Zeitschrift: Acta Tropica

Herausgeber: Schweizerisches Tropeninstitut (Basel)

Band: 17 (1960)

Heft: 1

Artikel: Stoffwechselvorgänge bei sensiblen und resistenten Fliegen unter Einfluss der DDT-Substanz

Autor: Reiff, M. / Beye, F.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-310872

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel und Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

Stoffwechselvorgänge bei sensiblen und resistenten Fliegen unter Einfluß der DDT-Substanz.[1]

Von M. Reiff und F. Beye.

Inhalt

I. *Einleitung* 2

II. *Versuchsmaterial und Methoden* 3
1. Fliegenstämme 3
2. Behandlungsmethode und Bezugswerte 4
3. Wichtigste Präparationsmethoden 5
4. Wichtigste Nachweismethoden 6

III. *Abbau der DDT-Substanz als Teilprozeß des Resistenzgeschehens* 7
1. Metabolismus des DDT-Moleküls 7
2. Biotestmethoden zur Feststellung einer komplexen Reaktion 9

IV. *Beteiligung von Proteinkomponenten* 11
1. Protein-Änderungen der Tarsen 11
2. Protein-Änderungen der Haemolymphe 13
3. Protein-Änderungen des Bauchmarkes 18
4. Gesamt-N-Gehalt im Fliegenkörper 18

V. *Beteiligung von Lipoidkomponenten* 20
1. Acetonlöslicher Lipoidgehalt in Organen und Körper . . 20
2. Lipoidgehalt in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und bei Extraktionsfolgen 21
3. Untersuchungen zur Deutung der Lipoidänderungen . . . 22

VI. *Beteiligung anderer Stoffe und Systeme* 25
1. Atmung 25
2. Kohlehydrate und organische Säuren 27
3. Phosphatstoffwechsel 27
4. Weitere Fermentsysteme 28

VII. *Fluktuationen der Stammeigenschaften* 29

VIII. *Diskussion* 32

Literatur 41

Résumé. Summary 45

[1] Herrn Dr. R. Wiesmann zum 60. Geburtstag gewidmet.

I. Einleitung.

Das Problem der Insektizidresistenz nimmt in der Fachliteratur bereits einen großen Raum ein. Für zusammenfassende Berichte über die verschiedenen Aspekte der Resistenz und umfassende Literaturzitate sei auf die Arbeiten von WIESMANN (90), METCALF (48), HOSKINS & GORDON (30) und BROWN (13) verwiesen.

Wie aus bisherigen Publikationen der Basler Arbeitsgruppe für Resistenzforschung hervorgeht, verfolgen wir bei unseren Untersuchungen den Weg, den Gesamtstoffwechsel bei sensiblen und resistenten Insekten zu erfassen. Ausgehend von Versuchen über Aufnahme und fermentativen Abbau der DDT-Substanz (65, 93, 98), die das Resistenzgeschehen nicht genügend zu erklären vermochten, wurde die große Bedeutung der Lipoide (92) und der Proteine (66, 67) aufgezeigt. Durch histologische Untersuchungen (94) konnten die bei Körper und Organextrakten gefundenen Unterschiede zwischen sensiblen und resistenten Fliegen weitgehend belegt werden. In Beziehung zu dieser Publikation werden die Lipoidspezifität (6), und auf Grund von Atmungsbestimmungen die Bilanzierung des Stoffwechsels unter Einfluß der DDT-Substanz beschrieben (7), ferner die Probleme der polyvalenten Insektizidresistenz besprochen (69, 70).

In dieser Arbeit möchten wir einen Überblick über die experimentell festgestellten Einzelprozesse des unterschiedlich ablaufenden Stoffwechsels unter Einfluß von DDT-Substanz bei sensiblen (S) und resistenten (R) Imagines von *Musca domestica* L. geben und die Teilvorgänge in ihren vermutlichen Zusammenhängen bewerten.

Beim normalen Verlauf der Vergiftung mit DDT-Substanz sind mindestens 3 wichtige Stufen zu beachten: 1. Eindringen und Aufnahme der Wirksubstanz in die Tarsen oder über andere Resorptionswege der Cuticula. 2. Weiterleitung des Insektizids im Fliegenkörper, Transport mittels Haemolymphe und in den Geweben von Zelle zu Zelle. 3. Entscheidende Vergiftung von lebenswichtigen Organen oder Geweben, z. B. Nervenzentren.

Resistente Fliegen können bei allen 3 Stufen Abwehreffekte verschiedener Art einschalten, so daß sie dem Insektizideinfluß während längerer Zeit Widerstand leisten. Verzögerung, Abschwächung oder Verhinderung der Letaleffekte wären somit auf besondere Leistungen der R-Fliegen zurückzuführen und würden, übereinstimmend mit HOSKINS & GORDON (30), als protektive Mechanismen zu bezeichnen sein. Diese Protektivwirkungen können stoffwechselphysiologisch betrachtet werden als Leistungen von Substratsystemen, vor allem des Protein- und Lipoidmetabolismus (6, 69, 92), sowie als Leistungen von Fermentsystemen, bei der Bereitstellung der Substrate unter Insektizideinfluß (7, 69) und bei der spezifischen Wirkung auf den Abbau der DDT-Substanz (65, 95, 98). Da bei Musca der Resistenzgrad gegenüber der DDT-Substanz durch einen Summeneffekt aus der Verkettung vieler Vorgänge im Fliegenkörper zustande kommt, ist es entscheidend, daß ein Zusammenspiel zu einer protektiv wirkenden Reaktionseinheit eintritt.

Wenn wir den Zusammenhängen einer protektiven Gesamtleistung nachgehen, muß die Beteiligung des «inneren Milieus» beachtet werden. Das «innere Milieu» des Plasmas und der Zellverbände ist durch das gesamte Gefüge von anorganischen und organischen Stoffen, mit seinen Reaktionen gegenüber dem Insektizideinfluß, zu charakterisieren. In der Literatur der Insektizidresistenz ist, unseres Wissens, diese Fragestellung noch wenig berücksichtigt (erste Hinweise in Arbeiten 7, 69). In ähnlicher Richtung liegen die Versuche von WINTERINGHAM (97), wobei er mit markierten Verbindungen zeigen kann, daß die biochemische Auswirkung eines toxischen Effektes den ganzen «metabolic pool» betrifft. HOSKINS & GORDON (30) erwähnen die Bedeutung von allgemein ver-

stärkten «Vigor»-Faktoren für die Resistenz. Sie definieren «Vigor» als die durchschnittliche Aktivität aller sekundären biochemischen Prozesse, die von primären Schädigungswirkungen eines toxischen Stoffes betroffen werden. In unserer Bezeichnung «Reaktionseinheit im inneren Milieu» sind die «Vigor»-Faktoren auch eingeschlossen, die Beurteilung umfaßt aber primäre und sekundäre Prozesse gemeinsam.

Von diesen Gesichtspunkten her ergeben sich die folgenden Fragen: Ist die Gestaltung des «inneren Milieus» bei S- und R-Fliegen grundsätzlich oder nur graduell verschieden und ist dabei unter Insektizideinfluß die Stabilität des Gesamtsystems oder die Bildung neuer Gleichgewichtslagen für die Protektivleistung verantwortlich?

Arbeitsrichtung. Untersuchungen der beim Protektiveffekt beteiligten Substrat- und Fermentsysteme verlangen eine vielgestaltige und variationsreiche Arbeitsweise. Die meisten Versuche sind auf das Auffinden von quantitativen, zum Teil von qualitativen Unterschieden bei unbehandelten und behandelten Fliegen ausgerichtet. Aus dem Vergleich von unbehandelten Tieren der S- und R-Stämme sind Angaben über die Grundpotenzen als typische Eigenschaften der einzelnen Stämme zu erhalten. Der Vergleich unbehandelter Fliegen mit solchen des gleichen Stammes unter Einwirkung der DDT-Substanz (meistens 1 Std. Kontakt = behandelte Fliegen) orientiert über die durch das Insektizid ausgelösten Veränderungen. Treten dabei deutliche Gegensätze einer S- und einer R-Reaktion auf, so sind dies Hinweise, daß protektiv wirkende Teilreaktionen bei resistenten Fliegen vorliegen. Neben Untersuchungen von Extrakten des ganzen Fliegenkörpers sind Präparationen von Tarsen (Eintrittsstellen der DDT-Substanz beim Kontaktversuch), von Haemolymphe (Transportmedium für Substratanteile und Wirksubstanz) und Bauchmark (thorakaler Ganglienkomplex als wichtiges Zentrum der Nervenvergiftung) durchgeführt worden. Fast immer wurden die Extrakte ohne besondere Reinigung für die Nachweise verwendet. Verschiedene Resultate zeigen jedoch, daß diese Arbeitsweise mit «rohen» Extrakten manche Vorteile bietet, da mit Biokomplexen gearbeitet wird, die den aktiven Substraten in vivo besser entsprechen. Im weiteren sind Versuche mit zusätzlicher Beeinflussung der Insektizideinwirkung durch andere Substanzen durchgeführt worden (z. B. Fermenteinflüsse, Proteindenaturierung etc.). Die Anwendung solcher Versuchsmodelle mit der DDT-Substanz zusammen dient dem Erfassen der biologischen Bedeutung festgestellter Veränderungen beim Einfluß des Insektizids.

II. Versuchsmaterial und Methoden.

1. Fliegenstämme.

Für die Untersuchungen wurden nur Imagines im Alter von 3 bis 5 Tagen verwendet, die mit Zuckerwasser (zum Teil mit Honigwasser) gefüttert wurden. Folgende 5 Stämme sind in Großzuchten gehalten worden:

Sensible Stämme:

S_1 seit 1952 in Zucht, Ursprung Oberelsaß (früher N oder SN bezeichnet).
S_2 seit 1948, Ursprung Umgebung von Basel (früher SK bezeichnet).
S_3 seit 1954, aus USA erhalten (CSMA-Stamm).

Resistente Stämme:

R_1 1947 aus Kreuzung Arnäs- (89) × Wallis-Fliegen hervorgegangen. Freilandpopulationen mit deutlichem Resistenzgrad. Durch Selektion hochresistent geworden (früher R).

R_2 1948 aus Kreuzung Rom — × Wallis-Fliegen entstanden. Bei Beginn mäßig resistent, in Zucht hoher Resistenzgrad erreicht (früher RK).

Die Selektion der R-Stämme erfolgte im Flugkäfig mit jungen Imagines, wobei durch Aufstellen von Glas- und Holzplatten, die eine der jeweiligen Resistenzhöhe entsprechende Dosis an DDT-Substanz aufwiesen, der Anteil an schwächer resistenten Individuen eliminiert wurde.

Sensibilität und Resistenz der Stämme wurden im Insektizidtest dauernd geprüft. Die S-Stämme wiesen einen sehr ähnlichen Sensibilitätsgrad auf und reagierten innerhalb 30—60 Minuten Dauerkontakt mit Rückenlage. Auffallenderweise waren aber stets 5—10% Einzeltiere vorhanden, die nach einer Stunde noch keine akute Schädigung zeigten, sich also zu diesem Zeitpunkt ähnlich wie resistente Fliegen verhielten. Der Prozentsatz solcher «teilresistenter» Tiere nahm im Laufe der Zucht ständig leicht zu und erlaubte eine statistische Bearbeitung dieses Phänomens (siehe S. 30). R_1- und R_2-Fliegen reagierten nach 5 Std. Dauerkontakt nur vereinzelt, sogar nach 24 Std. Kontakt waren meistens nur ca. 10% geschädigt.

In verschiedenen physiologischen Eigenschaften (z. B. gewisse Fermentaktivitäten) zeigten einerseits S_1, S_3 and R_1 sowie andererseits S_2 und R_2 ausgesprochenen Gruppencharakter.

2. *Behandlungsmethode und Bezugswerte.*

Als Behandlungsmethode wurde der Kontaktversuch gewählt, d. h. die tarsale Aufnahme der DDT-Substanz. Fliegen in Kältestarre oder leichter CO_2-Narkose wurden, nach Geschlechtern getrennt oder paarweise ausgezählt, in Petrischalen mit einem Belag von 10 mg DDT-Substanz gebracht (unbehandelte Tiere meistens in Blindschale). Die Expositionszeit betrug in der Regel 1 Stunde. Nach dem Kontakt wurden die Fliegen sofort in Kälte (0 bis 2° C) gebracht und anschließend präpariert oder sofort bei + 60° C abgetötet und getrocknet.

Obwohl bei Kontakt die Aufnahme der DDT-Substanz unregelmäßig ist, wurde diese Methode gegenüber der Top-Behandlung bevorzugt, da sie der Anwendungsform des Insektizides in der Praxis entspricht. Ferner können Abwehrfunktionen gegen den Insektizideinfluß bei tarsaler Aufnahme physiologisch treffender beurteilt werden und ermöglichen dadurch eine sicherere Aussage über das Resistenzgeschehen.

Da sich die Untersuchungen über lange Zeiträume (1955—1958) erstreckten und die Versuchswiederholungen naturgemäß in auseinanderliegenden Generationen durchgeführt werden mußten, kommt den Bezugswerten bei den Ergebnissen eine besondere Bedeutung zu. Bei allen Versuchen ist stets behandeltes und unbehandeltes Material streng parallel bearbeitet worden. Außerdem wurden meistens 4—5 Stämme in ganzen Serien untersucht.

Für das Frischgewicht von Fliegen ist der Fütterungszustand und bei Weibchen auch der Reifegrad der Ovarien zu berücksichtigen. Bei Versuchen, die sich auf Frischgewicht bezogen, erhielten die Fliegen einige Stunden vor Versuchsbeginn nur Leitungswasser anstelle von Futter. Der prozentuale Wassergehalt im Fliegenkörper weist stammes- und behandlungsbedingte Schwankungen auf. Nach Kontakt auf DDT-Substanz sind Wasserverluste zu beobachten, die von Stamm zu Stamm verschieden stark ausgeprägt sind (6, 7). Diese Veränderungen sind jedoch statistisch nicht gesichert und lassen keine Rückschlüsse auf eventuelle unterschiedliche Mengen an freiem und gebundenem Wasser zu. Somit konnte auch keine Aussage über die Bedeutung des Wassergehaltes als Lösungs- und Dispersionsmittel für Substratanteile gewonnen werden.

Für gravimetrische Auswertungen wurden, parallel zum Frischgewicht, die Trockengewichte von Fliegen, die bei 60° C bis zur Konstanz getrocknet waren,

bestimmt. Bei Untersuchungen von Organen beziehen sich die Vergleiche bei Tarsen und Bauchmark auf gleiche Anzahl von Organen, bei Haemolymphe auf gleiche Verdünnungsgrade.

Die Erscheinungen der Resistenz können mit Relativwerten gegenüber absoluten Zahlenwerten verständlicher demonstriert werden. Bei Stammvergleichen unbehandelter Fliegen galt der stets parallel geführte S_1-Stamm als Basis. Seine Analysenwerte wurden gleich 100% gesetzt und diejenigen der andern Stämme in Relativprozenten berechnet. Zur Feststellung der Wirksubstanzeinflüsse bei behandelten Tieren wurden die Werte unbehandelter Kontrollfliegen des jeweiligen Stammes gleich 100% gesetzt.

