

## Ein Test zur Prüfung der Wirksamkeit insektizider Substanzen und ein Beitrag zum Mechanismus der Wirkung von DDT und HCC

Von PETER N. WITT

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. 2 b, 361—366 [1947]; eingegangen am 22. April 1947)

Die Zucht von *Calliphora erythrocephala* und ein mit diesen Fliegen durchgeführter Test zur Bestimmung der Wirksamkeit insektizider Substanzen werden beschrieben. Hierbei wird der eben ausgewachsenen Fliege die Substanz, gelöst in 0,001 bis 0,002 ccm absol. Alkohol, so aufgetropft, daß volle Wirksamkeit percutan gewährleistet erscheint. Die mit dieser Methode durchgeführte Testung der Organe DDT-vergifteter größerer Tiere (Frosch und Maus) ergibt die geringste Giftigkeit des Gehirnextraktes gegenüber Leber, Lungen, Milz, Nieren und Muskulatur. Versuche an Maden, Puppen und Fliegen zeigen die verschiedene Wirksamkeit von DDT und HCC in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Fliege, und durch sie wird wahrscheinlich gemacht, daß das DDT und HCC nicht in wirksamer Menge durch die dicken Chitinplatten, sondern durch Gelenkspalten, Sinnesorgane und Stigmen der Insekten eindringt. Endgültige Klarheit konnte hierbei nicht erzielt werden.

Zum Vergleich der Wirksamkeit und zur Erforschung der Wirkungsweise insektizider Substanzen, insbesondere von DDT und HCC, gab es bisher kein befriedigendes Testverfahren. Den von L ä u g e r<sup>1</sup> erwähnten Test nach Wiesmann fand ich nirgendwo näher ausgeführt, während der von Emmel und Krüpe<sup>2</sup> angegebene ungenau ist. Wenn man, wie dort angegeben, Fliegen über ein vergiftetes Deckgläschen laufen läßt, so läßt sich infolge der Verschiedenheit von Geschwindigkeit, Schrittzahl und Weglänge nicht angeben, welche Menge insektizider Substanz hierbei eigentlich eine Fliege bekommen hat. Im Gegensatz dazu versucht der hier beschriebene Test, Fliegen eine genau bestimmte Menge Substanz beizubringen und ihre Sterblichkeit als Maß für die Wirksamkeit zu nehmen. Er ist auch genügend genau, um eine unbekannte Menge giftiger Substanz in Organextrakten von Tieren zu bestimmen und damit die Angaben von Domenjoz<sup>3</sup> nachzuprüfen, der den Angriffspunkt von DDT an dem von Tonner<sup>4,5</sup>, von Buddenbrock<sup>6</sup> und Bethe<sup>7</sup> beschriebenen peripheren Ganglienzellsystem vermutet.

Nach Fränkel und Rudall<sup>8</sup>, Wiesmann<sup>9</sup>, Hoop<sup>10</sup> und Kühnelt<sup>11</sup> besteht kein prinzipieller Unterschied in der Zusammensetzung der Cuticula von Puppen und Fliegen. Dagegen ist die Haut der Fliegen durch zahlreiche Gelenke, Sinnesorgane und Stigmen unterbrochen, während die Puppe von einem gleichmäßigen Panzer umgeben ist. Ein Unterschied in der Wirksamkeit daraufgetropfter Substanz bei Puppe und Fliege könnte danach in der Verschiedenheit der Körperdecke oder in der verschiedenen Ausbildung einzelner Organe in den Entwicklungsstadien der Fliege liegen. Der Unterschied wurde tatsächlich gefunden, nur reichte die Zahl der Versuche noch nicht aus, um endgültige Schlüsse daraus zu ziehen. Weitere Versuche in dieser Richtung sind im Gange.

### I. Die Fliegen: Arten, Zucht, Durchschnittsgewicht, Sterblichkeit

Gearbeitet wurde mit *Calliphora erythrocephala*, *Lucilia caesar* und *Phormia*, wobei sich *Calliphora* als die geeignetste Art sowohl für die Zucht als auch für den Test erwies, so daß sich die Angaben hauptsächlich auf diese beziehen.

<sup>1</sup> P. L ä u g e r, H. Martin u. P. Müller, Helv. chim. Acta 27, 892 [1944]; vergl. auch A. Mylius u. H. Koechlin, Helv. chim. Acta 29, 405 [1946].

