954. 1955, 18—29.
- SMITH, N. R., GORDON, R. E., and CLARK, F. E., Aerobic sporeforming bacteria. US Dept. Agric. misc. Publ. 559. 1946 (reissued as US Dept. Agric. Monograph nr. 16. 1952).
- STAFFORD, E. M., JENSEN, F. L., and KIDO, H., Control of the grape leaf folder in California. J. econ. Ent. 53. 1960, 531—534.
- STAPP, C., Pflanzenpathogene Bakterien. P. Parey, Berlin 1958, 259 S.
- STEIN, E., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1959.
- STEIN, W., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1959.
- STEINER, H., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1960.
- STEINHAUS, E. A., Principles of insect pathology. McGraw-Hill Publ., New York 1949, 757 p.
- STEINHAUS, E. A., Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. Hilgardia, Berkeley, 20. 1951a, 359—381.
- STEINHAUS, E. A., Report on diagnosis of diseased insects 1945—1950. Hilgardia, Berkeley, 20. 1951 b, 629—678.
- STEINHAUS, E. A., Pest control by bacteria; alfalfa caterpillar in field reduced to sub-economic levels within two days by bacillus applied as spray. Calif. Agric., Berkeley, 5. 1951 c, 5.
- STEINHAUS, E. A., Report on tests on the susceptibility of the rhinoceros beetle to certain entomogenous microorganisms. Pacific Sci. Board (hektogr.) 1951, 16 p.

- STEINHAUS, E. A., List of insects and their susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Berliner and closely related bacteria. Labor. Insect Path. Dent. Biol. Control Univ. California, Berkeley, Mimeogr. Ser. nr. 4. 1957 a, 24 p.
- STEINHAUS, E. A., Concerning the harmlessness of insect pathogens and the standardisation of microbial control products. J. econ. Ent. 50. 1957 b, 715—720.
- STEINHAUS, E. A., On the improbability of *Bacillus thuringiensis* Berliner mutating to forms pathogenic for vertebrates. J. econ. Ent. 52. 1959 a, 506—508.
- STEINHAUS, E. A., *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. Hilgardia, Berkeley, 28. 1959 b, 351—380.
- STEINHAUS, E. A., The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. J. Insect Path. 2. 1960 a, 225—229.
- STEINHAUS, E. A., Insect pathology: challenge, achievement, and promise. Bull. ent. Soc. Amer. 6. 1960 b, 9—16.
- STEINHAUS, E. A., On the correct author of *Bacillus sotto*. J. Insect Path. 3. 1961 (i. Druck).
- STEINHAUS, E. A., and BELL, C. R., The effect of certain microorganisms and antibiotics on stored-grain insects. J. econ. Ent. 46. 1953, 582—598.
- STEINHAUS, E. A., and JERREL, E. A., Further observations on *Bacillus thuringiensis* Berliner and other sporeforming bacteria. Hilgardia, Berkeley, 23. 1954, 1—23.
- STEPHENS, J. M., Immune responses of some insects to some bacterial antigens. Canad. J. Microbiol. 5. 1959, 203—228.
- STERN, V. M., HALL, I. M., and PETERSON, G. D., The utilisation of *Bacillus thuringiensis* Berliner as a biotic insecticide to suppress the alfalfa caterpillar. J. Insect Path. 1. 1959, 142—151.
- STUTE, K., unveröffentlicht; pers. Mitt. 1960.
- SUN, Y. P., Toxicity index — an improved method of comparing the relative toxicity of insecticides. J. econ. Ent. 43. 1950, 45—52.
- ŠVECOVA, O. J., (The biological character of some entomopathogenous bacteria and their practical use.) Trans. 1. int. Conf. Insect Path. biol. Control, Praha 1958 a. (1959), 105—107.
- ŠVECOVA, O. J., (Biologische Besonderheiten einiger entomophager Bazillen in Verbindung mit den in ihnen gebildeten kristallinen Einschlüssen.) In: Biol. Methoden Schädl.-bekämpfung, Kišinev 1958 b, 54—55.
- TADIĆ, M., and VASILJEVIĆ, L., Results of laboratory investigations of pathogenous effect of some bacteria upon *Carposapsa pomonella*. Zaštita Bilja (Plant Prot.), Beograd, nr. 38. 1956, 71—75.
- TALALAEV, E. V., (Septikämie der Raupen des sibirischen Arvenspinners.) Mikrobiologija, Moskva, 25. 1956, 99—102.
- TALALAEV, E. V., (Eine künstlich induzierte Epizootie der Septikämie von *Dendrolimus sibiricus*-Raupen.) Ent. Obozr. (Rev. Ent. USSR) 36. 1957 a, 845—859.