3. Wichtigste Präparationsmethoden.

Tarsen: Pro Präparation wurden von je 25 Paar Fliegen die Tarsen mit einem kleinen Stück der Tibia abgeschnitten, in kleinen Röhrchen mit 0,5 ml Aceton versetzt und 15—18 Stunden bei 30° C aufbewahrt. Vor Prüfung des so gewonnenen Lipoid-Extraktes wurde das Lösungsmittel abgelüftet, erneut 0,1 ml Aceton zugesetzt, mit Mikropipette serienweise Tropfen von 0,01 ml Extrakt (Auftragung 2 × 0,005 ml übereinander) auf Whatman 1-Filterpapierstreifen (4×28 cm) gebracht.

Für Proteinuntersuchungen wurden je 300 Tarsen mit Quarzsand und 0,3 ml frischer physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) gemörsert. Nach Zentrifugieren (1 Min., 3000 Touren) wurden von der überstehenden Lösung Tropfen von 2×0,005 ml auf Filterstreifen aufgetragen.

Haemolymphe: Imagines besitzen im Unterschied zu Larven nur eine geringe Menge Haemolymphe, zu deren Sammlung kältestarren Fliegen mit einer Pinzette ein Vorderbein direkt am Thorax abgetrennt wurde. Der an der Wunde bei leichtem Druck auf den Körper austretende Tropfen wurde in einer mit Paraffinöl benetzten Glas-Kapillare aufgefangen und in einem Tubus mit Paraffinöl gesammelt, in Eiswasser gekühlt und mehrmals kurz zentrifugiert. Mit Pipetten wurden 0,03—0,05 ml Blut in einen neuen Tubus gebracht und mit destilliertem Wasser oder M/200 KCN-Lösung im gewünschten Verhältnis (meist 1 : 1 oder 1 : 2) verdünnt.

Bauchmark: Nach Abdecken der Ventralseite des Thorax wurde das Bauchmark in physiologischer Kochsalzlösung herauspräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 0° C aufbewahrt.

Für die Lipoidextrakte wurden auf der Startstelle von vorgewaschenen Filterstreifen die Ganglienkomplexe von je 5 Paar Fliegen mit Spatel zerrieben und der Streifen in ein Reagenzglas mit 1 ml Aceton gestellt. Sobald das Lösungsmittel die 10 cm-Marke erreicht hatte, wurde der Streifen luftgetrocknet und die Elution der löslichen Anteile jeweils 1mal wiederholt. Die gleiche Methode wurde auch für Lipoidextrakte aus Haemolymphe (0,01 ml pro Streifen) angewendet.

Für Proteinextrakte wurden die Ganglienkomplexe von je 10 Paar Fliegen in kleinem Mörser (Durchmesser 5 mm) mit Glasstab unter Zusatz von Quarzsand und 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung zerrieben, der Brei in Tubusgläser gebracht und kurz zentrifugiert.

Ganzer Fliegenkörper: Homogenate wurden in verschiedenen Konzentrationen in Reibschalen mit Quarzsand und 0,9% Kochsalz- oder Pufferlösung hergestellt. Teilweise kamen Homogenisatoren (Bühler, Tübingen, und Polytron, Solothurn) zur Anwendung. Nach dem Zentrifugieren (3 Minuten, 3000 Touren) wurde die überstehende Lösung weiter verwendet.

Für Lipoidextrakte wurden, nach Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht, 100 oder 200 Fliegenpaare in Extraktionshülsen in Soxhletapparaten

mit Aceton, Aethyläther, Chloroform und Aethylalkohol je 8 Std. warm extrahiert, die Extrakte schonend eingeengt und bei 60° C bis zur Konstanz getrocknet und ausgewogen.

4. Wichtigste Nachweismethoden.

Acetonlösliche Lipoidanteile: Filterstreifen mit Extrakttropfen (Tarsen) oder mit Anreicherung der Lipoidkomponenten an der Lösungsmittelfront (Blut und Bauchmark) wurden in gesättigter, filtrierter Lösung von Fettschwarz Geigy in 50% Alkohol 15 Minuten gefärbt, in 50% Alkohol mehrmals ausgewaschen und bei 90° C kurz getrocknet. Die blauschwarz gefärbten Stellen mit Lipoidextrakt wurden mit genau bemessenen Stücken ausgeschnitten und in 5 ml Aceton eluiert. Bestimmung der Extinktion von je 2 oder 4 Streifenproben mittels Beckman-Spektrophotometer B bei 600 mμ, wobei die Flächenwerte der Extinktionskurven verglichen wurden.

Aminosäuren und ninhydrinpositive Stoffe: Extrakttropfen auf Filterstreifen wurden mit Nihydrin (10 Min. 90° C) entwickelt und im Densitometer ausgemessen. Häufig ist der Gesamtwert durch Auswertung eindimensionaler Papierchromatogramme (70% Propanol/H_2O, Ninhydrin) im Densitometer mit 540 oder 600 mμ-Filter bestimmt worden.

Nachweis der freien Aminosäuren im Blut durch 2-dimensionale Trennung, aufsteigend 70% Propanol/H_2O, absteigend wassergesättigtes Phenol, Papier SS 2043b. Nach Entwicklung mit Ninhydrin wurden die Flecken im durchfallenden Licht markiert und die Farbintensität bei jedem Stoff mit 4—5 geschätzten Abstufungen im Vergleich mit parallelen Kontrollen bewertet.

Proteinanteile: Haemolymphe-Untersuchungen mit Papierelektrophorese im Elphor-H-Gerät (Soerensen-Phosphatpuffer pH 8,04, 1/15 M, Laufzeit 14 bis 16 Std., 110 V.). Auftragung von 0,025 ml 1 : 1 mit M/200 KCN-Lösung verdünntem Blut.

Färbung von Elpherogrammen oder von Extrakttropfen auf Filterstreifen (Tarsen und Bauchmark) mit 1% Bromphenolblau in $HgCl_2$-gesättigtem Methanol (15 Min.). Nach dem Auswaschen im fließenden Wasser erfolgte kurze Trocknung bei 90° C und Auswertung im Photovolt-Densitometer.

Stickstoff- und Eisengehalt: Aus Homogenaten und hitzefixierten Fliegen wurde im Mikrojeldahl-Apparat nach PARNASS (60) der N_2-Gehalt bestimmt. Für besseren Aufschluß der Chitinstrukturen bei der Veraschung mußten Schwefelsäuremenge und Perhydrolzusatz neben dem Kupfer-Kaliumsulfatgemisch erhöht werden.

In Homogenat- und Trockenmaterial wurde der Eisengehalt nach KNIPHORST (34) bestimmt (Warm-Veraschung mit Schwefelsäure, Sulfosalicylsäure-Reaktion, Kolorimeter).

Reduzierende Zucker (Glukose): Frisch- und Trockenmaterial wurde nach NELSON (56) und SOMOGYI (83) bearbeitet (Oxydation mit alkal. Cu-Reagens, mit Arsenmolybdat-Reagens gebildetes Cuproxyd im Kolorimeter bestimmt). Berechnung des Gehaltes an reduzierendem Zucker = Glukose in Gewichtsrelation zu Ausgangsmaterial.

Phosphate: Anorganische Phosphate wurden nach BRIGGS (11) bestimmt. Homogenat mit 20% Trichloressigsäure versetzt, zentrifugiert und über Schott G 2-Glasfritte filtriert. Vergleich des Gehaltes mit Phosphat-Standardlösungen im Kipp-Kolorimeter. Bezug auf Frischgewicht.

Fermentnachweise:

a) Aus Homogenaten mit Pufferlösungen von pH 8,7 resp. pH 4,8 wurden die Aktivitäten der «alkali»- und «sauren» Phosphatasen nach (26, 33, 57) bestimmt.

Nachweis des abgespaltenen Phenols im Kipp-Kolorimeter und Bezug auf Frischgewichte.

b) Esteraseaktivität. 10 ml Homogenat (10 Fliegenpaare in 20 ml Barbitursäurepuffer (pH 8,5) wurden mit 0,1 ml Reaktionsgemisch versetzt, 30 Min. bei 30° C gehalten und das Filtrat gegen Blindprobe und Indigo-Standardlösungen im Photometer (570 mμ) ausgemessen. Methode nach (5) modifiziert. Indoxylacetatlösung: Frische Mischung von 25 ml 2 M NaCl; 10 ml Michaelis Barbitursäurepuffer 0,1 M, pH 8,5; 0,25 g $CaCl_2$ in 14 ml H_2O; 20 mg Indoxylacetat in 1 ml Aceton.

c) Zum Nachweis der Katalaseaktivität wurden Reaktionsgefäße mit 25 ml Homogenat von 4 Fliegenpaaren in Soerensen-Phosphatpuffer pH 7,0 an Manometer angeschlossen, nach Druckausgleich (20°, 100 Schüttelungen/Min.) 20 ml H_2O_2-Lösung eingekippt und aus dem Überdruck in mm Hg der freigesetzte O_2 bestimmt. Bezugswerte auf Fliegen-Frischgewicht. Das nach STEPHAN (84) leicht modifizierte Verfahren gibt die «relativen» Kataloseaktivitäten an und nicht die sog. «Wechselzahl» der Katalase.

DDT-Substanz, DDE und Wirksubstanzinaktivierung.

Der analytische Nachweis der DDT-Substanz und der DDE-Verbindung (Salzsäureabspaltung an der Trichlorgruppe des DDT-Moleküls) geschah nach Methoden von SCHECHTER-HALLER (79) und STERNBURG et al. (86) und ist bei WUHRMANN (98) genauer beschrieben.

Zur Prüfung des fermentativen Abbaus und anderweitiger Inaktivierung der DDT-Substanz wurde eine Biotestmethode (65, 98) angewendet, bei der Homogenate oder Organextrakte auf Filterpapier mit Puffer- oder physiologischer Kochsalzlösung «chromatographiert» wurden. Nach Auflage des Chromatogramms auf ein mit DDT-Substanz (100 γ/cm^2) imprägniertes Filterpapier, Benetzung mit Phosphatpuffer pH 8,0 und «Inkubation» zwischen Glasplatten (3—4 Std., 30° C), wurde das getrocknete imprägnierte Papier getestet. An Stellen, wo die chromatographierten Zonen auflagen, konnte mit sensiblen Fliegen in kleinen Gummiringkammern, aus dem Prozentsatz der nach 1½ Std. geschädigten oder noch normalen Tiere, die Veränderung des Gehalts an frei verfügbarer DDT-Substanz ermittelt werden.

III. Abbau der DDT-Substanz als Teilprozeß des Resistenzgeschehens.

1. Metabolismus des DDT-Moleküls.

Die Charakterisierung eines Insektizides stützt sich im allgemeinen auf das Erkennen von Schädigungseffekten bei verschiedenen Dosierungen und auf die Bestimmung der möglichen Metaboliten der Wirksubstanz im Insektenkörper. Die Kenntnisse über die Wirkung der DDT-Substanz sind durch die Untersuchungen der Resistenz bedeutend erweitert worden.

Amerikanischen Biochemikern ist es gelungen, den Abbau der DDT-Verbindung zum ungiftigen DDE (HCl-Abspaltung) als Ergebnis einer definierten Fermentreaktion darzustellen. STERNBURG, VINSON und KEARNS (85) zeigten mit Homogenaten von resistenten Fliegen, daß bei Gegenwart von Glutathion 10—20% der zu-

gesetzten DDT-Substanz zu DDE umgebildet wird. STERNBURG et al. (86) bezeichneten nach weiteren Ergebnissen das bei R-Fliegen gefundene Enzym als «DDT-Dehydrochlorinase». Nach diesen Resultaten würden die sensiblen Fliegen den fermentativen Abbau nicht oder nur unbedeutend ausführen können. Im Unterschied dazu wiesen BABERS und PRATT (2) nach Injektion von DDT-Substanz, außer bei resistenten, auch bei sensiblen Fliegen den Abbau zu DDE nach. Außerdem erwähnten TAHORI und HOSKINS (87), daß, trotz besserem Abbau, im Körper von R-Fliegen bedeutende Mengen unabgebauter DDT-Moleküle gefunden werden und außer DDE noch andere Metaboliten vorhanden sein müssen, die beim Analysengang nicht erfaßt werden.

Die Verschiedenheit der Resultate ist wohl primär durch die Versuchsanordnung bei der Applikation der DDT-Substanz (in vitro- oder in vivo-System) bedingt. Vom biologischen Gesichtspunkt aus geben wir der in vivo-Applikation den Vorzug.

Bei unseren Stämmen S_1 und R_1 ist Aufnahme und Abbau der DDT-Substanz nach Top-Behandlung und nach Kontakt untersucht worden (93).

Die Hauptresultate ergaben:

1. Beispiel Top-Behandlung (10 γ/Fliege, 5 Std. 20° C): in 100 S_1-Fliegen wurden durchschnittlich 20 γ DDT-Substanz und 8 γ DDE (29% des Totals) gefunden, in 100 R_1-Fliegen 44 γ, resp. 34 γ (44%).

2. Beispiel Kontaktversuch (5 Std. 20° C, 10 mg Belag auf Glas oder Filterpapier): Die Aufnahmeverhältnisse zwischen S_1 und R_1 waren anders als bei der Top-Behandlung, der Abbau bei R_1 prozentual höher als im Versuch 1. Durchschnittlicher Gehalt an DDT-Substanz: 100 S_1-Fliegen Glas 58 γ, Papier 16 γ; R_1 24 γ resp. 8 γ. DDE-Gehalt: S_1 Glas 16 γ (21% vom Total), Papier 10 γ (18%); R_1 24 γ (50%) resp. 18 γ (70%).

Auch in weiteren Versuchsserien mit in vivo-Aufnahme der DDT-Substanz konnte bei S-Tieren stets DDE gefunden werden, allerdings bedeutend weniger als bei R. In vitro-Versuche ergaben folgende Merkmale (93, 98):

3. Beispiel Homogenat mit Zusatz von DDT-Substanz (Inkubation 5 Std. 26° C): Bei S_1 und R_1 war kein DDE vorhanden. Während jedoch bei S-Homogenat annähernd die zugesetzte Menge DDT-Substanz nachgewiesen werden konnte, trat bei R ein Manko von 15—20% auf.

4. Beispiel Enzymextrakt, Inkubation 1 Std. 37° C: Bei S-Stämmen waren rund 8%, bei R-Stämmen ca. 15% der zugesetzten DDT-Substanz (50, 100, 150 γ) nicht mehr nachweisbar, je ca. $^1/_4$ des Mankos war in Form von DDE vorhanden.

WUHRMANN (98) führte die Enzymprüfungen nach STERNBURG et al. (86) bei 7 sensiblen und 7 resistenten *Drosophila melanogaster*-Stämmen durch und konnte in keinem Falle eine positive Reaktion für DDE, wohl aber ein Manko von 10—20% der zugesetzten DDT-Substanz bei sensiblen und von 15—30% bei resistenten Zuchten feststellen. Wurde die Analyse ohne Inkubationszeit, kurz nach dem Zusatz der DDT-Substanz zum Extrakt, durchgeführt, so wurden sehr ähnliche Werte wie bei voller Inkubation erhalten.