<sup>2</sup> L. Emmel u. M. Krüpe, Z. Naturforschg. 1, 691 [1946].

<sup>3</sup> R. Domenjoz, Schweiz. med. Wschr. 36, 952 [1944].

<sup>4</sup> F. Tonner, Z. vergl. Physiol. 19 IV, 762 [1933].

<sup>5</sup> F. Tonner, Zool. Jb. 53, 101 [1933].

<sup>6</sup> B. von Buddenbrock, Grundriß d. vergl. Physiol., Berlin 1928.

<sup>7</sup> A. Bethe, Anat. Anz. 12, 31 [1886].

<sup>8</sup> G. Fränkel u. Rudall, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B 129, 1 [1940].

<sup>9</sup> R. Wiesmann, Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich 83 (II), 127 [1938].

<sup>10</sup> M. Hoop, Zoolog. Jb. Anat. 57, 438 [1933].

<sup>11</sup> W. Kühnelt, Zoolog. Jb. Anat. 50, 219 [1928/29].

Eier bzw. Embryonen wurden für die Zucht auf folgende Weise gewonnen: Entweder wurden Fleischstückchen in die Sonne gestellt, wobei nach wenigen Stunden bereits mehrere Gelege darauf waren, allerdings meist von verschiedenen Arten. Besser war es, nach Romeis<sup>12</sup> und Fränkel<sup>13</sup> selbstgezeugene Fliegen in einen durch eine Kohlenfadenlampe erleuchteten und geheizten Kasten zu setzen. Die Fütterung erfolgte mit Fleisch und Zuckerwasser; die Fliegen hatten wenige Tage nach dem Schlüpfen ihre Eier auf dem Fleisch abgelegt. Das Schlüpfen der Maden erfolgte nach wenigen Stunden bis Tagen, wobei zeitlich, ebenso wie bei der weiteren Entwicklung, keine Gleichmäßigkeit zu erzielen war.

In dem Fleisch wuchsen die Maden in 3—5 Tagen zur endgültigen Größe heran; die Menge des gegebenen Fleisches spielt eine wesentliche Rolle für das Gedeihen der Tiere. Zu wenig Fleisch ergab kleinere Tiere, die sich schwerer verpuppten, wobei eine große Zahl abnorm kleiner Puppen beobachtet wurde. Zu viel Fleisch dagegen brachte die Gefahr mit sich, daß die Maden darin erstickten. Es hatte sich in bezug auf Luftzufuhr und Raum bewährt, das Fleisch in einer nach Größe des Geleges ausreichenden Menge (man hat diese mit der Zeit im Gefühl) in einem flachen Pergamentschälchen auf einen Teller zu stellen, der mit einer Glasglocke bedeckt wurde. Wenn die Maden das Fleisch verließen und einem dunklen und trockenen Ort zustrebten, setzte man sie in eine Petrischale mit Zellstoff, in der sich die ersten Tiere nach 5—7 Tagen verpuppten.

Aus dem Zellstoff wurden die verpuppten Tiere täglich herausgesucht. Es bewährte sich auch das Ausschütten der Puppen und Maden auf ein an einer Seite belichtetes Blech. Die Maden krochen dann vom Licht weg und die Puppen blieben unter der Lampe liegen. Sie kamen in Petrischalen, die mit Filtrierpapier ausgelegt waren, und blieben darin bis zum Schlüpfen, wobei täglich 1 Stde. gelüftet wurde. Zu viel Feuchtigkeit machte sich durch Schimmelbildung bemerkbar, während Austrocknung, zu erkennen an Glanzlosigkeit und Härte, durch Einlegen von feuchtem Zellstoff vermieden werden konnte. Bei 20° C und optimaler Feuchtigkeit schlüpften die Fliegen nach 10—11 Tagen; dasselbe Gelege lieferte im allgemeinen etwa 4 Tage lang schlüpfende Fliegen. Es gelang nie, alle Fliegen eines Geleges am selben Tage zum Schlüpfen zu bringen; gleichlautende Angaben finden sich bei Romeis<sup>12</sup>, Fränkel<sup>13</sup> und Uvarov<sup>14</sup>.