- TALALAEV, E. V., (Bakteriologische Bekämpfungsmethoden des sibirischen Arvenspinners (*Dendrolimus sibiricus*.) Lesn. Choz. (Forstw. UdSSR) 10. 1957 b, 36—37.
- TALALAEV, E. V., (Künstliche Induktion einer septikämischen Epizootie in Larven von *Dendrolimus sibiricus* (Tschetv.) (*Lep.*, *Lasiocampidae*.) Ent. Obozr. (Rev. Ent. USSR) 37. 1958 a, 641—652.

- TALALAEV, E. V., (Bakteriologische Bekämpfung von *Dendrolimus sibiricus*.) Trans. 1. int. Conf. Insect Path. biol. Control, Praha 1958 b. (1959), 51—57.
- TANADA, Y., Susceptibility of the imported cabbageworm *Bacillus thuringiensis* Berliner. Proc. hawaii. ent. Soc. 15. 1953, 159—166.
- TANADA, Y., Microbial control of imported cabbageworm. Hawaii Farm Sci. 4 (3). 1956 a, 6—7.
- TANADA, Y., Microbial control of some lepidopterous pests of crucifers. J. econ. Ent. 49. 1956 b, 320—329.
- TANADA, Y., 1957, zit. nach STEINHAUS 1957.
- TANADA, Y., and REINER, C., Microbial control of the artichoke plume moth, *Platyptilia carduidactyla* (Riley) (Pterophoridae, Lepidoptera). J. Insect Path. 2. 1960, 230—246.
- THORNE, C. B., MOLNAR, D. M., and STANGE, R. E., Production of toxin in vitro by *Bacillus anthracis* and its separation into two components. J. Bact., Baltimore, 79. 1960, 450—455.
- TOMPSON u. LOGAN, 1955, zit. nach HALL 1955.
- TOUMANOFF, C., Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 85. 1953, 90—98.
- TOUMANOFF, C., L'action de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago sur les chenilles de *Galleria mellonella* L. et *Hyponomeuta cognatella* Hb. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 86. 1954 a, 570—579.
- TOUMANOFF, C., À propos d'un caractère différentiel de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago, agent pathogène de la flacherie infectieuse des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 87. 1954 b, 486—493.
- TOUMANOFF, C., Au sujet de souches cristallophores entomophytes de *cereus*. Observations sur leurs inclusions cristallines. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 89. 1955 a, 644—653.
- TOUMANOFF, C., Étude comparative de la souche toxigène de *Bacillus cereus* var. *sotto* (Ishiwata) agent pathogène de la flacherie des vers à soie au Japon. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 88. 1955 b, 384.
- TOUMANOFF, C., La lutte bactériologique contre les larves nuisibles de lépidoptères. Choix d'une souche. Trans. 1. int. Conf. Insect Path. biol. Control, Praha 1958. 1959, 65—71.
- TOUMANOFF, C., et Le CORROLLER, Y., Contribution à l'étude de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. cristallophores et pathogènes pour les larves de lépidoptères. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 96. 1959, 680—688.
- TOUMANOFF, C., et GRISON, P., Études préliminaires sur l'utilisation des bactéries et champignons entomophages contre les insectes nuisibles. Compt. rend. Acad. Agric. France 40. 1954, 277—280.
- TOUMANOFF, C., et MALMANCHE, L., Virulence expérimentale d'une souche banale de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. pour les chenilles de *Galleria mellonella* L. et *Pieris brassicae* L. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 90. 1956, 660—665.
- TOUMANOFF, C., et LAPIED, M., L'effet des antibiotiques sur les souche entomophytes ou non de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 87. 1954, 370.

- TOUMANOFF, C., LAPIED, M., et MALMANCHE, L., Au sujet de souche crstallophores entomophytes de *cereus*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 89. 1955, 644—653.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., L'agent pathogène de la flacherie des vers à soie endémique dans la région des Cévennes: *Bacillus cereus* var. *alesti*, var. nov. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 233. 1951, 1504.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., Essais comparatifs sur la virulence pour *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera*) de divers bacillus entomophytes du groupe *cereus*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 83. 1952 a, 634—639.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., La nature de l'affection des vers à soie due à *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago, et les modalités d'action de ce bacille. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 83. 1952 b, 421—422.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., L'effet de l'alcalinité du milieu de culture sur la virulence de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago, pour les vers à soie. Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 235. 1952 c, 1715—1717.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., Recherches sur l'effet toxique de *Bacillus cereus* var. *alesti* vis-à-vis des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 84. 1953 a, 623—628.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., Étude histopathologique des vers à soie atteints de *Bacillus cereus*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 84. 1953 b, 376—386.