2. *Biotestmethoden zur Feststellung einer komplexen Reaktion.*

Die angeführten Ergebnisse zeigen bereits, daß außer dem fermentativen Abbau noch weitere Prozesse beteiligt sein müssen, die im Resistenzgeschehen in vivo bedeutend sind. Einen Einblick in die möglichen Vorgänge vermittelt die Biotestmethode (siehe S. 7). Dieses Verfahren ist früher (65) als Nachweis für den fermentativen Abbau bezeichnet worden. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß an Stellen mit guter «Abbauwirkung» bei S_1-Homogenat rund 10%, bei R_1-Homogenat rund 25% der bei Imprägnierung auf das Papier gebrachten DDT-Substanz fehlen, DDE jedoch nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen ist. Ferner hat sich gezeigt, daß zusätzlich zur Abbauleistung z. B. adsorptive Vorgänge auftreten, wodurch weitere Anteile der DDT-Substanzmenge inaktiviert werden. Bei den Resultaten mit S-Fliegen im Biotest sind also summarische Angaben über Abbau- und Inaktivierungsvorgänge zu erhalten; sie vermitteln ein Maß über die Stärke der komplexen Reaktion.

In neuen Versuchsserien wurde mittels dieser Methode untersucht, ob die Werte bei Organ- und Körperextrakten von unbehandelten und behandelten Fliegen unterschiedlich sind, ob sich also die Potenzen für Abbau- und Inaktivierungsleistungen nach erfolgter Aufnahme von DDT-Substanz (1 Std. Kontakt) verändern.

Die wichtigsten Resultate sind in Abb. 1 eingetragen. Jeder Durchschnittswert wurde aus der Prüfung von über 200 Testpunkten aus 25—30 Chromatogrammen ermittelt. Im Vergleich zu S_1-Körperhomogenat (unbehandelt = 100%) sind relative Zahlen berechnet worden. Bei Tarsenextrakt und Haemolymphe sind die Reaktionen des S_1-Stammes höher als beim Körperhomogenat, daher die Verschiebung des Niveaus in den 3 Abschnitten.

In unbehandeltem Zustand zeigen die R- gegenüber den S-Stämmen eine deutlich höhere Leistung. Dieser bekannten Tatsache steht gegenüber, daß bei behandelten S-Fliegen die Potenzen für weitere Entgiftungsfunktionen in vitro mehrheitlich an-

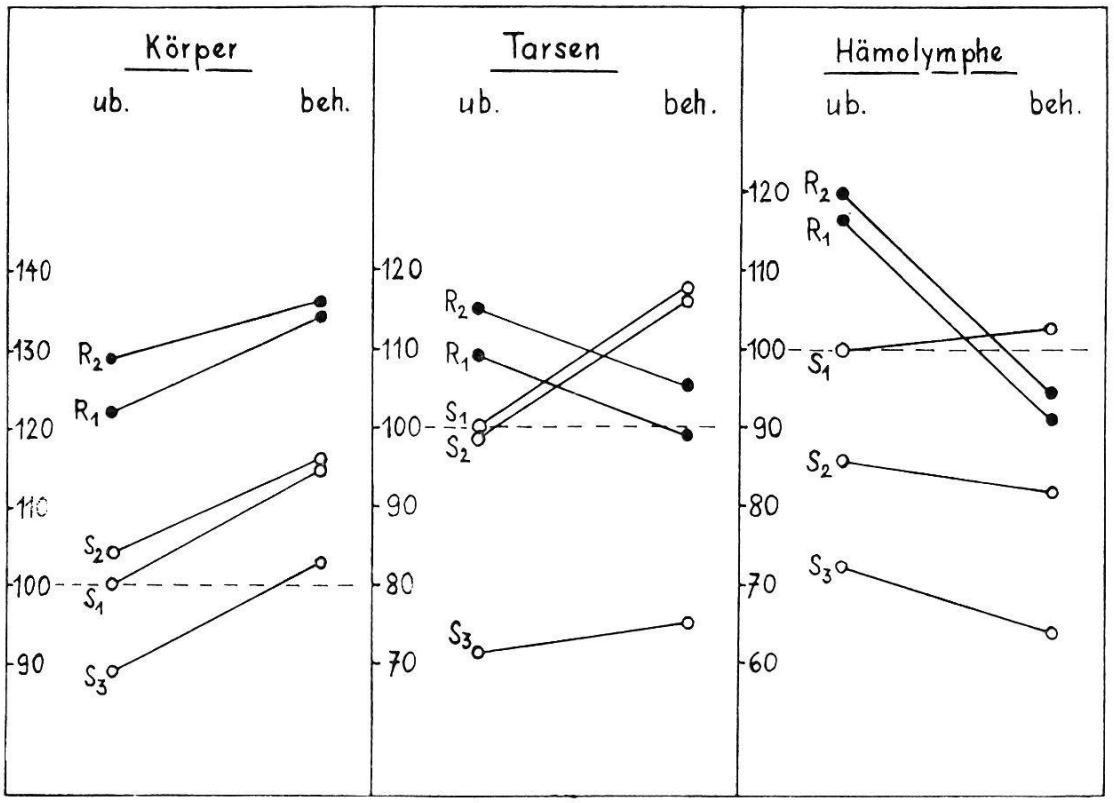


Abb. 1. Potenzen für fermentativen Abbau und andere Inaktivierung der DDT-Substanz bei S- und R-Fliegen. Ermittlung mit Rohextrakten im Papierchromatogramm und Biotestverfahren. Extrakte mit 0,9% NaCl-Lösung, Körperhomogenat von 15 Paar Fliegen in 3 ml, Tarsen von 25 Paar in 0,15 ml, Blut 1 : 2 verdünnt. Bezugswert: Körperhomogenat von S_1 = 100%.

steigen. Aus dem Vergiftungsbild bei S ist das Gegenteil zu erwarten. Vielleicht wird in vitro durch Freisetzung reaktionsbeteiligter Mechanismen eine zu hohe Leistung vorgetäuscht, während in vivo eine Hemmung des potentiellen Abbau- und Inaktivierungsvermögens eintritt. Bei behandelten R-Fliegen entspricht das Resultat mit Körperhomogenat den Erwartungen, dagegen ist der Leistungsabfall bei Tarsen und Blut überraschend. Dieses Ergebnis ist nur bei Berücksichtigung des Gesamtstoffwechsels verständlich (siehe S. 34); denn R-Tiere benötigen zur vollen Protektivfunktion die Verschiebung reaktionsbeteiligter Substratanteile im Körper.

Mit Synergisten kann der fermentative Abbau der DDT-Substanz weitgehend oder sogar vollständig gehemmt werden (18, 51). Es gelingt jedoch nicht, R-Fliegen so stark zu sensibilisieren, daß eine den S-Stämmen vergleichbare Abtötungswirkung zustande kommt. Untersucht man die Synergistenwirkung mit dem Biotestverfahren, so wird eine deutliche Reduktion der Abbauwerte erhalten; in allen Fällen bleibt aber bei R-Extrakten eine noch bedeutende Restaktivität bestehen. Dieser Anteil ist nicht mehr dem Abbauenzym, sondern den schwächer geschädigten Begleitsystemen zuzuschreiben.

Eine große Zahl solcher Beobachtungen mit zusätzlichen Beeinflussungen der Wirkung der DDT-Substanz hat uns bestätigt, daß der fermentative Abbau am DDT-Molekül nur einen Teilprozeß der Resistenz umfaßt. Außerhalb dieser spezifischen Leistung greifen andere Mechanismen ein, bei denen, nach unseren Ergebnissen, die Körpergrundstoffe stark beteiligt sind.

IV. Beteiligung von Proteinkomponenten.

Da dem Eiweiß als Träger der Lebensfunktionen eine primäre Stellung im ungestörten und im experimentell veränderten Stoffwechsel zuzuschreiben ist, wurde die Frage der Beteiligung von Proteinkomponenten bei den protektiv wirkenden Mechanismen in den Vordergrund gestellt.

Beim Einfluß eines Toxikums sind im allgemeinen die Proteinstrukturen funktionstüchtiger Zellen und Gewebe prädestiniert, besondere Reaktionen auszuführen, um die Giftwirkung abzuschwächen. Die Anwendung von Insektiziden führt aber normalerweise zu so starken Schädigungseffekten, daß Anzeichen von Gegenreaktionen meist überdeckt werden. Andere Voraussetzungen sind jedoch bei der Insektizidresistenz gegeben. Ursprünglich nur unvollkommen wirkende Abwehrfunktionen können bei resistenten Tieren verstärkt sein, wodurch ein Überleben bei Aufnahme sonst letal wirkender Dosen möglich wird. In diesem Sinne wurde geprüft, ob unterschiedliche Veränderungen von Proteinanteilen beim Einfluß der DDT-Substanz auf S- und R-Fliegen zu erkennen sind.

1. Protein-Änderungen der Tarsen

Die Tarsenextrakte mit physiologischer Kochsalzlösung geben Aussagen über die leicht löslichen Anteile der Proteinkomponenten. In Tab. I sind die relativen Werte der Nachweisreaktionen stammweise für unbehandelte und behandelte Fliegen eingetragen. Der Substrat-Grundgehalt weist bei nieder- und höhermolekularen Eiweißanteilen stammtypische Werte auf, ohne Beziehung zu Sensibilität oder Resistenz. Nach Kontakt auf DDT-Substanz wird jedoch der Gehalt innerhalb der S- und R-Stämme gegensätzlich verändert. Diese Wertänderungen, Zunahme bei S und Abnahme bei R, sind gegeneinander gesichert (höchste mittlere Streuung für ninhydrinpositive Stoffe = $\pm 0{,}9\%$, für Proteine = $\pm 5{,}5\%$, pro Stamm $n = 4$). Es ist also ein unterschiedlicher Reaktionsablauf bei S und R nach Kontakt aufzuweisen, wobei die Wertabnahme der Proteinkomponenten in den Tarsen als protektive Funktion zu deuten ist.

TABELLE I.

Tarsenextrakte mit physiologischer Kochsalzlösung. Nachweis von kleinmolekularen Anteilen (Ninhydrin) und höher molekularen Anteilen (Bromphenolblau). Grundgehalt auf S_1 bezogen. Substratänderungen gegenüber unbehandelten Fliegen bei jedem Stamm in % berechnet.

Stamm	*Ninhydrinpositive Stoffe*		*Proteinanteile*	
	Grundgehalt unbehandelt	Veränderung behandelt	Grundgehalt unbehandelt	Veränderung behandelt
S_1	100	+ 2	100	+ 27
S_2	106	+ 2	99	+ 3
S_3	104	+ 1	103	+ 14
R_1	104	— 4	84	— 13
R_2	107	— 8	111	— 19

Untersuchungen mit partieller Hydrolyse von gemörserten S_1- und R_1-Tarsen ergaben, daß wahrscheinlich die Stabilität der Proteinanteile bei R_1 größer ist, die Grundzusammensetzung aber keine wesentlichen Unterschiede aufweist. (Schwache Hydrolyse mit ln HCl, a) 16 Std. 30° C, b) 16 Std. 60° C, c) 16 Std. 30° C + 2 Std. 100° C.) Beim Nachweis ninhydrinpositiver Stoffe im Papierchromatogramm war zu erkennen: a) S_1 mehr Flecken als R_1, b) Unterschied zwischen S_1 und R_1 fast ausgeglichen, c) S_1 gleich R_1.

Bei der Einwirkung proteolytischer Fermente (Pepsin, Trypsin, 0,5%, 16 Std. 37° C) in ihrem optimalen pH-Bereich, waren im Papierchromatogramm keine qualitativen Unterschiede mit der Ninhydrinreaktion festzustellen. Sobald aber die Fermente in physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt wurden, waren bei R_1 bedeutend mehr kleinmolekulare Anteile gelöst als bei S_1. Der Einfluß der Proteolyse auf R_1-Fliegen zeigte sich auch durch eine partielle Sensibilisierung im Insektizidtest (1 Std. Kontakt auf Filter mit 1 ml Fermentlösung, dann Kontakt auf DDT-Substanz). Nach 16 Std. waren mit Trypsin 41%, mit Pepsin 31%, Kontrolle 10% vergiftete R_1-Fliegen zu beobachten, S_1-Tiere zeigten keine Verstärkung der Abtötungswirkung.

Mit schwacher HCl-Hydrolyse und mit milder Proteolyse durch Fermente kann also ebenfalls ein gegensätzlicher Tatbestand für S und R festgestellt werden. Wir vermuten, daß die Peptidbindungen bei resistenten Fliegen etwas stabiler sind und bei Bedarf rascher neu gebildet werden als bei sensiblen. Außerdem ist wahrscheinlich die Gruppierung an sich gleicher Komponenten in den größeren Stoffkomplexen zwischen S und R verschieden. Die in den Rohextrakten festgestellten Substratänderungen sind daher Anzeichen für das Vorhandensein von Stoffwechselprozessen, die durch die Wirkung der DDT-Substanz verursacht worden sind.

2. *Protein-Änderungen der Haemolymphe.*

a) Aminosäurengehalt.

Insekten besitzen im Vergleich zu anderen Tierklassen einen außerordentlich hohen Aminosäurengehalt im Blut. FLORKIN (21) bezeichnet dies als biochemisches Merkmal der Insekten. Da gleichzeitig der Gehalt an anorganischen Jonen relativ gering ist, wird wahrscheinlich der wesentlichste Teil der Osmoregulation von den Aminosäuren übernommen (J. B. BUCK in 74). Diese Tatsachen gaben den Anlaß, die Aminosäurenverhältnisse der Haemolymphe von S- und R-Fliegen zu prüfen (67).

Die papierchromatographische Untersuchung hat ergeben, daß beim Grundgehalt keine resistenztypischen Merkmale zur Geltung kommen, sondern stammspezifische Werte (wie bei Tarsen) zu finden sind, wobei der Vergleichsstamm S_1 den höchsten Gehalt besitzt (Tab. II).

Nach einer Stunde Kontakt auf DDT-Substanz treten deutliche Wertveränderungen gegenüber unbehandelten Tieren auf. Wieder sind gegensätzliche Reaktionen zwischen S und R festzustellen, die Richtung der Ausschläge ist aber im Vergleich zu den Tarsen reziprok. Für die Substrat-Änderungen in der Haemolymphe würde demnach eine Zunahme der freien Aminosäuren als R-typische Reaktion zu deuten sein.

Die Untersuchung des Aminosäurenbestandes der Haemolymphe unbehandelter und behandelter *Musca*-Imagines gab einen Einblick in gewisse qualitative Vorgänge. Abb. 2 zeigt in schematischer Darstellung die nachgewiesenen ninhydrinpositiven Stoffe. Alle S- und R-Fliegen weisen einen starken Gehalt an Glycin, Alanin, Serin, Glutaminsäure, Glutamin und Taurin auf. Methiononsulfoxyd ist deutlich, Methionin nur schwach vorhanden. Tyrosin ist bei Imagines kaum nachweisbar, bei Larven deutlich positiv.

TABELLE II.

Aminosäurengehalt der Haemolymphe und Wertveränderungen nach Kontakt auf DDT-Substanz. Aminosäurengruppen (siehe Abb. 2). + = Zunahme, — = Abnahme. Bezugswerte wie in Tab. I.