Nach 1 bis höchstens 3 Stdn. waren die geschlüpfen Fliegen ausgefärbt, die Flügel hatten sich zur vollen Größe entfaltet und auch der Körper hatte im wesentlichen seine endgültige Form angenommen. Dieser Zeitpunkt scheint der günstigste zum Ansetzen des Tests zu sein, da die jüngeren Tiere durch die Äthernarkose in ihrer Entwicklung gehemmt werden, wenn diese sie direkt nach dem Schlüpfen mit noch zusam-

mengefalteten Flügeln überrascht, während man bei älteren Tieren niemals weiß, wie lange sie überhaupt noch gelebt hätten, was bei Versuchen, die sich über mehrere Tage erstrecken, eine Fehlerquelle bedeuten kann.

Als besonders wichtig für die Fliegenzucht sind noch Temperatur und Licht zu erwähnen. Für die Zeit der Entwicklung der Maden spielt die Temperatur eine wesentliche Rolle; die Zeit der Verpuppung ist davon abhängig. Man kann z. B. durch Herabsetzen der Temperatur bis wenig über 0° C die Entwicklung um Wochen und sogar Monate verzögern. Fernerhin nimmt bei Temperaturen unter 15° C die Zahl der auskriechenden Maden wesentlich ab, die Maden wachsen langsamer heran und sterben leichter. Bei den Puppen wird die Zeit bis zum Schlüpfen verlängert. So gelang es einmal bei Aufbewahrung der Puppen bei 1° C, ihr Schlüpfen 2 Monate lang zu verhindern, während dann ein großer Teil sich nach Verbringen in das warme Zimmer normal weiter entwickelte. Die erwachsenen Fliegen sind bei niedrigerer Temperatur wesentlich träger und weniger widerstandsfähig.

Bei den Fliegen spielt genügendes Licht eine große Rolle, während die Maden es fliehen und die Puppen, nach meinen Beobachtungen, gleichgültig dagegen zu sein scheinen. So konnten die Fliegen im geheizten Zimmer ohne künstliches Licht nicht zur Eiablage gebracht werden; ebenso legten sie im unbeleuchteten Brutschrank keine Eier. Es scheint eine mindeste Tageslänge und ein bestimmter Helligkeitsgrad erforderlich zu sein, wie auch aus den Arbeiten von Uvarov<sup>14</sup> hervorgeht.

Um die wirksame Dosis eines zu prüfenden Stoffes errechnen zu können, mußte das Durchschnittsgewicht einer Fliege bestimmt werden. Es lag bei diesen Versuchen bei Mischung ganz verschiedener Größen und Fliegenarten bei 16—32 mg, bei der ausschließlichen Verwendung von *Calliphora* liegt es höher.

Die Sterblichkeit unvergifteter Fliegen mußte festgestellt werden, da sie ohne Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr im Glas gehalten werden. Deshalb wurden Leerversuche mit narkotisierten und mit absolutem Alkohol betropften Fliegen nebenher gemacht, wobei übereinstimmend an verschiedenen Tagen nach 24 Stdn. eine Durchschnittsterblichkeit von 1% gefunden wurde, nach 48 Stdn. von ca. 6%, nach 72 Stdn. von ca. 8% und endlich nach 4 Tagen von ca. 12,5%. Diese Zahlen scheinen im Gegensatz zu denen im Test gefundenen so niedrig zu liegen, daß sie bei der Auswertung, die im allgemeinen nach 24 bis 48 Stdn. erfolgte, nicht berücksichtigt zu werden brauchen.

## II. Der Test

Zur Testung zwecks Errechnung der LD 50 (Dosis letalis für 50% der Tiere)<sup>15</sup> für insektizide Substan-

<sup>12</sup> B. Romeis u. L. von Dobkiewicz, Arch. Entw. Mech. Org. 47, 119 [1920].

<sup>13</sup> G. Fränkel, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B 118, 1 [1938].

<sup>14</sup> B. P. Uvarov, Trans. entomol. Soc. London 79 [1931].

<sup>15</sup> J. H. Burn, Biolog. Auswertungsmethoden (Übers. Büllbring), Berlin 1937.