- TOUMANOFF, C., et VAGO, C., Sur la virulence vis-à-vis du vers à soie de quelque *cereus* entomophytes en tant que test de comparaison. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 88. 1955, 388—392.
- TOUMANOFF, C., VAGO, C., et GLADILLINE, C., Recherches sur l'effet toxique de *Bacillus cereus* var. *alesti* vis-à-vis des vers à soie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 86. 1954, 438—445.
- TSAO, C., CHIA, P. H., and LIN, P. H., (Top-dressing of spore suspension of *Bacillus thuringiensis* to corn leaf whorls as a measure of biological control of the corn borers (*Pyrausta nubilalis*)). Acta ent. Sinica 5. 1955, 349—350.
- UNTERSTENHÖFER, G., Über die Bestimmung des Giftwertes (Toxizitätsgrades) von Kontaktinsektiziden. Ztschr. Pfl.krankh. 60. 1953, 26—36.
- VAGO, C., Bactériémie de Cigale: *Cicada plebeia*. Bull. Soc. zool. France, Paris, 76. 1951 a, 383—386.
- VAGO, C., »La flacherie endémique de Cévennes« et ce qu'elle représente dans la série-culture cénevole. Compt. rend. Acad. Agric. France (Extr. Proc.-verbal Séance 28. 11.) 1951 b.
- VAGO, C., L'enchaînement des maladies chez les insectes. Recherches expérimentales en pathologie comparée. Ann. Inst. nat. Rech. agron. (C) 10. 1959, nr. hors Sér., 1—181.
- VAGO, C., et BUSNEL, M. C., Discrimination entre l'inactivation de la virulence et du développement bactériens par le rayonnement ultraviolet de 2537 Å (Étude sur *Bacillus cereus alesti* Tou. et V.). Experimentia, Basel, 8. 1952, 106—109.
- VAŇKOVÁ, J., Study on the effect of *Bacillus thuringiensis* on insects. Folia biologica, Praha, 3. 1957, 175—182.
- VAŇKOVÁ, J., (Studien der Wirkung von *Bacillus thuringiensis* auf Insekten.) Čsl. biologie 6. 1957, 114—120.
- VAŇKOVÁ, J., (Kultivierung von *Bacillus thuringiensis* im Versuchsbetriebsmaßstab.) Trans. 1. int. Conf. Insect Path. biol. Control, Praha, 1958. 1959, 59—63.

- VANĀKOVÁ, J., Spezifität des *Bac. thuringiensis* gegenüber einigen Stechmücken. Verh. XI. int. Ent.kongr., Wien 1960.
- VASILJEVIĆ, L. A., (Pathogenic effect of some species of bacteria on the fall webworm (*Hyphantria cunea* Drury).) Mem. Inst. Plant Prot., Beograd, nr. 7. 1957, 79 p.
- WEISER, J., 1957, zit. nach VANĀKOVÁ 1957.
- WEISER, J., and VEBER, J., (The possibilities of biological control of the fall webworm (*Hyphantria cunea* Drury).) Zool., ent. Listy (Folia Zool., ent.), Brno, 3. 1954, 55—68.
- WIEGAND, H., Der Wirkungsbereich von *Bacillus thuringiensis* Berliner. Tagungsber. Nr. 29 dtsh. Akad. Landw.wiss. Berlin (Wiss. Sitzung der BZA Berlin, 16. 12. 59).
- WIEGAND, H., unveröffentlicht, pers. Mitt. 1960.
- YODER, P. E., and NELSON, E. L., Bacteriophage for *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Bacillus anthracis* Cohn. J. Insect Path. 2. 1960, 198—200.
- YORK, G. T., Control of the European corn borer with the fungus, *Beauveria bassiana* and the bacterium *Bacillus thuringiensis*. Ph. D. thesis, Iowa State Coll. 1958.
- YORK, G. T., 1960, zit. nach BRIGGS 1960.
- YOUNG, E., Chemical and morphological changes during sporulation in variants of *Bacillus cereus*. Ph. D. thesis, Univ. West. Ontario 1958.
- 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.
- YOUNG, I. E., and FITZ-JAMES, P. C., 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—505.
- ZERNOFF, V., Microbes virulentes pour les chenilles (*Galleria mellonella* et *Pyrausta nubilalis*). Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 106. 1931, 543—546.
- ZERNOFF, V., Sur l'infection et l'immunité chez *Carausius (Dixippus) morosus*. Compt. rend. Soc. Biol., Paris, 111. 1932, 385—386.
- ZWARTOUW, H. T., and SMITH, H., Non-identity of the phospholipase of *Bacillus anthracis* with the Anthrax toxin. J. gen. Microbiol. 15. 1956, 261—265.