Stamm	Grundgehalt unbehandelt	Änderung Totalwert behandelt	Änderung Aminosäurengruppen 1	2	3	4	5
S_1	100	— 26 ± 1,6	— —	— — —	— — —	—	— — —
S_2	72	— 11 ± 2,0	(+)	— — —	— —	—	—
S_3	73	— 22 ± 2,9	—	— —	(—)	— —	— — —
R_1	66	+ 23 ± 4,0	+ +	+ +	+ + +	+ +	+ +
R_2	79	+ 3 ± 3,8	(+)	+	+	+	—

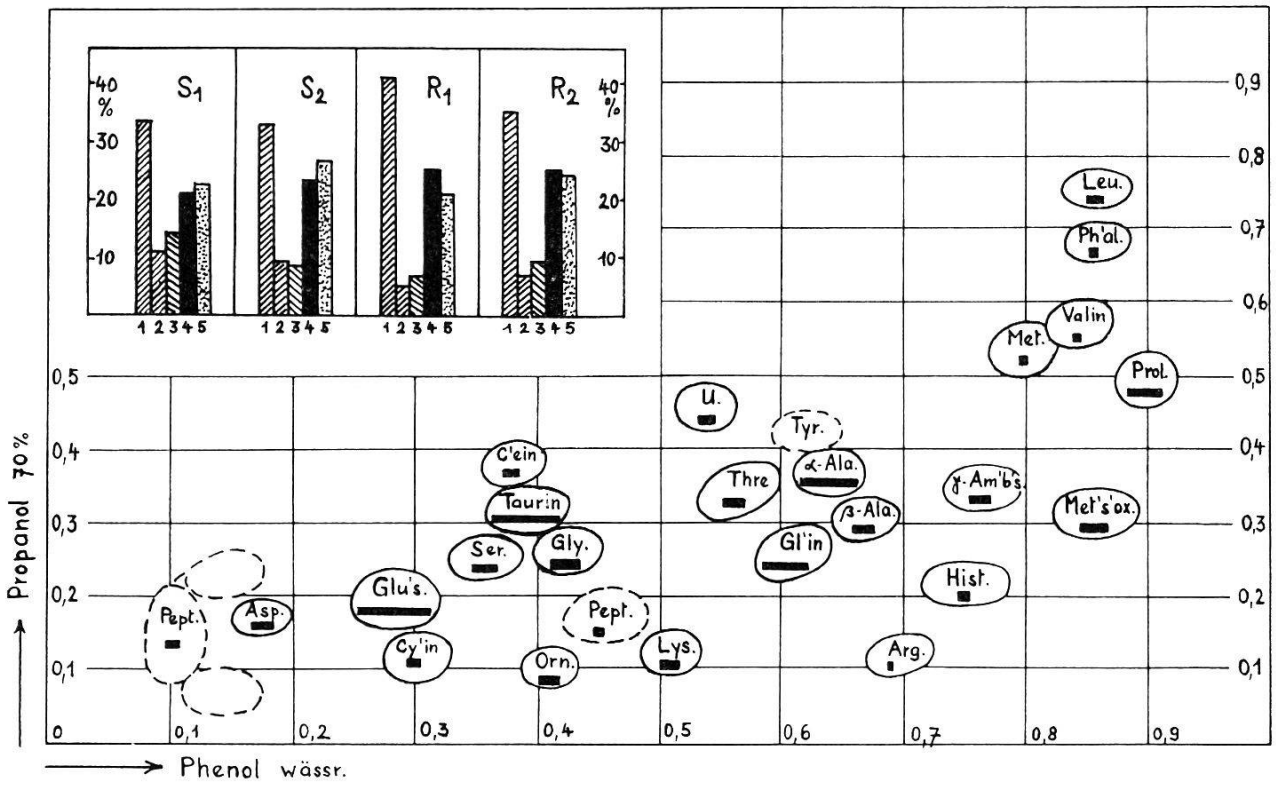


Abb. 2. Aminosäurenkarte der Haemolymphe von Musca-Imagines. Horizontale Balken bezeichnen durchschnittliche Farbintensität der Flecken. Links oben: Relative Anteile von Aminosäurengruppen in % des Totals. 1 = neutrale (Glycin, Alanin, γ-Aminobuttersäure, Serin, Threonin), 2 = neutrale, schwacher Gehalt (Leucin, Phenylalanin, Valin, Prolin), 3 = basische (Ornithin, Lysin, Arginin, Histidin), 4 = saure (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin), 5 = schwefelhaltige (Taurin, Cystin, Cystein, Methionin, Methioninsulfoxyd).

Valin, Phenylalanin und Leucin, stets in kleinen Quantitäten, sind für S-Stämme typisch, treten bei unbehandelten R-Fliegen nur in Spuren, nach Kontakt deutlicher auf. Arginin ist schwach vertreten und kann nur bei S_1 und R_2 mit Ninhydrin erkannt werden. Die Flecken mit Rf-Werten 0,1 und 0,45 in Phenol (vermutlich Peptide) und U (0,52) wurden bisher nicht näher untersucht. Die Unterschiede im Grundgehalt der Stämme lassen sich im übrigen nicht auf das Fehlen von bestimmten Aminosäuren zurückführen, der geringere Wert gegenüber S_1 ist auf fast alle Komponenten verteilt.

Im deproteinisierten Blut von verpuppungsreifen Muscalarven ist der Gehalt an ninhydrinpositiven Stoffen 3—4mal größer als bei Imagines. Wie Vergleichsproben gezeigt haben, wirkt sich der höhere Gehalt auf alle Komponenten und besonders Peptide aus, außer Taurin, das erst im Imaginalstadium in größeren Mengen vorhanden ist. Der Vergleich der Aminosäurenkarte von *Musca*-Haemolymphe mit *Drosophila* (15) oder *Ephestia* (16) bestätigt, daß jeder Tiergruppe ein in seiner Gesamtheit typischer, jeder Tierart aber ein spezifisch gefügter Aminosäurenbestand zukommt (21).

Um den Vergleich der S- und R-Stämme übersichtlicher zu gestalten, ist in Abb. 2 (links oben) eine Aufteilung nach Aminosäurengruppen (neutrale, basische, saure, schwefelhaltige, je in % des Totalwertes) durchgeführt worden. Das Bild ergibt, daß bei R-Stämmen der relative Anteil an sauren Aminosäuren verstärkt und derjenige von SH-Verbindungen etwas verringert ist. Durch die Selektion sind also leichte qualitative Unterschiede aufgetreten, deren Bedeutung für die Resistenz noch unklar ist. Berücksichtigt man nämlich die Gehaltsveränderungen bei behandelten Fliegen, so zeigt sich, daß sowohl Abnahme bei S- als Zunahme bei R-Stämmen, auf alle Aminosäurengruppen verteilt sind (Tab. II). Auch bei der Stoffverteilung in den Papierchromatogrammen ist stets eine Reaktion des ganzen Systems festzustellen. Da jeder Tierart ein weitgehend stationärer Aminosäurenpool zukommt (21), ist auch anzunehmen, daß bei der Wirkung der DDT-Substanz eine «selektive» Veränderung der Komponentenverhältnisse nicht auftritt. Untersuchungen mit Mutanten von *Drosophila* (15), *Ephestia* (16) oder erkrankten *Bombyx*-Larven (20) belegen ebenfalls, daß Auswirkungen auf den Aminosäurengehalt weitgehend unspezifisch den gesamten Bestand betreffen.

b) Proteingehalt.

Der Protein-Grundgehalt der Haemolymphe unbehandelter Fliegen weist stammtypische, aber ebenfalls keine selektionsspezifischen Werte auf (S_1 100% Basis, S_2 103%, S_3 92%, R_1 112%, R_2 87%). Da deutliche Veränderungen im Aminosäurengehalt bei behandelten Fliegen aufgetreten sind, stellt sich die Frage, ob eine Kompensation im Proteingehalt der Haemolymphe erfolgt. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, zeigen aber die nach 1 Std. Kontakt ausgelösten Substrat-Änderungen auch eine Abnahme bei S und Zunahme bei R, parallel den Aminosäuren.

In Versuchen mit Papierelektrophorese konnte unter den erwähnten Bedingungen und auch mit anderen Puffern beim Blut adulter Fliegen keine deutliche Fraktionierung erzielt werden, wie dies bei *Drosophila*-Larven (13) der Fall ist. Der an sich geringe Gehalt an Proteinen (Imagines $^1/_{16}$—$^1/_{15}$ gegenüber Larven) bleibt zum Teil an der Startstelle, zum Teil wandert er anodisch mit einer Ausbreitung auf 3—4 cm. In Abb. 3 sind als Beispiele die Resultate für S_1 und R_1 eingetragen, deren Bild auch für die anderen Stämme typisch ist. Für die Abnahme des Gehaltes bei behandelten S-Fliegen scheinen keine besonderen Protein-Fraktionen verantwortlich zu sein, da sich die Veränderung über den ganzen Bereich der Auftrennung erstreckt. Bei R_1, wo sich die Gehaltzu-

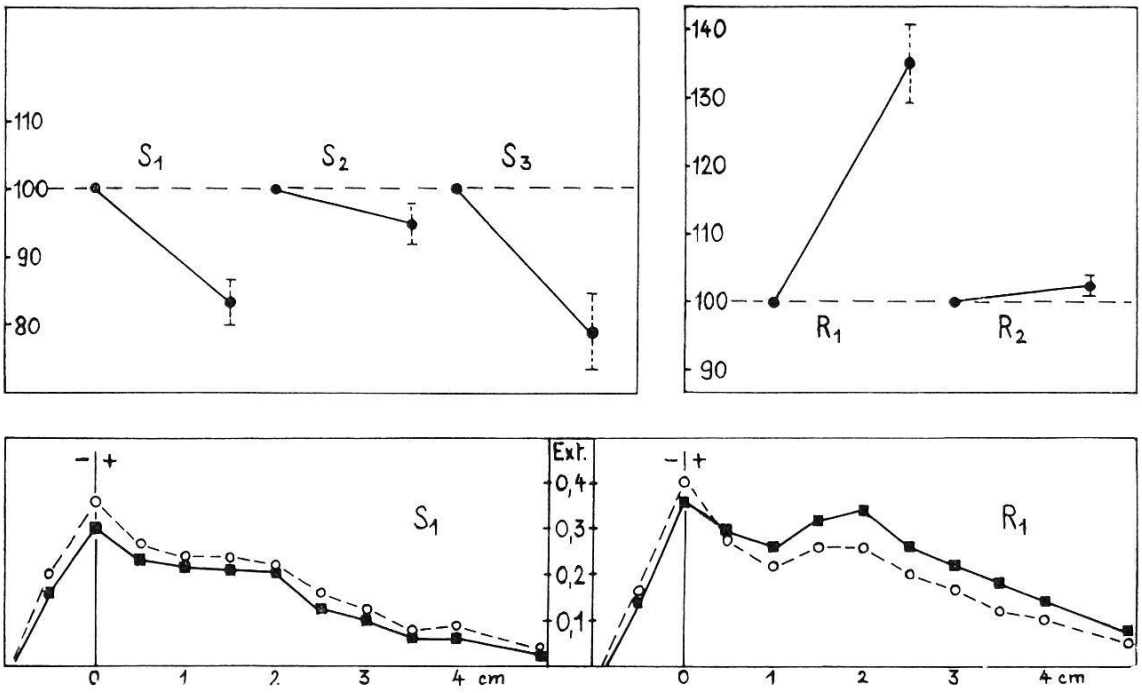


Abb. 3. Änderung des Proteingehaltes der Haemolymphe unter Einwirkung der DDT-Substanz. Obere Reihe: Grundgehalt je als 100% gesetzt, Veränderung nach Kontakt im Verhältnis zu unbehandelt (6 Versuche). Untere Reihe: Extinktionskurven von je 4 Elpherogrammen nach Bromphenolblau-Reaktion. Papierelektrophorese mit Elphor H, 110 V, M/15 Phosphatpuffer, pH 8,04. Kurve gestrichelt = unbehandelt, Kurve ausgezogen = behandelte Fliegen.

nahme nach Kontakt eher in den wandernden Anteilen äußert, ist mit dieser Methode eine Zuordnung zu einer bestimmten Fraktion nicht möglich. Somit treten sehr wahrscheinlich bei Proteinen und Aminosäuren des Blutes behandelter Fliegen nur Veränderungen des ganzen Systems auf.

c) Weitere Prüfungen der Protein-Änderungen.

In einigen Proben zur Gesamt-N-Bestimmung nach dem Mikroverfahren von BOELL und SHEN (9) mit Haemolymphe des R_1-Stammes wurde erhalten:

Blut unbehandelter Fliegen	61 γ N_2 pro 0,1 ml
Blut nach 1 Std. Kontaktversuch	98 γ N_2 pro 0,1 ml

(Die Bestimmung verdanken wir Herrn PD. Dr. R. Weber, Bern.)

Der Anstieg bei behandelten R_1-Fliegen auf 161% stimmt mit den Chromatographie- und Elektrophorese-Resultaten gut überein (158%), so daß eindeutig eine Substratzunahme vorliegt.

Eine mögliche Veränderung der Extraktwerte, denkbar durch Verbindungen Insektizid+Proteinanteile, war nicht nachzuweisen. In je 7 Versuchen wurden zu 0,1 ml Haemolymphelösung unbehandelter Tiere des S_1- und R_1-Stammes 15 γ DDT-Substanz in

0,01 ml Aethanol zugesetzt und nach 30 Minuten Inkubation bei 25° C die Bestimmung der Vergleichswerte mit Ninhydrin und Bromphenolblau durchgeführt. Dieser Vitro-Versuch zeigte gegenüber den Kontrollen (Aethanolzusatz) bei S_1 +1%, bei R_1 —2%; also keine Ähnlichkeit mit den Reaktionen in vivo. Daher ist anzunehmen, daß R-Fliegen zur Abwehr des Insektizideinflusses eine Mobilisierung von Proteinanteilen aus dem Körper in die Haemolymphe ausführen können.

Diese Ansicht wurde bestätigt durch Versuche mit Modellsubstanzen, die Proteinschädigungen bewirken und als Zusatz (1 Teil) zur DDT-Substanz (10 Teile) im Kontakt appliziert wurden. Im Interesse einer kurzen Übersicht der Resultate sind die Aminosäuren- und Proteinwerte für S_1 und S_2, bzw. R_1 und R_2 zusammengefaßt. Der Vergleich der Reaktion auf dem Kombinationsbelag gegenüber demjenigen auf reiner DDT-Substanz ergab folgende Veränderungen der Summenwerte in der Haemolymphe:

Sublimat-Zusatz	sensibel	—10%,	resistent	—28%
Kristallviolett-Zusatz	»	—19%,	»	—43%
Acridinorange-Zusatz	»	+35%,	»	—24%

Prüfungen mit 0,5% Na-Azid oder Monojodessigsäure als Vorkontakt (30 Min.) und anschließendem Kontakt auf DDT-Substanz, ergaben im Aminosäurengehalt des Blutes bei R_1 eine Reduktion von ca. 50% durch Azid und ca. 30% durch Jodessigsäure.

Daraus ergibt sich, daß die Möglichkeiten der Zufuhr von Proteinanteilen in die Haemolymphe bei S und R verschieden sind und daß die Erhöhung des Proteinsubstrates bei R für die Abwehrleistung gegenüber der DDT-Substanz entscheidend ist. Mit den Kombinationen wird bei R eine partielle Sensibilisierung erreicht. Nach 3 Stunden Kontakt verursachen die Farbstoffe und Jodessigsäure bei 10—20%, Sublimat und Na-Azid bei 30—50% der Versuchstiere Schädigungen mit typischen Vergiftungssymptomen der DDT-Substanz.

Bei S-Fliegen wird, außer bei Acridinorange, das den Proteinabbau fördern kann (10), eine zusätzliche Schädigung im Proteingehalt bewirkt, die aber die Vergiftung beim Kontakt nur wenig verstärkt.