Substanz	Dosis in $\gamma$	Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.			nach 48 Stdn.			LD <sub>50</sub> in $\gamma$ für 1 g Tier nach 24 Stdn.
			% Tote	dopp. mittl. F.	LD <sub>50</sub> in $\gamma$	% Tote	dopp. mittl. F.	LD <sub>50</sub> in $\gamma$	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HCC- $\gamma$ -Standard .	0,01	61	36	18,2	} 0,015	43	18,8	} 0,013	} 0,58
HCC- $\gamma$ -Standard .	0,02	34	62	28,2		66	30		
HCC $\gamma$ . . . . .	0,2	44	49	20	} 0,205	71,5	28	} 0,15	} 8,33
HCC $\gamma$ . . . . .	0,1	20	30	38,4		30	38,4		
DDT . . . . .	0,1	43	28	36	} 0,215	38	36	} 0,187	} 9,0
DDT . . . . .	0,2	28	40	49		42,5	50		
Veratrin . . . . .	40	13	51	29,6	} 39,0	62	23,6	} 26,0	} 1,5 mg
Veratrin . . . . .	20	10	30	60		50	20		
Chloralhydrat . .	40	21	44	30,4	45,6	53	35,4	37,7	1,897 „

Tab. 1. Wirkung verschiedener insektizider Stoffe auf Fliegen.

zen wurden nur ausgewachsene Fliegen am Tage des Schlüpfens verwendet. Durch einen in das Glas gelegten Äthertupfer wurden sie betäubt. Die zu prüfende Substanz wurde im allgemeinen in absol. Alkohol gelöst und davon 0,001—0,002 ccm/Tier in Rückenlage aufgetropft, um schnelle Ausbreitung auf der Körperoberfläche, möglichst rasches Eindringen und ein Vermeiden von Substanzverlusten auf der Unterlage zu erreichen. Absoluter Alkohol war besonders geeignet, da er alle verwendeten Stoffe löst, leicht tropfbar ist und die Lebensdauer der Fliegen nicht wesentlich beeinträchtigt (siehe I.). Trotzdem wurde zu jedem Versuch parallel ein Leerversuch mit der gleichen Anzahl Fliegen gemacht, die auch zuerst mit Äther betäubt wurden und die dann die entsprechende Menge Alkohol auf die Bauchseite getropft bekamen (die Menge des Alkohols spielte keine Rolle). Die durch die Betäubung bewegungslos gewordenen Fliegen wurden in Erlenmeyerkölbchen gebracht, die mit Zellstoff lose verschlossen waren; hier wurden sie nach  $\frac{1}{2}$  Stde. wieder munter.

Bei hohen Dosen DDT konnte man gleich beim Wiederbeginn der Bewegungen Vergiftungserscheinungen beobachten, während man eben noch giftige Dosen nur an erhöhter Sterblichkeit nach 24 bzw. 48 Stdn. beobachten konnte. Dosen dazwischen machten zuerst deutliche Vergiftungserscheinungen, zeigten dann aber wieder völlige Erholung der Tiere, die wenige Stunden später starben.

Es wurde nun die Zahl der toten Tiere überhaupt gezählt, wie auch der zeitliche Ablauf der Vergiftung beobachtet; dabei wurden die gleichen Versuche jedesmal an verschiedenen Tagen angesetzt, um den Einfluß des Klimas möglichst auszuschalten. Dann wurde der Prozentsatz toter Fliegen nach 24 und 48 Stdn. errechnet und zur Verdeutlichung des Genauigkeitsgrades des Ergebnisses der doppelte mittlere Fehler dazugeschrieben. Dieser läßt sich aus der Summe der Quadrate der Einzelabweichungen berechnen; er ist bei der kleinen Menge von Versuchstieren sehr hoch. Er zeigt bei den unter III aufgeführten Tabellen, daß sie lediglich orientierenden Wert haben und nicht als beweisend gelten können.

Schließlich wurde die LD<sub>50</sub> errechnet, indem das Mittel aus je einem Versuch mit einer größeren und einer kleineren Dosis genommen wurde.

Die gewonnenen Ergebnisse gehen aus den Tabellen in III und aus noch (gemeinsam mit Zeh) in Arbeit befindlichen Versuchsreihen hervor.

### III. Experimenteller Teil

Mit dem in II beschriebenen Test wurde als erstes rein kristallisiertes DDT (*Dichlordiphenyl-trichlor-methyl-methan*), dann die sogenannte  $\gamma$ -Form des HCC (*Hexachlor-cyclohexan*), ein zweites gereinigtes Produkt der  $\gamma$ -Form mit der Bezeichnung HCC- $\gamma$ -Standard, *Chloralhydrat* und *Veratrin* auf ihre Wirksamkeit untersucht. Einige andere Substanzen, die sich in den verwendeten höchsten Dosen von 40  $\gamma$ /Tier als unwirksam erwiesen, will ich nur aufzählen; es sind dies: Strychnin, Aconitin, Colchicin, Coniin, Arsenik, Phenol, Scopolamin, Brucia, Physostigmin, Picrotoxin, Hyoscyamin, Pilocarpin, Thebain, Morphin, Lobelin, Apomorphin, Veronal, Sulfonal, Thymol und Campher.