Die Unterschiede im Aminosäuren- und Proteingehalt der Haemolymphe, die eine deutliche Trennung in S- und R-Reaktion beim Einfluß der DDT-Substanz erkennen lassen, sind für die Betrachtungen des Gesamtstoffwechsels und die Verteilung der Proteinkomponenten im Körper behandelter Fliegen von großer Bedeutung.

3. *Protein-Änderungen des Bauchmarkes.*

Die mit Hilfe von Papyrogrammen ausgewerteten Extrakte des thorakalen Ganglienkomplexes ergaben die in Tab. III zusammengestellten Ergebnisse. Beim Substrat-Grundgehalt sind außer den Stammunterschieden auch selektionstypische Merkmale vorhanden. Für ninhydrinpositive Stoffe gilt dies beim R_2-Stamm allerdings nicht. Werden aber beide Extraktanteile zusammen betrachtet, so ist die Erhöhung des Grundsubstrates bei R-Fliegen deutlich.

Als Wertänderungen bei behandelten Fliegen sind für die S-Stämme eindeutige Zunahmen des extrahiblen Gehaltes festzustellen. R-Stämme führen unterschiedliche Reaktionen aus. Faßt man auch hier die kleinmolekularen und die komplexeren Proteinanteile zusammen, und stellt man ferner die S-Stämme als Gruppe einheitlicher Reaktionen den R-Fliegen gegenüber, so erkennt man aus dem Gesamtwert der Veränderungen, daß R-Fliegen im Zentralnervensystem auf den Wirksubstanzeinfluß viel schwächer reagieren als sensible.

TABELLE III.

Extrakte von Proteinanteilen aus Bauchmark. Grundgehalt auf S_1 bezogen. Veränderung je im Verhältnis zu unbehandelten Fliegen. Durchschnitte aus 4 bis 6 Bestimmungen.

Stamm	Ninhydrinpositiv		Proteinanteile		Gesamt-Veränderung
	Grundgehalt	Veränderung	Grundgehalt	Veränderung	
S_1	100	+ 9	100	+ 9	S-Gruppe
S_2	96	+ 21	108	+ 29	+ 18 ± 2,9 (n = 24)
S_3	104	+ 13	98	+ 26	
R_1	149	— 7	137	+ 14	R-Gruppe
R_2	106	+ 1	120	— 3	+ 1 ± 3,5 (n = 12)

4. *Gesamt-N-Gehalt im Fliegenkörper.*

Aus Vorversuchen mit färberischem Nachweis der Proteinanteile war uns bekannt, daß im gesamten Fliegenkörper die Unterschiede zwischen behandeltem und unbehandeltem Material bedeutend geringer sind als in den einzelnen Organen. Anstelle dieser Bearbeitung wurde mit der Kjeldahlmethode (60) der Gesamtstickstoffgehalt bestimmt. In folgenden Zahlen sind die N_2-Werte in % des Frischgewichtes bei unbehandelten Fliegen und nach 1 Std. Kontakt auf DDT-Substanz angegeben:

S_1	unbehandelt	2,31;	behandelt	2,24;	Veränderung	—3,0%
S_2	»	2,50;	»	2,42;	»	—3,2%
R_1	»	2,12;	»	2,24;	»	+5,7%
R_2	»	2,26;	»	2,39;	»	+5,8%

Im Grundgehalt (unbehandelt) besitzen die S-Stämme einen etwas höheren N_2-Wert als die R-Stämme. Nach Kontakt ist bei sensiblen eine leichte Abnahme, bei resistenten eine leichte Zunahme der Werte zu beobachten. An sich sind diese Unterschiede gering; da jedoch jeder Zahlenwert wenigstens 50 Bestimmungen und den Überblick größerer Zeiträume in den Zuchtfolgen umfaßt, scheint sich ein der Resistenz zuzuordnendes Phänomen anzuzeigen.

Die Werte des Gesamt-N-Gehaltes können als Indizien für Bilanzierungen im ganzen Körper gelten und sind daher im Vergleich mit Atmungsbefunden höchst aufschlußreich. Der respiratorische Quotient (RQ) unbehandelter Fliegen liegt für S_1 und R_1 um 0,9 und für S_2 und R_2 um 0,8. Unter Einwirkung der DDT-Substanz ist bei den S-Stämmen eine leichte Zunahme des RQ, bei R_1 eine Annäherung an 1,0, bei R_2 eine Senkung unter 0,8 festzustellen (7). Bezieht man die RQ-Werte auf das voraussichtlich in erster Linie veratmete Material, so wäre RQ 0,9 annähernd als «Eiweiß-Quotient» und 0,8 als «Fett-Quotient» zu bezeichnen. Kohlehydrate (RQ 1,0) und organische Säuren (RQ unter 0,8) beeinflussen selbstverständlich die experimentell gefundenen Werte. Das Resultat kann also nur als Hinweis und als gewisse Analogie zu den Veränderungen im N_2-Gehalt dienen.

Für sensible Fliegen decken sich die Befunde, indem sie eine Tendenz zur «Eiweißatmung» hin aufweisen und im Kjeldahl-Versuch von ihrem höheren Ausgangsgehalt aus, bei Vergiftung mit DDT-Substanz, einen leichten Verlust an N-Komponenten zeigen. Die resistenten Fliegen reagieren mit leichter N_2-Zunahme, ihre Atmung wird aber verschieden gesteuert: R_1 weist mehr einen «Glucose-RQ» und R_2 mehr einen durch Veratmung von Fett- und organischen Säuren bedingten Quotienten auf. Es scheint also, daß bei R-Fliegen der Stickstoffgehalt nicht nur stabiler ist als bei S, sondern daß sogar durch die Einwirkung der DDT-Substanz eine relative Vermehrung lebensnotwendiger N-Komplexe eintritt, deren protektive Funktionen den Resistenzgrad positiv beeinflussen können.

V. Beteiligung von Lipoidkomponenten.

Die deutlichen Unterschiede in Menge und Beschaffenheit der Lipoide von R- und S-Fliegen, besonders bei Einwirkung der DDT-Substanz (6, 66, 92), sowie die hohe Affinität dieses Insektizides zu Fettstrukturen gaben Anlaß, diesem Stoffwechselanteil größere Beachtung zu widmen. Auch beim Wirbeltier sind Speicherungsvorgänge der DDT-Substanz im Fettgewebe auffallend und bei behandelten Pflanzen wenigstens im Depoteffekt vergleichbare Reaktionen vorhanden. Ferner ist bei analytischen Nachweisen eine scharfe Trennung von Aktivsubstanz und Lipoiden erforderlich (Literaturübersicht 49, 88). Wir haben deshalb versucht, die Beteiligung von Lipoiden im Resistenzgeschehen als spezifisches oder unspezifisches Substrat, sowohl allein als auch im Komplex mit anderen Stoffen, in die Untersuchungen und die Gesamtbeurteilung einzubeziehen.

1. Acetonlöslicher Lipoidgehalt in Organen und Körper.

In Tab. IV sind Durchschnittswerte aufgeführt, die aus der Summierung großer, zeitlich getrennter Versuchsreihen berechnet wurden.

Bei unbehandelten Fliegen ist im Grundgehalt die bekannte Tatsache zu erkennen, daß höhere Lipoidwerte bei den R-Stämmen als selektionstypische Merkmale hervortreten. Nach Kontakt zeigen Fliegen der S-Stämme einheitliche Reaktionen: Zunahme der Werte in Tarsen und Körper, Abnahme in Haemolymphe und Bauchmark. R_1 und R_2 weisen in den Organen und im Körper unterschiedliche Leistungen auf. Bei R_1 liegen im Blut und Bauchmark, bei R_2 in den Tarsen protektiv deutbare Regulationen vor,

TABELLE IV.

Relative Werte der acetonlöslichen Lipoidanteile aus Organen und ganzem Körper. Grundgehalt auf S_1 bezogen, Wertveränderungen nach 1 Std. Kontakt in % zu unbehandelten Fliegen bei jedem Stamm. Organextrakte kolorimetrisch, Körperextrakte gravimetrisch bestimmt.

Stamm	*Tarsen*		*Haemolymphe*		*Bauchmark*		*Körper*	
	Gehalt	Verändg.	Gehalt	Verändg.	Gehalt	Verändg.	Gehalt	Verändg.
S_1	100	+ 27	100	— 19	100	— 18	100	+ 19
S_2	92	+ 38	73	— 12	101	— 9	130	+ 13
S_3	98	+ 33	95	— 29	104	— 8	101	+ 6
R_1	122	+ 17	115	+ 23	124	+ 39	130	+ 3
R_2	129	— 12	107	— 24	117	— 7	167	— 6

mit klaren Gegensätzen zum S-Effekt. Diese Eigenschaften des höheren Grundgehaltes und der Substratänderungen in den Organen resistenter Fliegen kommen auch bei «resistenten Varianten» aus sensiblen Stämmen, die einen Kurzkontakt von 5—10 Minuten auf DDT-Substanz überleben, zur Geltung (68).

Über die spezielle Natur der Veränderungen der acetonlöslichen Lipoidanteile der Organe sind keine genauen Tatsachen bekannt. Verschiedene Verfahren der Papierchromatographie haben bisher versagt, da die Extrakte sehr komplex zusammengesetzt sind. Dagegen konnte auf indirektem Wege, mit Hilfe anderer Extraktionsverfahren und Biotesten, ein weiterer Einblick gewonnen und die biologische Bedeutung der Änderungen der Substratkomplexe näher begründet werden.

2. *Lipoidgehalt in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und bei Extraktionsfolgen.*

Die Vielfalt der im Fliegenkörper vorhandenen Lipostrukturen kommt in Abb. 4 zum Ausdruck. Wird an Stelle von Aceton ein anderes Extraktionsmittel verwendet, so sind die Mengenverhältnisse bei unbehandelten Fliegen stark verändert. Bei Mehrfachextraktionen mit Wechsel von polaren und apolaren Lösungsmitteln zeigt sich die Stammspezifität der Lipokomplexe noch deutlicher. Als Beispiel einer Extraktfolge (Aceton-Aethylaether-Chloroform-Aethylalkohol) sind die gravimetrisch ermittelten

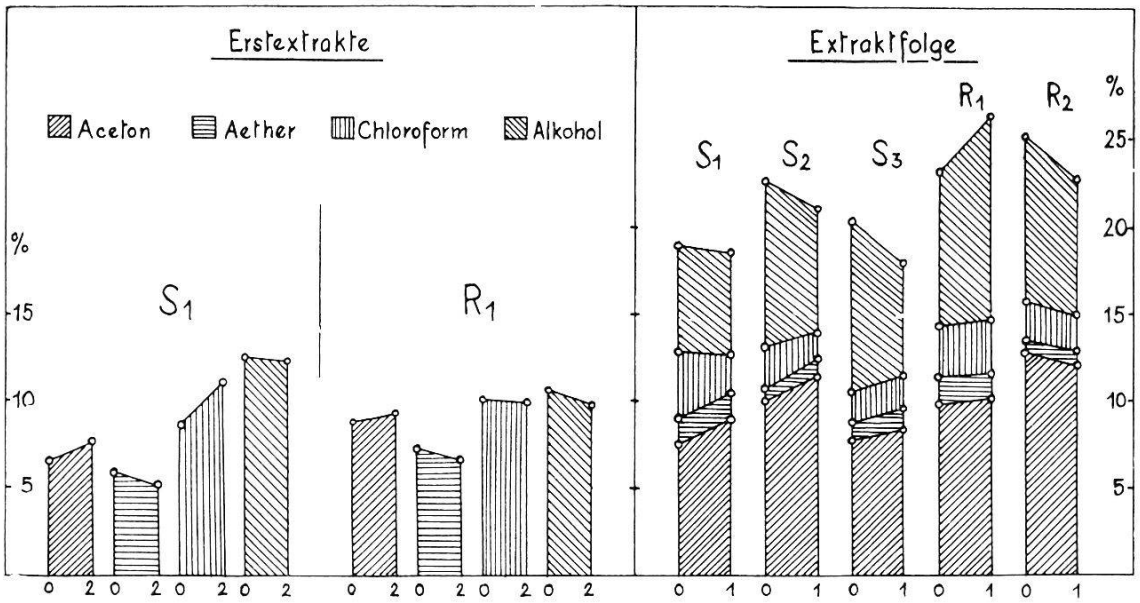


Abb. 4. Lipoidextrakte aus Fliegenkörper. Unterschiede der Extrahibilität in Abhängigkeit des Lösungsmittels im Erstextrakt (links) und bei der Extraktionsfolge Aceton—Aethylaether—Chloroform—Aethylalkohol (rechts). Mengenangaben in % des Trockengewichts. Grundgehalt unbehandelt (0) und Werte nach 2 Std. (2), bzw. 1 Std. Kontakt (1). Durchschnitte aus 8—10 Versuchen.

Werte der Auszüge für alle Stämme angegeben. Wird die Reihenfolge gewechselt, resultieren wieder andere Verteilungsbilder (6). Sowohl bei Erstextrakten als auch bei Extraktfolgen sind die Anteile der aetherlöslichen Fraktion immer geringer als diejenigen der anderen Lösungsmittel. Die relativ hohen Werte der Alkoholextraktion sind neben Lipoidkomponenten durch größere Mengen von Stickstoffverbindungen bedingt (positive Ninhydrinreaktion und Kjeldahl-Nachweis). Da diese N-Werte der Alkoholfraktion bei R-Fliegen 10—20% höher sind als bei S (im Gesamtfett der 4 Extraktionen sogar 20—40%), ist zu vermuten, daß bei R die Lipoide inniger mit N-Anteilen verkettet sind.

Bei unbehandelten Fliegen sind in allen Fällen neue Lösungsverhältnisse entstanden. Dies bedeutet, daß unter Insektizideinfluß die Lipoide in ihrer Zusammensetzung verändert worden sind. Nach LEA et al. (36) wird die Löslichkeit eines individuellen Lipoides durch die Gegenwart anderer Lipoide oder Lipoidanteile beeinflußt. In unserem Falle wäre durch spezifische Veränderungen von Einzelkomponenten bei S-Stämmen die entsprechende Vermehrung der acetonextrahiblen Anteile denkbar. Bei den folgenden Lösungsmitteln zeigt sich in summa ein kleiner Verlust. Demgegenüber erweisen sich die R-Fliegen im Lipoidwechsel relativ stabiler, die deutlichsten Veränderungen sind nur in der Alkoholfraktion faßbar, wo unterschiedliche Reaktionen vorliegen.

Für die Resistenzforschung ist nun zu prüfen, ob Strukturwechsel der Lipokomplexe für S als Schädigungsreaktion und für R als Protektivfunktion aufzufassen sind.

3. Untersuchungen zur Deutung der Lipoidänderungen.

Ricinuslipase, nach Vorschrift von PEACH-SIMONIS (58) gewonnen, vermindert bei Injektion in S-Fliegen den Sensibilitätsgrad (92). «Fliegen»-Lipase nach der gleichen Methode aus 1000 Fliegen des R_1-Stammes extrahiert, erzielt bei Injektion in S_1-Fliegen keine eindeutige Wirkung. Die Ausbeute der aus Fliegen extrahierten Lipase ist bei S_1 geringer als bei R_1. Injektion von Pankreas-Lipase (Schuchardt) führt zu besseren Ergebnissen: S-Fliegen weisen bei Kontakt verzögert eintretende Vergiftung auf (5—20% innerhalb 2 Stunden), R-Tiere hingegen zeigen eine Teilsensibilisierung von 11—18%. Bei Beobachtung bis zu 8 Stunden erholen sich die R-Fliegen wieder, bei den sensiblen jedoch setzen sich die typischen Wirkungen der DDT-Substanz durch.