Über die Höhe der tödlichen Dosis gibt die Tab. 1 einen annähernden Aufschluß, wenn auch die Zahl der Fliegen zu klein war, um genaue Angaben machen zu können.

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß das HCC- $\gamma$ -Standard bei weitem am wirksamsten ist, und zwar brauchte man für 1 g Tier 0,58  $\gamma$  Substanz, um 50% der Tiere in 24 Stdn. zu töten. Die Wirksamkeit des DDT in kristalliner, reiner Form ist etwa  $\frac{1}{10}$  so stark; sie liegt zwischen 1 und 7  $\gamma$ . Die Ergebnisse schwanken außerordentlich und weitere Versuche sollen die Frage klären, wieweit das Alter der alkoholischen Lösung dabei eine Rolle spielt. In eine ganz andere Größenordnung der Wirkung kommen wir beim Veratrin und Chloralhydrat, wo 1,4 mg bis 1,9 mg für 1 g Tier nötig sind, um 50% zu töten. In den Spalten 5 und 8 steht der doppelte mittlere Fehler, der das Maß von Genauigkeit bei den verwendeten kleinen Zahlen von Versuchstieren angeben soll. Er ist teilweise sehr hoch, weshalb noch größere Versuchsreihen in Arbeit

sind. Die Zahlen toter Fliegen im parallel verlaufenden Leerversuch liegen immer deutlich unter den Zahlen der vergifteten Tiere; wegen ihrer Kleinheit brauchen sie nicht berücksichtigt zu werden. Die tödliche Dosis für 1 g Tier habe ich auf ein bei diesen Versuchen gefundenes Durchschnittsgewicht von 24 mg/Fliege bezogen.

In einer anderen Versuchsreihe wurden größere Tiere, Frösche und Mäuse, mit hohen Dosen DDT vergiftet. Die Angaben von Mooser<sup>16</sup>, daß bei percutaner Applikation dort die tödliche Dosis wesentlich höher liegt (mehr als 100-fach höher), konnte ich, besonders bei Mäusen, bestätigen; ich ging deswegen zur subcutanen Applikation über. Die toten Tiere wurden seziiert und die Organe (Herz, Lungen, Nieren, Milz, Leber, Muskulatur und Gehirn) mehrere Tage lang im Brutschrank getrocknet. Dann wurden sie zerstoßen und mit Aceton extrahiert, wie es L ä u g e r<sup>17</sup> als Methode von Wiesmann andeutet. Die eingehende Beschreibung in der Originalarbeit von Wiesmann war mir leider nicht zugänglich. Der Aceton-Extrakt wurde wieder eingedampft und der trockene Rückstand in 1 ccm absol. Alkohol gelöst und Fliegen in der Menge von 0,002 ccm aufgetropft. Er erwies sich, im Gegensatz zu dem Extrakt aus den

<sup>16</sup> H. Mooser, Schweiz. med. Wschr. 74, 947 [1944].

<sup>17</sup> P. Läger, R. Pulver u. C. Montigel, Helv. physiol. Acta 3, 405 [1945].

Organen gesunder Tiere, als sehr giftig. Über die gefundenen Werte geben die Tabellen 2a, b und c am besten Auskunft.

Die Zahlen der zum Test verwendeten Fliegen sind zu klein, um aus dem Ergebnis sichere Schlüsse ziehen zu können; es scheint mir aber auf Grund der deutlich erkennbaren Unterschiede doch möglich zu sein, einiges mit Wahrscheinlichkeit herauszulesen. Tab. 2a zeigt, daß sich im Gehirn am wenigsten Gift befindet, was auch Tab. 2b bestätigt, während unter den anderen Organen keine so deutlichen Unterschiede

Organ	Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.		nach 48 Stdn.	
		tot	% tot	tot	% tot
Herz . . . .	10	10	100		
Lungen . .	10	10	100		
Nieren . . .	10	10	100		
Milz . . . .	10	10	100		
Leber . . . .	10	10	100		
Muskulatur	10	10	100		
Gehirn . . .	13	3	23	3	23
Leerversuch	13	0	0	3	23

Tab. 2a. Ein Frosch bekam 0,5 ccm einer konz. alkoholischen DDT-Lösung in das Sitzwasser, der Tod erfolgte nach 2 Tagen. Der Extrakt jedes Organes wurde in je 1 ccm absol. Alkohol gelöst, davon jeder Fliege 0,002 ccm aufgetropft.

Organ	vergifteter Frosch					Vergleichsfrosch				
	Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.		nach 48 Stdn.		Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.		nach 48 Stdn.	
		tot	% tot	tot	% tot		tot	% tot	tot	% tot
Herz . . . . .	5	3	60	3	60	5	1	20	1	20
Lungen . . . . .	10	2	20	2	20	10	0	0	0	0
Nieren . . . . .	5	5	100			5	1	20	1	20
Milz . . . . .	10	2	20	2	20	5	0	0	0	0
Leber . . . . .	10	10	100			10	4	40	5	50
Muskulatur . . . .	11	10	91	10	91	12	3	25	4	33
Gehirn . . . . .	25	4	16	4	16	24	3	12,5	3	12,5

Tab. 2b. Ein Frosch bekam 18 mg des HCC- $\gamma$ -Standard in den Brustlymphsack; ein Vergleichsfrosch wurde durch Dekapitation getötet. Die Organe wurden in der angegebenen Weise extrahiert und, in je 1 ccm absol. Alkohol gelöst, jeder Fliege 0,002 ccm aufgetropft.

Organ	5-mg-Maus					2-mg-Maus				
	Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.		nach 48 Stdn.		Zahl der Fliegen	nach 24 Stdn.		nach 48 Stdn.	
		tot	% tot	tot	% tot		tot	% tot	tot	% tot
Herz . . . . .	8	5	62,5	7	87,5	8	2	25	5	62,5
Lungen . . . . .	5	2	40	5	100	5	0	0	0	0
Nieren . . . . .	8	3	37,5	6	75	5	0	0	1	20
Milz . . . . .	8	5	62,5	6	75	5	0	0	1	20
Leber . . . . .	5	0	0	1	20	5	0	0	1	20
Muskulatur . . . .	5	1	20	2	40	5	0	0	0	0
Gehirn . . . . .	3	1	33	2	66	3	1	33	3	100
Leerversuch . . . .	7	0	0	1	14	5	1	20	2	40

Tab. 2c. Eine Maus bekam 5 mg DDT subcutan, eine zweite 2 mg DDT subcutan; Extraktion wie oben, Lösung in absol. Alkohol und Betropfen jeder Fliege mit 0,002 ccm.

hervorstechen, daß man von einer Anreicherung irgendwo sprechen könnte. Das kleine Zahlenmaterial läßt weitere Versuche in dieser Art wünschenswert erscheinen. Tab. 2b zeigt zum Vergleich die Auswertung eines vergifteten und eines gesunden Frosches, wobei die Zahlen bei dem gesunden Frosch jedesmal deutlich unter denen des vergifteten liegen, was dafür spricht, daß die Giftwirkung auf DDT oder einem Abbauprodukt desselben beruht. In Tab. 2c werden 2 Mäuse verglichen, die verschiedene Dosen bekommen haben; der Unterschied bei der Giftigkeit der Organextrakte zeigt die Abhängigkeit der DDT-Konzentration in den Organen von der gegebenen Menge, zeigt aber auch gut die Brauchbarkeit des Tests zur quantitativen Bestimmung insektizider Substanzen.

Weitere Versuche machte ich vergleichend an Maden, Puppen und ausgewachsenen Fliegen. Ich hoffte, aus der verschiedenen Wirksamkeit in den verschiedenen Entwicklungsstadien etwas über den Mechanismus des Eindringens, des Angriffspunktes und der Wirkungsweise aussagen zu können. Die Substanzen wurden hier, wenn nicht anders angegeben, wie bei den erwachsenen Fliegen aufgetropft.

Bei den *Maden* konnte ich in mehreren Versuchsreihen mit DDT und den zwei verschiedenen HCC in Dosen bis zu 10  $\gamma$ /Tier keine Wirksamkeit feststellen; nach 10–11 Tagen war bei den behandelten und bei den Kontrolltieren nicht eines gestorben. Dagegen starben die Maden bei der Behandlung mit kristallisiertem DDT innerhalb von 4 Tagen im Gegensatz zu den mit Talkum behandelten Kontrolltieren.