Lipaseapplikation kann somit Empfindlichkeit und Resistenzgrad der Fliegen beeinflussen und wenigstens vorübergehend umsteuern. Kombination von Lipase mit Papain verstärkt diese Ef-

fekte (7). Da jedoch in keinem Falle die «Teilresistenz» der Sensiblen zu einem echten Überleben führt, muß angenommen werden, daß durch solche zusätzliche fermentative Beeinflussung wohl die Vergiftungswirkungen verzögert, R-Regulationen jedoch nicht ausgelöst werden können.

Wenn man Kombinationsbeläge von DDT-Aktivsubstanz und Sublimat (10:1 mg) verwendet und nach 1 Stunde Kontakt die Tarsen, bzw. die ganzen Körper, mit Aceton extrahiert, so ist die erhaltene Lipoidmenge stets geringer als bei Insektizidkontakt allein:

	S_1	S_2	R_1	R_2
Tarsen	—29	—61	—28	—13%
Körper	—13	—39	—20	—11%

Sublimat bewirkt in Kombination eine allgemeine Vergiftung und verschiedene, wenig spezifische Fermentschädigungen. Dadurch wird eine Teilsensibilität bei R-Fliegen ausgelöst; 25—50% werden innerhalb 6—8 Stunden getötet, jedoch ist keine absolute Blockierung der Abwehrfunktionen eingetreten (7), und die geschädigten R-Tiere führen ohne Erholung 2—3 Stunden länger als vergiftete S-Tiere in Rückenlage heftige Tremorbewegungen aus.

Außer der Störung des Reaktionsverhaltens von S und R durch zusätzliche fermentative Reaktionen oder toxische Beeinflussungen, muß auch die mehr physikochemisch bedingte Speicherung der DDT-Substanz in den Lipoiden berücksichtigt werden. Veränderungen der Lipokomplexe zeigten sich vorerst in unterschiedlicher Extrahibilität. Wieweit diese in vivo bedeutungsvoll sein können, sollten Bioteste erklären helfen (6, 92). Wir können hier nur einen kleinen Ausschnitt aus den vielgestaltigen Untersuchungen geben.

Bei großen Versuchsserien wurde z. B. zu 10 mg Acetonextrakt der Körper unbehandelter oder behandelter S- und R-Fliegen 1 mg DDT-Substanz zugesetzt. Die Kombinationsbeläge auf Filterpapieren wurden anschließend mit S_3-Fliegen getestet. Als Kontrolle diente DDT-Substanz ohne Lipoid. Die Fettextrakte vermögen einen bedeutenden Teil der Kontaktwirkung abzufangen, es tritt also eine Verzögerung der Insektizidvergiftung bei den S_3-Testfliegen auf.

Die Resultate aus Tab. V sind Durchschnittswerte aus je etwa 10 Versuchsreihen und geben die Reaktionsverzögerung in % gegenüber den nur mit Insektizid behandelten Kontrollen an. Es ist ersichtlich, daß die Extrakte von unbehandelten S- und R-Fliegen (a) in allen Fällen eine relativ hohe «Protektivwirkung» verursachen. Derselbe Teil mit Acetonauszügen von behandelten Fliegen

TABELLE V.

Bioteste mit Fliegen, S_3-Stamm, auf Belägen mit Lipoidextrakten (1 mg DDT-Substanz + 10 mg Acetonextrakt der 4 verschiedenen Stämme, Belag auf Filterpapier, Kontrollen DDT-Substanz ohne Extrakt). Die Zahlen unter a) und b) geben die Verzögerung der Insektizidvergiftung durch die Kombination innerhalb 2½ Std. im Unterschied zu den Kontrollen auf DDT-Substanz allein an. Acetonextrakte von b) zeigen allein, ohne Insektizidzusatz, keine Schädigung der S_3-Testfliegen.

	S_2	S_3	R_1	R_2
a) Extrakt unbehandelter Fliegen	— 32 %	— 39 %	— 43 %	— 29 %
b) Extrakt behandelter Fliegen	— 22 %	- 22 %	— 34 %	— 25 %
c) Abnahme der Protektivfunktion, b) gegenüber a)	1/3	2/5	1/5	1/7

(b) ergibt ein verändertes Bild: Bei S und R sind Verluste der Schutzfunktionen zu registrieren, das Ausmaß des Abfalles ist jedoch bei S bedeutend größer. R-Fliegen besitzen demnach in den Lipoidanteilen höhere Potenzen für das Abfangen von DDT-Substanz.

Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Befunden der Speicherungsfähigkeit von DDT-Substanz in Tarsenlipoiden (97) überein. Nach verschiedenen Kontaktzeiten blieb bei R-Extrakten das Speicherungsvermögen erhalten, und bei S-Fliegen erfolgte ein Zusammenbruch. Im Anschluß an jene Versuche wurden nun Tarsenextrakte mit Pankreas-Lipase inkubiert (3—12 Std.) und nachher das Speicherungsvermögen der Lipoide bestimmt. Nach dem Enzymeinfluß zeigt S_1-Extrakt noch $^1/_3$, R_1-Extrakt noch $^1/_4$ der ursprünglichen Speicherungsfähigkeit. Demnach sind besondere Komplexstrukturen der Lipoide für eine gute Protektivwirkung verantwortlich.

Für die tatsächlichen Vorgänge in vivo hat der Biotest keine zwingende Beweiskraft, da es sich bei diesen Modellversuchen um ein zusätzlich an den Tarsen vorgeschaltetes Filter handelt. Eigenartig erscheint hierbei die verhältnismäßig hohe Protektivleistung der S-Lipoide von unbehandelten Tieren. Normalerweise treten doch bei S-Fliegen nach kurzer Kontaktzeit auf DDT-Substanz die Vergiftungserscheinungen ein. Wir vermuten daher, daß bei S-Tieren die raschere Lipoidveränderung, wie sie sich in der Extrahibilität äußert, in vivo einen starken Verlust der physikalisch-chemischen Potenzen bedingt und daß R-Fliegen die Lipoide «besser» verwerten können. Nicht zuletzt muß daran gedacht werden, daß neben Lipoidmenge, Zusammensetzung und Neigung zur Komplexbildung mit anderen Substraten das Eingreifen des gesamten Stoffwechsels die Richtung der Reaktionen verändern

kann. In diesem Zusammenhang wurden über 80 Substanzen (Fettsäuren, Naturfette, Phosphatide, Sterine, organische Säuren, Kohlehydrate, Eiweißpräparate u. a.) in Kombination mit DDT-Substanz und mit Lipoidextrakten von Fliegen geprüft (6). Für die Komponenten der Lipostrukturen ergab sich daraus, daß verschiedene ungesättigte Fettsäuren deutliche Protektiveffekte ausüben. Auch Cholesterin sowie z. B. Olivenöl und Bienenwachs besitzen gute Abfangpotenzen für die DDT-Substanz. Dagegen entfalten Öl-, Palmitin- und Stearinsäure sowie Triolein u. a. keine echten Schutzwirkungen im Kombinationskontakt, zum Teil tritt sogar Verstärkung des Insektizideffektes ein.

Wie weit diese in vitro nachgewiesenen Veränderungen auch die Prozesse in vivo bestimmen, kann nicht entschieden werden, die Bioteste vermitteln nur eine Modellvorstellung des tatsächlichen Ablaufs. Zweifellos sind aber physikochemische Vorgänge an den Lipostrukturen bei der protektiven Leistung der R-Fliegen beteiligt.

VI. Beteiligung anderer Stoffe und Systeme.

Im intakten Organismus liegen mit dem Plasma, Fermenteiweiß und einer Vielzahl von Substraten, deren Anwesenheit direkt oder indirekt erforderlich sein kann, Bedingungen vor, bei denen scheinbar geringfügige Veränderungen von vitaler Bedeutung sind. Vielfach sind solche Änderungen von Begleiteffekten überdeckt, so daß ihr tatsächliches Eingreifen im Gesamtablauf schwer nachweisbar wird. Dennoch kann man aus Untersuchungen, die die Summe solcher Reaktionen umfassen, Hinweise auf Beteiligungen gewinnen. So ist z. B. im meßbaren Gasstoffwechsel eine solche Summenreaktion der gesamten dissimatorischen Vorgänge zu sehen.

1. Atmung.

Bei in vitro-Untersuchungen der Atmung von Insektengewebe unter Einfluß der DDT-Substanz konnte eine Cytochromoxydase-Wirkung nachgewiesen werden (30), in vivo war bei *Musca* eine Steigerung der Atmungsintensität besonders deutlich bei S-Fliegen zu beobachten (74, 22). Messungen unserer Stämme (7) ergab ebenfalls starke Zunahme des Gasstoffwechsels bei behandelten S- und geringe Erhöhung bei R-Fliegen. Bei unbehandelten Tieren bestehen zwischen den Stämmen nur geringe Unterschiede. Die in Abb. 5 gezeigten Werte für die gesamte O_2-Aufnahme innerhalb 8 Stunden belegt diese Situation.

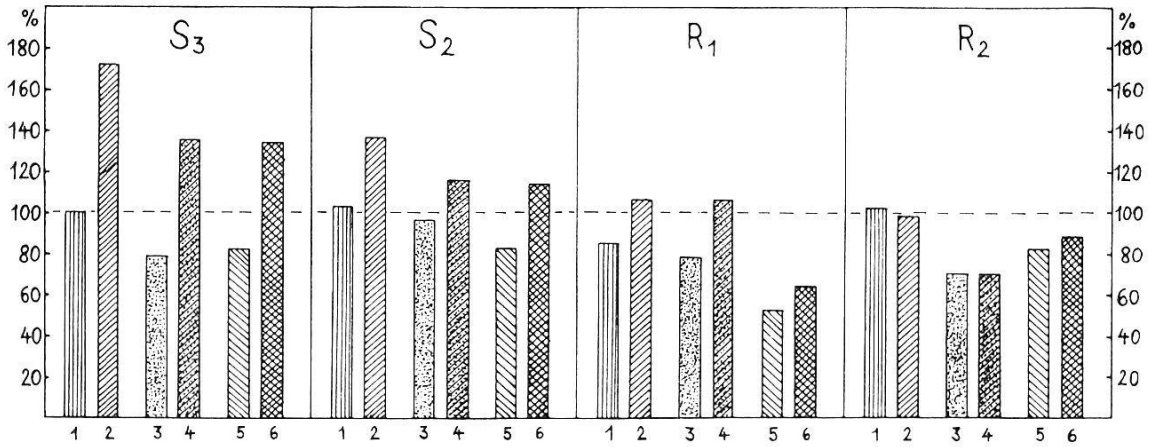


Abb. 5. Gesamt-O_2-Aufnahme unbehandelter und behandelter Fliegen innerhalb 8 Std. Berechnung pro g Trockengewicht im Vergleich zu S_3 unbehandelt = 100%. Nummern unter den Säulen bedeuten: 1 = unbehandelt; 2 = Kontakt auf DDT-W'S; 3 = Lipase-Injektion; 4 = Lipase + DDT-W'S-Kontakt; 5 = Papain-Injektion; 6 = Papain + DDT-W'S-Kontakt.

Zusätzliche Injektion von Fermentlösungen (Lipase, Papain) kupiert bei S-Fliegen einen Teil der durch das Insektizid ausgelösten Atmungssteigerung, gleichzeitig ist innerhalb von 2—3 Stunden eine Verzögerung der Vergiftung zu beobachten. R-Fliegen werden zwar durch diese Injektionen teilsensibilisiert, die Sauerstoffaufnahme wird jedoch nicht den S-Effekten angeglichen. Nach Lipaseinjektion und anschließender Einwirkung von DDT-Substanz zeigt R_1, nicht aber R_2, eine leicht verstärkte O_2-Aufnahme, entsprechend dem Sensibilisierungsgrad. Der Einfluß von Papain ist bei beiden R-Stämmen prinzipiell ähnlich und läßt bei der Atmung keine dem S-Verhalten entsprechende Wirkung beobachten, obgleich eine Teilsensibilisierung ausgelöst wird.

Die respiratorischen Quotienten nach Kontakt lassen bei allen von uns untersuchten Stämmen vermuten, daß Fliegen, ähnlich wie Schmetterlinge (99), ihren Energiebedarf in hohem Maße von Lipoproteiden her decken. Dieser Lipoproteidspiegel ist bei R-Typen an sich höher und stabiler als bei S-Fliegen, was sich auch in den Atmungskurven manifestiert (7).

Fütterungsversuche an adulten Fliegen mit eiweißreicher Diät führten weder im Atmungs- noch im Kontakttest bei S und R zu einer Resistenzsteigerung. Wurden R_1-Larven reichlich mit Eiweiß gefüttert, so waren die Imagines jedoch etwas sensibler als die wie üblich gehaltenen Tiere, ihre Atmung mehr den sensiblen angenähert, der Lipoidgehalt der Körper etwas verringert, und im Biotest waren die Acetonextrakte weniger protektiv wirksam. Der Cholesteringehalt dieser Fette war um 15—20% geringer als beim «normal» gehaltenen R_1-Stamm. Es erweist sich aus den Versuchen, daß zusätzliche Eiweißgaben die Protektivwirkung nicht

unbedingt unterstützen. Im Organismus vorliegende Lipoproteide hingegen scheinen entscheidend an den Regulationen beteiligt zu sein.

2. *Kohlehydrate und organische Säuren.*

Nachweis von Glykogen mit der Jodstärkereaktion und dem Verfahren nach GLICK (25) führten bei Totalhomogenaten und Trockenpulverpräparaten von Fliegen zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Folglich wurde der Gehalt an reduzierenden Zuckern (nach 56, 83) bestimmt. Die Werte unbehandelter Fliegen waren gruppenweise bei R höher als bei S, wobei S_1 und R_1 einen geringeren Gehalt (2,7/3,2) als S_2 und R_2 (4,6/5,8) aufwiesen. Bei behandelten Tieren wurde bei S_1 und R_1 ein Anstieg (+15%/+10%) und bei S_2/R_2 eine Abnahme (—22%/—7%) festgestellt. Direkte resistenztypische Merkmale waren also nicht zu finden.

Parallel geführte Fütterungsversuche der Imagines mit verschiedenen Kohlehydraten (Saccharose, Glukose, Fruktose etc.) ließen bei anschließendem Kontakt in keinem Falle Schutzwirkungen beobachten. Relativ günstiger und schwach protektiv gegenüber Insektizidwirkung erwiesen sich Honiglösungen, deren Wirkung aber wegen Fermentgehalt, Biosstoffen etc. nicht von Kohlehydraten allein abhängig ist. Kontakt-Bioteste mit Zuckern in Kombination mit DDT-Substanz ließen schwache «Protektiv-Wirkungen» beobachten, die aber eher auf eine Beeinflussung der Tarsen durch rein physikalische Effekte zurückzuführen waren, zumal makromolekulare Kohlehydrate (Pflanzenstärke u. a.) auch den Insektizideffekt deutlich zurückhielten.

Organische Säuren hingegen, wie Brenztraubensäure, Bernsteinsäure u. a. konnten verschiedentlich im Fütterungs- wie Biotest echte Protektivwirkungen entfalten. Da jedoch der Gehalt an organischen Säuren in den Fliegen noch nicht näher untersucht wurde, wird auf weitere Darstellung dieser Befunde verzichtet.