Bei *Puppen* wurde DDT bis zu 10  $\gamma$ /Tier aufgetropft, wonach ebenso viele umverehrt schlüpften wie bei den mit absol. Alkohol betropften Kontrollen. Der Nachweis, daß keine wirksamen Mengen in das Tier eindringen, wurde dadurch geführt, daß Puppen, aus der vergifteten Hülle genommen, für daraufgesetzte Fliegen ungiftig waren. Andererseits starben Fliegen, die auch nach längerer Zeit auf die vergiftete Hülle gesetzt wurden, was anzeigt, daß das DDT noch vorhanden war. Es bleibt noch die Möglichkeit, daß kleinere Mengen in das Tier eindringen und dort sofort entgiftet werden, worüber diese Versuche nichts aussagen.

Wenn man das Gift unter die Puppenhülle injizierte (ich verwendete je 10  $\gamma$  in 50-proz. alkohol. Lösung), so hing die Sterblichkeit wesentlich von der Injektionsstelle ab. Bei Einstich am Hinterende der Puppe war die Sterblichkeit nicht wesentlich höher als bei der Injektion von 50-proz. Alkohol an derselben Stelle, wobei das Gift wahrscheinlich in den Exuvialraum<sup>18</sup> gelangte. Die Gabe in die Körpermitte hatte das Sterben aller Tiere wie auch der Vergleichstiere zur Folge. Hier wäre noch die Ausarbeitung einer möglichst schonenden Injektionsmethode notwendig.

Aus diesen Versuchen ergibt sich folgendes: DDT, in 50-proz. alkohol. Lösung auf Puppen aufgetropft und am Körperende injiziert, ist bis zu der verwen-

ten Menge von 10  $\gamma$ /Tier ungiftig, wird auch zum mindesten nicht vollständig von der Puppe entgiftet, wie daraufgesetzte Fliegen zeigen. Bei der Injektion in die Körpermitte, wobei wahrscheinlich das Tier selbst angestochen wird, wirken bereits 0,002 cem 50-proz. Alkohols tödlich, so daß ein Vergleich mit DDT sinnlos ist.

Um die Wirkung an *isolierten Fliegenbeinen* zu beobachten, wurden vergleichende Untersuchungen mit kristallinem DDT und in absol. Alkohol gelöstem, ebenso mit NaCl-Kristallen und NaCl-Lösungen gemacht. Kristallisiertes NaCl, auf ein isoliertes Fliegenbein gestreut, verursachte Zuckungen, die sich nicht von den durch DDT hervorgerufenen unterschieden. Dagegen konnten mit alkoholischer DDT-Lösung Zuckungen hervorgerufen werden, die sich mit NaCl-Lösungen nicht nachmachen ließen. Das Halten über eine Ätherflasche unterbrach die Bewegungen, wie bereits bei Domenjoz<sup>3</sup> angegeben. Wenn man Beine kurz nach der Vergiftung der Brust der Fliege amputiert (nach 30 Sek.), nachdem man darauf geachtet hat, daß die Beine nicht von der Lösung benetzt worden sind, so beginnen sie allein nicht zu zucken; nach Beginn der Zuckungen amputiert, bewegen sie sich weiter.

#### IV. Histologie

Ein weiterer Versuch, Aufschluß über die Wirkungsweise des DDT zu bekommen, wurde auf histologischem Wege unternommen. Sowohl gesunde als auch vergiftete Maden, Puppen und Fliegen wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt; unter dem Mikroskop wurde besonders das Zentralnervensystem verglichen.

Zur Fixierung bewährte sich jedesmal frisch bereitete, 60° C warme Carnoy-Lösung, die aus 6 Tln. absol. Alkohol, 3 Tln. Chloroform und 1 Tl. Eisessig gemischt wurde. Darauf kamen die Tiere in absol. Alkohol, dann mehrere Tage in Benzylbenzoat. Von dort brachte ich sie in warmes Benzol, dem ich im Laufe von 3–4 Stdn. Paraffinflöckchen zusetzte, bis durch allmähliches Abdampfen des Benzols eine reine Paraffin-Lösung entstanden war. Das Paraffin wurde noch einmal gewechselt; darauf wurden die Objekte in Förmchen gegossen.

Schnitte von etwa 30  $\mu$  Dicke wurden in der üblichen Weise mit dem Mikrotom gemacht und mit der japanischen Methode (Schmorl) auf Objektträger aufgezogen.

Die Färbung erfolgte mit Hämalaun-Eosin, teilweise auch mit konz. wäßriger Nilblausulfat-Lösung mit nachträglicher Differenzierung in 1-proz. Essigsäure, um das Zentralnervensystem speziell betrachten zu können. Am Schluß Entwässerung und Einbetten in Canadabalsam.

Auch bei mit kleinen Dosen langsam vergifteten Tieren konnte ich bisher keine morphologischen Veränderungen am Zentralnervensystem beobachten.

<sup>18</sup> E. Becher, Biol. Zbl. 61, H. 7/8. [1941].

## V. Auswertung der Versuche

Durch die Auswertung der geschilderten Experimente glaube ich einen Beitrag zur Frage des Eindringens, des Angriffspunktes und der Wirkungsweise des DDT und HÖC leisten zu können.

Das Eindringen scheint nicht durch die Chitinplatten des Insektenkörpers zu erfolgen oder wenigstens dringen keine wesentlichen Mengen hindurch, sondern das Gift dringt an den Lücken des starren Panzers wie an den Gelenken, Sinnesorganen und Stigmen ein, wie es bereits L ä u g e r<sup>1</sup> vermutete. Für diese Annahme scheint zu sprechen, daß bei dem durch keine schwache Stelle unterbrochenen Chitinpanzer der Puppe, der sich sonst nicht vom Panzer der Fliege unterscheidet, das DDT an der Oberfläche wirksam bleibt, während das Innere ungiftig ist. Es besteht noch die Möglichkeit, daß das eingedrungene Gift gleich im Inneren entgiftet wird. Bei der Made bleibt die Frage noch offen, ob das DDT überhaupt durch die Haut in den Körper eindringt, da dieser an der Außenseite wäßrig-feucht ist und das DDT fast wasserunlöslich. Ich konnte Maden nur mit massiven Dosen kristallinen Giftes töten, wahrscheinlich dadurch, daß sie es fraßen, was beweist, daß Maden auch nicht ganz unempfindlich sind.

Wenn die Versuche auch nicht beweisen, daß das DDT am Zentralnervensystem angreift, so machen sie es doch wahrscheinlich, wie auch schon nach anderen Arbeiten zu vermuten war. Dafür spricht, daß DDT gerade bei der Puppe unwirksam ist, vorausgesetzt, daß es überhaupt eindringt. Bei diesen ist, besonders in den ersten Tagen ihrer Entwicklung, das Zentralnervensystem im Umbau begriffen und der Stoffwechsel auf ein Minimum herabgesetzt. Dann wurde die geringste Konzentration des Giftes bei größeren

Tieren im Gehirn festgestellt, was dem Angriffspunkt dort auch nicht zu widersprechen scheint. Man könnte sich vorstellen, daß dorthin ebensoviel DDT wie in die anderen Organe gelangt, aber im Gehirn, als dem Ort seiner Wirksamkeit, abgebaut oder in ungiftige Verbindungen übergeführt wird.

Das Auftreten von Krämpfen an isolierten Fliegenbeinen scheint mir, wenigstens teilweise, eine unspezifische Wirkung zu sein; denn das Bestreuen der Beine mit NaCl ergab dieselbe Wirkung. Für den Nachweis der von D o m e n j o z<sup>3</sup> vermuteten Wirkung auf das von v. B u d d e n b r o e c k<sup>6</sup> und T o n n e r<sup>4,5</sup> beschriebene periphere Nervensystem der Insekten wären noch weitere Versuche notwendig; bisher spricht nichts dafür. Übrigens konnte ich durch Vergiftung von isolierten Froschmuskeln und Nerv-Muskel-Präparaten keine Zuckungen hervorrufen.

Das verhältnismäßig schnelle Eintreten des Todes am vergifteten Insekt macht morphologische Veränderungen unwahrscheinlich, es läßt mehr eine funktionelle Ursache vermuten. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß ich in histologischen Präparaten auch an mit kleinen Dosen langsam vergifteten Tieren keine Degenerationserscheinungen oder sonst sichtbare Veränderungen am Kopfnervensystem feststellen konnte.

Es war nicht verwunderlich, daß Veratrin als wirksam festgestellt wurde, wenn auch der Unterschied der wirksamen Dosen hier besonders deutlich zum Ausdruck kommt. Es ist im Sabadillessig und anderen Insektenbekämpfungsmitteln schon lange im Gebrauch. Dagegen überraschte die Wirksamkeit von Chloralhydrat, was noch in größeren Versuchsreihen nachgeprüft werden muß, eventuell auch an chemisch ähnlich gebauten Verbindungen.