3. *Phosphatstoffwechsel*

Der Gesamtgehalt an nachweisbarem anorganischem Phosphat im Fliegenkörper wies nur geringfügige Stammesunterschiede auf (S_1 0.38, R_1 0.36; S_2 0.34; R_2 0.31). Nach Kontakt war bei S_1 und R_1 entsprechend der Zunahme an reduzierenden Zuckern eine schwache Vermehrung an anorganischem Phosphat zu beobachten (+5/+11%). S_2 und R_2 hingegen hatten erniedrigte Phosphatwerte (—18/—3%).

Die Messung von «saurer» und «alkalischer» Phosphatase ergab in Übereinstimmung mit BARKER und ALEXANDER (4) bei un-

TABELLE VI.

Gesamt-Phosphatase-Aktivität in Fliegenkörpern.
ub. = Kontrolle unbehandelt, Realwerte. beh. = 1 Std. Kontakt auf DDT-Substanz, Veränderungen in % gegenüber ub.

	S_1		R_1		S_2		R_2	
	ub.	beh.	ub.	beh.	ub.	beh.	ub.	beh.
«saure» Phosphatase	9,0	− 10%	8,9	+ 11%	12,0	+ 9%	12,4	− 16%
«Alkali» Phosphatase	2,8	− 39%	3,2	− 18%	2,3	− 17%	4,0	− 31%

behandelten Fliegen hohe Aktivitäten, die stammspezifisch waren (Tab. 6).

Bezüglich der sauren Phosphatase waren wieder gruppenweise S_1 und R_1, andererseits S_2 und R_2 fast gleich aktiv. Nur nach Kontakt wurden die unterschiedlichen Reaktionen aufgedeckt, die jedoch nicht mit der Empfindlichkeit gegenüber dem Insektizid koordinierbar sind. Eine direkte Beteiligung mit R-typischen Reaktionen scheint daher bei den Phosphatasen nicht vorzuliegen.

4. Weitere Fermentsysteme.

Bei der Prüfung einer größeren Anzahl fermenthemmender Stoffe im Kontaktversuch (Kombinationskontakt mit DDT-Substanz) wurde bei R-Fliegen mit Sublimat, Silbernitrat, Na-azid, Na-arsenat, einigen Phenolen und proteinaktiven Farbstoffen sensibilisierende Wirkung erzielt. Von diesen Inhibitoren war allein das Sublimat imstande, die Zunahme der Atmung bei S-Fliegen schnell und deutlich zu beschneiden, aber auch R-Fliegen zeigten Atmungsreduktion (7). Kolorimetrische Untersuchung der Homogenate von Sublimat/Insektizid-behandelten Fliegen lassen bei Zusatz von Triphenyltetrazolchlorid (TTC) eine mehr Sublimat-abhängige Vergiftung erkennen.

Eine Reihe von weiteren Stoffen, die als eventuelle, katalytisch eingreifende Substanzen in die Untersuchungen einbezogen wurden, ergab keine weitere Klärung. Bei Kombinationstesten von DDT-Substanz mit Schwermetallen wurde keine wesentliche Beeinflussung der S- und R-Reaktion beobachtet. Metallisches Jod, Chromat und Molybdat setzten die Resistenz wohl herab, waren jedoch auch bei S-Fliegen toxisch. Nickel-, Ferro-, Ferri-, Blei- und Zink-Verbindungen hatten schwache Sensibilisierungen zur Folge. Magnesiumverbindungen erwiesen sich schwach, jedoch nicht eindeutig protektiv wirksam.

Einen höheren Eisengehalt der R-Typen (28) konnten wir bei unseren Stämmen nicht bestätigen, S-Fliegen enthielten sogar mehr Fe als R-Fliegen. Der Kupfergehalt war bei allen Stämmen praktisch gleich (Übereinstimmung mit RINGEL, 72).

Die Untersuchung weiterer Fermentaktivitäten ergab folgende Resultate:

Die Katalase unbehandelter Fliegen war bei R_1 und R_2 nur 10—30% höher aktiv als bei S_1. Kontakt auf DDT-Substanz verstärkte bei allen Stämmen die Aktivitäten. Eine direkte R-typische Leistung war also nicht nachzuweisen.

Mit der Triphenyltetrazolchlorid (TTC)-Reaktion konnte in Homogenaten nachgewiesen werden, daß SH-Fermente bei unbehandelten R-Fliegen aktiver sind als bei S (S_1:R_1 wie 1,0:1,6). Nach Kontakt wurden bei S_1-Abnahmen von 22—40% und bei R_1-Zunahmen von 9—16% festgestellt. Kombination mit Jodazetat (Kontakt) setzte die SH-Aktivität bei S und R herab. Dabei wurde bei R_1 eine Teilsensibilisierung von 15% beobachtet, und S_1 wurde in Kombination beschleunigt vergiftet.

Die kolorimetrisch geprüfte allgemeine Esteraseaktivität ergab im Grundspiegel keine R-typische Reaktion (S_1 4.1, R_1 4.4, R_2 6.4 und S_2 6.9), unter Insektizideinwirkung wurde jedoch eine verstärkte Aktivität bei R-Fliegen beobachtet (R_1 +41%, R_2 +28%); die S-Fliegen reagierten gleichfalls mit einer Verstärkung nach Vergiftung, ohne jedoch die höheren Werte von R zu erreichen (S_1 +10%, S_2 +11%). Diese Esterasewirkung scheint im Zusammenhang mit dem Lipoid- und Proteinstoffwechsel zu stehen, die nach unseren Beobachtungen am deutlichsten direkt mit der Einwirkung des Insektizides korreliert sind.

Bei verschiedenen Fermentsystemen hat sich gezeigt, daß die Enzymleistungen bei R-Fliegen höher sind, sowie unter Insektizideinfluß nicht oder weniger stark beeinträchtigt werden als bei S. Dies gilt z. B. auch für die Fermente der Rüsselspeicheldrüse (95, 96). Amylase-, Invertase- und Protease-Aktivitäten sind bei R-Fliegen deutlich höher als bei S. Auch diese, dem inneren Stoffwechsel nicht direkt beigeordneten Enzymfunktionen sind Kennzeichen für die allgemein leistungsfähigere Konstitution der R-Fliegen.

VII. Fluktuationen der Stammeigenschaften.

Es war unvermeidlich, daß während den vierjährigen Untersuchungen Fluktuationen innerhalb der Stämme auftraten, die den Gesamtvergleich der festgestellten Reaktionen erschweren.

Bei R-Stämmen kann ohnehin keine Stabilität der physiologi-

schen Eigenschaften erwartet werden, da hier der Selektionsvorgang sukzessive Genotypen eliminiert und eine R-Population mit neuen Summencharakteren schafft. Aber auch bei S-Stämmen bedingt die Zucht allein schon ungewollte, fortschreitende Veränderungen, die von einer Vielzahl von Faktoren abhängig sind. Trotz Konstanz der Außenfaktoren können endogen bedingte physiologische Veränderungen der Zuchtfliegen auftreten und innerhalb längerer Zeiträume im Gesamtspektrum der Eigenschaften («pattern») eine leichte Verschiebung des Reaktionsvermögens verursachen.

Bei der Registrierung der im Kontaktversuch eintretenden Vergiftungen beim S_1-Stamm war z. B. zu erkennen, daß im Verlaufe der Zucht über viele Generationen eine leichte Zunahme der partiell resistenten Fliegen auftrat (Abb. 6A). Dieses Phänomen haben wir — etwas weniger ausgeprägt — bei allen S-Stämmen und ferner bei neuen Anzuchten aus sensiblen Wildpopulationen bei sehr strenger Kontrolle festgestellt. Auch ein Vergleich von Lipoidextrakten über 3 Jahre (Abb. 6B) läßt eine Zunahme der acetonextrahiblen Anteile beobachten, diese Entwicklung ging also parallel den Testresultaten.

Die beiden in Abb. 6 registrierten Erscheinungen wurden statistisch nach folgendem Verfahren bearbeitet:

Aus 10 Stichproben eines Quartals, die stets auf je 200 Fliegenpaaren beruhen, wurden die Mittelwerte des Lipoidgehaltes berechnet und diese zu einer Varianzanalyse verwendet. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen dem ersten und dritten Untersuchungsjahr. Gleicherweise wurde die Be-

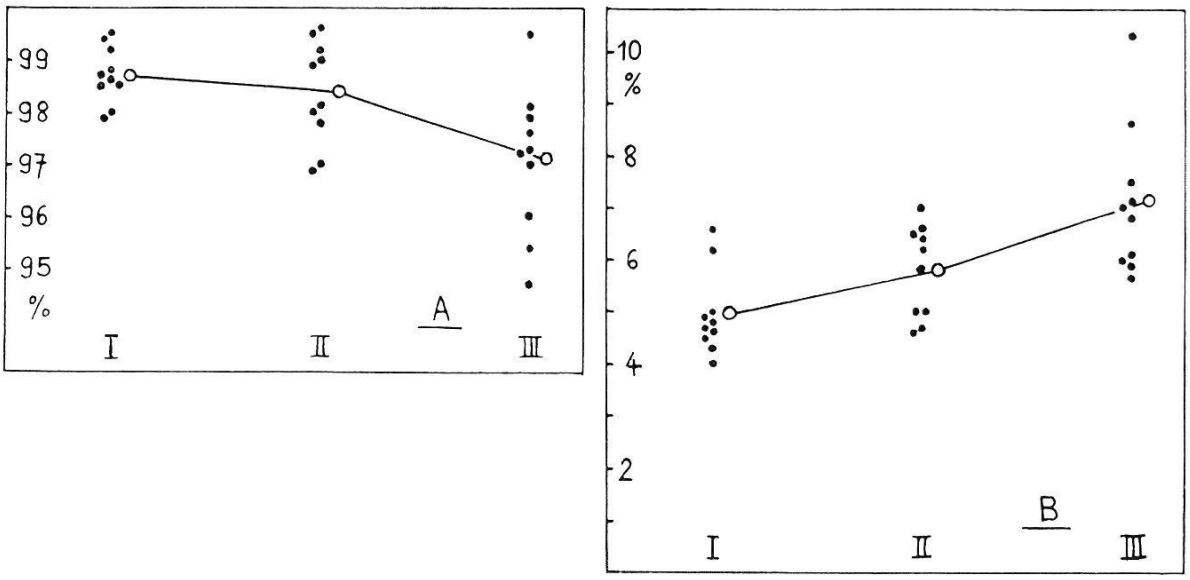


Abb. 6. Fluktuationen der Stammeigenschaften bei S_1 im Verlaufe größerer Zeitabschnitte. I = Januar—März 55; II = Januar—März 56; III = Oktober 56—Januar 57. A: R-Typen in S_1-Populationen nach 4 Std. Kontakt, theoretisch ist 100% Rückenlage zu erwarten. B: Leichter Anstieg der Werte von Acetonextrakten des Gesamtkörpers. Angaben in % von Trockengewicht.

TABELLE VII.

Statistische Sicherung der Differenzen von Kurvenbildern in Abb. 6 *.

	Quadrat. Abweichungen	Freiheitsgrade	S^2	F	P
Lipoidgehalt					
zwischen den Jahren	23, 43661	2	11,718	10,1	0,001
Rest	31, 12782	27	1,158		
zusammen	54, 56443	29			
Mindestdifferenz	Δ 0,01 = 1,53	Δ 0,05 = 1,19			
Sensibilitätsgrad					
zwischen den Jahren	15, 182	2	7,591	7,1	0,01 —
Rest	28, 890	27	1,070		0,001
zusammen	44, 072	29			
Mindestdifferenz	Δ 0,01 = 1,47	Δ 0,05 = 1,14			

wertung der Abnahme des Sensibilitätsgrades vorgenommen. Auch hier ergaben die 10 Mittelwerte pro Quartal eine deutliche Sicherung der Differenz I/III.

Die Differenzen der Mittelwerte beim Anstieg des Lipoidgehaltes und bei der Abnahme des Sensibilitätsgrades sind anstelle des einfachen T-Tests mit der etwas kritischeren Methode der «studentised range» (31, 61) beurteilt worden. Dabei läßt sich z. B. für P = 0,01 eine Mindestdifferenz Δ 0,01 angeben, die überschritten sein muß, damit eine Differenz hoch gesichert ist. Diese ist für die Lipoidkurve mit Δ 0,01 = 1,53, für die Sensibilitätskurve mit Δ 0,01 = 1,47 einzusetzen.

Mit der Differenz 2,146 ist beim Lipoidgehalt der Unterschied I/III hochgradig gesichert. Die Differenzen I/II bzw. II/III betragen 0,825 bzw. 1,321. Hier läßt sich nur mit P = 0,05 eine Sicherung für II/III erreichen (Mindestdifferenz 0,05 = 1,19). Bei der Sensibilitätskurve ist der Unterschied I/III mit 1,64 gut gesichert. Für die Zwischenwerte ergibt sich das gleiche Bild wie bei der Lipoidkurve. Für P = 0,05 muß die Mindestdifferenz Δ 0,05 = 1,14 betragen. Für I/II lautet der Unterschied 0,31 (nicht gesichert), für II/III 1,33 (gesichert).

Wir haben diese beiden Phänomene und ihre statistische Bewertung als Beispiele aus den Gesamtuntersuchungen ausgewählt, da sie eine grundsätzliche Aussage ermöglichen. In beiden Fällen sind die an sich geringen Unterschiede zwischen Anfangs- und Endwert (I/III Abb. 6) sehr gut gesichert, während die Differenzen bei I/II ungenügend, bei II/III nur für P = 0,05 gesichert sind. Da wir Veränderungen, die sich nur allmählich äußern, über längere Zeitspannen verglichen haben, ist die geringe Sicherung der Teilschritte verständlich. Dies kann aber nicht dahin interpretiert werden, daß keine Änderungstendenzen vorgelegen hätten, sondern

* Die statistische Beratung verdanken wir Dr. P. Ihm, Bot. Institut der Universität Freiburg i. Br.

daß ein gesicherter Unterschied erst durch die Summation geringer Abweichungen (in unserem Falle über längere Zeiträume) statistisch belegbar wird.

Für die Begründung dieses langsamen Wechsels der Stammeigenschaften, mit stetiger leichter Zunahme der R-Typen in der S-Population, sind wir auf Vermutungen angewiesen. Das zufällige Einkreuzen vereinzelter R-Fliegen und die Wirkung eindeutig subtoxischer Spuren von Insektizid glauben wir ausschließen zu dürfen. Die Hauptursachen sehen wir in der Haltung der Zuchten. Wohl wurde die Standard-Ernährung der Larven konstant gehalten und auch bezüglich der eventuell resistenzfördernden Anteile, Sterole u. a. (42, 53, 54) nicht verändert, so daß eine stoffwechsel-physiologisch einheitliche Basis geschaffen sein sollte. Bei Großzuchten kann aber diese Fütterung wohl in Qualität, jedoch bei zeitweiser Hochproduktion (täglich bis 5000 Fliegen) nicht immer in Quantität dem Einzelindividuum entsprechend konstant gehalten werden. Ferner ist in der Literatur und durch eigene Beobachtungen belegt, daß Fliegen, hervorgegangen aus erstabgelegten Eiern, etwas resistenter sind (63). Auch Einzeltiere mit verlängerter Larvenzeit sind resistenter als diejenigen mit rascher Entwicklung (32, 46). Eiablage, Larvenzeit, Populationsgröße, fütterungsbedingte Einflüsse, sowie allgemeine Schwankungen der Vitalität können somit, trotz optimaler Zuchtbedingungen, die Stammeigenschaften auf lange Sicht ändern.

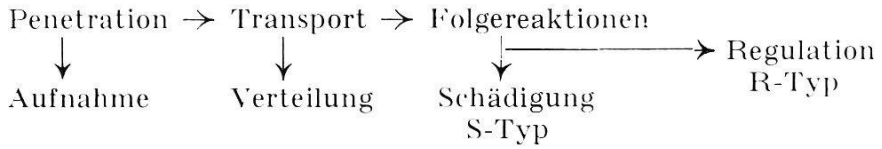
In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, daß die Entwicklungen der Merkmale bei R-Stämmen (Resistenzgrad und Lipoidgehalt) von 1955—1957 ebenfalls überprüft wurden. Auch hier zeichneten sich leichte Wertzunahmen ab. Die relativen Unterschiede zwischen S und R blieben somit erhalten.

VIII. Diskussion.

Im Laufe der Untersuchungen haben wir Einzelphänomene beobachtet und dadurch Aussagen über Teilprozesse der Stoffwechselvorgänge bei S- und R-Fliegen beim Einfluß der DDT-Substanz erhalten. Wenn wir versuchen, auf den Ergebnissen aufbauend, eine Deutung der Resistenzerscheinungen zu geben, sind wir uns bewußt, daß die Einordnung von einzelnen Gliedern in die in vivo ablaufenden Reaktionsketten problematisch ist. Zudem sind einige Vorstellungen über den Gesamtablauf nur durch Indizien belegt. Trotzdem erscheint es uns für die weitere Betrachtung wichtig, die Eigenart des Geschehens in ihrem vermutlichen Aufbau zu diskutieren.

1.

Die Vorgänge bei Sensibilität und Resistenz lassen sich in stark vereinfachter Darstellung in drei gegenseitig abhängige Hauptstufen unterteilen:



Die Penetrationsprozesse für die DDT-Substanz verlaufen beim Kontaktversuch hauptsächlich durch die Tarsen-Cuticula und nur zu einem kleinen Teil (durch Verbreitung beim Putzreflex etc.) über andere Stellen der Körperoberfläche. Auf dem Diffusionsweg in den Geweben und durch Transport in der Haemolymphe verbreitet sich das Insektizid im Körperinnern. Tracerversuche (38, 41) haben gezeigt, daß die DDT-Substanz zu praktisch allen Gewebsstrukturen Affinitäten besitzt.

Das Eindringen des Insektizids bewirkt im Organismus eine Reiz-Situation, auf die bestimmte Veränderungen gegenüber dem Ausgangsstadium eintreten. Viele dieser Folgereaktionen sind bei S- und R-Fliegen unterschiedlich und dienen als Belege für die Interpretation der Schädigungswirkung bei S und der Abwehrvorgänge bei R. Im Fliegenkörper bahnt sich sehr rasch nach der Aufnahme von DDT-Molekülen eine Entscheidung an, die den Ablauf der Folgereaktionen in S- oder R-Richtung steuert. Die sich in unseren Versuchen nach 1 Std. Kontakt deutlich abzeichnenden Effekte sind also schon viel früher ausgelöst worden, jedoch nicht immer in ihrem ersten Zeitpunkt kurz nach Kontaktbeginn eindeutig nachweisbar.

Die Beobachtung einzelner Abschnitte des Reaktionsablaufes führte zu dem Ergebnis, daß teilweise bei S-, speziell aber bei R-Fliegen verschiedene Prozesse eingreifen, die die Reaktionsfähigkeit der in den Körper aufgenommenen DDT-Substanz abzuschwächen oder sogar zu verhindern vermögen (fermentativer Abbau, Depotbildung und Speicherung in Lipoid- und anderen Substratkomplexen). Solche Vorgänge können als Inaktivierungsprozesse betrachtet werden, die ihrerseits Summenwirkungen von mehreren Mechanismen physiko-chemischer und physiologisch-chemischer Natur sind. Verschiedenen Mechanismen kann eine eindeutige protektive Leistung gegenüber dem Toxikum nachgewiesen werden, andere dienen vorherrschend zur Unterstützung des Reaktionsablaufes.

2.

Die Protektivfunktionen sind im allgemeinen bei R-Fliegen stärker ausgebildet. Bei S-Tieren gelingt es, durch Zusatz «protektiv» wirkender Substrate und Fermente, die Vergiftungseffekte der DDT-Substanz zu verzögern, jedoch nicht völlig zu verhindern. Zu solchen Substraten können nach unseren Untersuchungen mit Biotesten z. B. eine Reihe von Substanzen aus der Gruppe der organischen Säuren gezählt werden, wie dies auch von SACKLIN et al. (76) belegt ist. Im Stoffwechsel vergifteter S-Fliegen ist jedoch neben solchen Schutzfunktionen die Anhäufung von bestimmten Produkten des Krebszyklus möglich, die zu einer Hemmung anderer beteiligter Vorgänge führen (z. B. 45) und auf diesem Wege die vorübergehende Schutzwirkung wieder aufheben. R-Fliegen scheinen solchen «indirekten» Störungen weniger unterworfen zu sein.

Die Lipoide von S- und R-Fliegen sind unterschiedlich in ihrer Zusammensetzung und den chemischen Eigenschaften. In vivo liegen, neben freien Fettsäuren, Gemische von Triglyceriden, Phosphatiden und Galactolipoiden vor (19, 27), die mit Eiweißkomponenten zur Bildung von Biokomplexen neigen. Wohl weisen Lipoidanteile von S-Fliegen in vitro eine hohe Aufnahme- und Speicherungspotenz gegenüber der DDT-Substanz auf, in vivo sind jedoch diese physiko-chemischen Eigenschaften nicht in dem hohen Maße realisiert wie bei R-Fliegen. Wahrscheinlich bleiben unter Insektizideinfluß bei R die Biokomplexe stabiler. Diese Ansicht wird gestützt durch die stärkere Zunahme der Lipoidextrahibilität bei behandelten S-Fliegen.

Sowohl Modellversuche mit Eiweißkomponenten als auch der Zusatz von N-haltigen Lipoidextrakten von Fliegen (6) verstärken die Protektivwirkungen gegenüber der DDT-Substanz im Biotest. In vivo sind die Proteinveränderungen und der Gehalt an freien Aminosäuren in den Organen wechselseitig zwischen S und R verschoben. Zusätzlichere Störungen dieser Verschiebungen von Eiweißkomponenten im R-Organismus (z. B. durch Farbstoffe) führt zur Teilsensibilisierung, da anscheinend wichtige, dem Resistenzablauf koordinierte Anteile beschnitten werden und an den Reaktionsstellen fehlen. Eiweißkomponenten und -komplexen ist daher ebenfalls eine starke Beteiligung an den Protektivfunktionen zuzuschreiben.

Auch Vitamine und Biosstoffe können Schutzwirkungen entfalten. Verschiedene Funktionen dieser Art sind z. B. vom Lactoflavin bekannt (73, 75), das auch als Antidot gegenüber der Vergiftung mit DDT-Substanz wirkt (12). Auch bei unseren S-Stäm-

men zeigt sich nach Lactoflavingaben eine Vergiftungsverzögerung (7).

Von den beteiligten Fermentsystemen werden nur diejenigen berücksichtigt, die in unseren Versuchen einen deutlichen Unterschied der Aktivität bei S und R zeigten. Die spezifische Abbauwirkung der Dehydrochlorinase, die bei allen 5 Stämmen, bei R-Fliegen jedoch in höherem Maße vorhanden ist, reicht nicht aus, die Resistenz zu erklären. Es wird vermutet, daß in Verkettung mit anderen Fermentsystemen die Aktivität bei S in vivo beim Fortschreiten der Vergiftung herabgesetzt ist, während bei R der Abbaumechanismus erhalten bleibt.

In diesem Zusammenhang ist eine Verkettung mit der beim Insektizideinfluß stark gesteigerten Atmung der S-Typen (22, 40, 52, 59, 76) denkbar. Jedoch muß beachtet werden, daß bei den im Gasstoffwechsel zusammengefaßten dissimilatorischen Vorgängen noch weitere indirekte Steuerungsmöglichkeiten eingeschlossen sind. Wohl läßt die im Summeneffekt auffällige Steigerung des O_2-Verbrauches und der CO_2-Abgabe bei S vermuten, daß ein erheblicher Anteil der Zunahme auf Veratmung von Lipoiden beruht, aber daneben werden speziell bei S-Tieren auch andere Stoffe veratmet. Wenn die Verluste z. B. lebensnotwendiges Eiweiß betreffen, können starke Schädigungen der verschiedensten Fermentsysteme als Folgeerscheinungen eintreten.

Ohne Insektizidbelastung decken Fliegen ihren Energiestoffwechsel teilweise von Lipoiden her. Eine hohe Lipaseaktivität ist nachgewiesen, die sich mit Befunden bei anderen Insekten (23, 99) vergleichen läßt. R-Fliegen besitzen neben ihrem höheren Fettgehalt stets eine stärkere Lipaseaktivität als S. Bei behandelten Tieren sind diese Unterschiede noch verstärkt (6). Hierbei ist zu erwägen, ob die fermentativ bedingte Mobilisation von Lipoidkomponenten und die Lieferung von Lipoidvorstufen aus anderen Stoffwechselvorgängen (8, 47), neben einer möglichen humoralen Steuerung (82), die Unterschiede zwischen S und R noch verstärken können, wenn andere enzymatische Prozesse mit umgestimmt werden. So wird z. B. die Katalase durch Phospholipoide (50), aber auch durch organische Säuren und Aminosäuren (14, 43) gehemmt. Esterasen und Lipasen reagieren bei behandelten S- und R-Fliegen unterschiedlich und zeigen starke Abhängigkeit von den gesamten Stammqualitäten. Werden durch Lipasen verschiedene Lipokomponenten aus größeren Komplexen freigestellt, so können diese wiederum u. a. die Phosphataseaktivität (4, 35) beeinflussen und damit Ursache einer neuen Serie von Veränderungen sein.

3.

Aus diesen Angaben ergibt sich, daß bei der Betrachtung der stoffwechselphysiologischen Grundlagen der Resistenz alle Einzelresultate in einer größeren Reaktionsfolge gesehen werden müssen. Bei verschiedenen Fermentsystemen sind bei R-Fliegen erhöhte Grundpotenzen der Aktivität und unter Insektizideinfluß höhere Stabilität der Leistung zu beachten. Die Erhaltung der Reaktionsbereitschaft wird aber nur gewährleistet, wenn die Substratanteile so weit ausgeglichen werden können, daß keine Störungen auftreten. Für den Resistenzablauf ist es außerdem notwendig, daß in die wechselseitige Verkettung von Substrat- und Fermentsystemen wirkungsvolle Protektivmechanismen eingreifen, die den Einfluß der DDT-Substanz stufenweise abzufangen vermögen.

Das Gefüge der für resistente Fliegen typischen Stoffwechselvorgänge läßt sich im gesamten nicht vollständig überblicken. In Abb. 7 wird versucht, eine gruppenweise Bewertung und Einstufung der Wechselwirkungen in einem Schema zu veranschaulichen. Mit der Trennung in physikalisch-chemische (I), physiologisch-chemische (II) und biochemische Abläufe des gesamten Stoffwechsels (III) sollen die Schwerpunkte der Reaktionen angedeutet werden. In vivo wird die Realisation einer physikochemischen Potenz von den physiologischen Gegebenheiten und den Wirkungen der Fermentsysteme beeinflußt. Physikochemische Reaktionen üben ihrerseits Rückwirkungen auf physiologische Abläufe aus. Die Bereiche I bis III sind daher stets als Beeinflussungszonen aufzufassen.

Unter diesen Gesichtspunkten sind die einzelnen, bei Penetration, Diffusion und Transport der DDT-Substanz beteiligten Mechanismen eingetragen. Adsorption und Grenzflächenreaktionen können beim R-Typ bereits starke Filterwirkungen ausüben. Die Depotbildung des Insektizides in Lipoiden ist als weiterer Vorgang geeignet, das Ausmaß der Abfangeffekte zu verstärken. Menge und Beschaffenheit der Depots, beeinflußt durch verschiedene Fermentaktivitäten, bestimmen Speicherung und Weitergabe der DDT-Substanz, wobei dem Sättigungsgrad eine wichtige protektive Funktion zukommt.

Ein Zusammenwirken der angeführten Mechanismen ist in den Vorgängen der Biokomplexbildung vorhanden, wobei die mikrophysiologischen Grundlagen der strukturellen Gestaltung der Reaktionsstellen betroffen werden. In Biokomplexen, bei denen neben Lipoiden und Proteinen auch Kohlehydratanteile und weitere organische und anorganische Beistoffe enthalten sind, kann vor

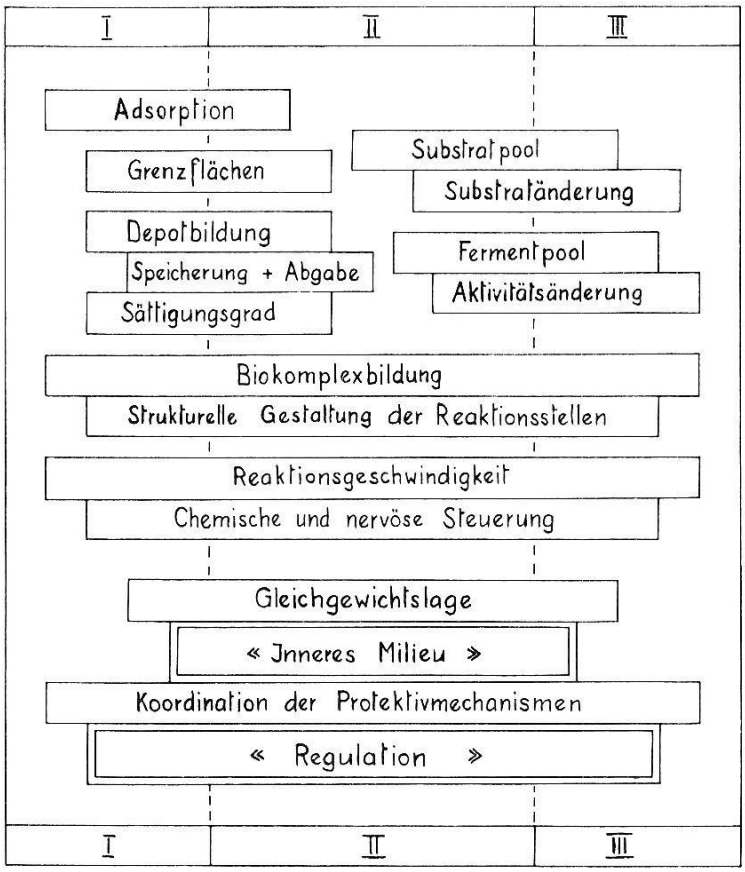


Abb. 7. Schematische Darstellung der Vorgänge für die Deutung des Gesamtablaufes der Resistenz.

allem bei R-Fliegen ein Großteil der DDT-Moleküle der Gesamtreaktion entzogen werden. Die Zusammensetzung der Biokomplexe ist abhängig von den Eigenschaften des Substratpools und seinen insektizidbedingten Änderungen. Manche Substratanteile unterstützen die Protektivleistungen, andere können zu einseitigen Belastungen oder Erschöpfung des Stoffwechsels führen. Diese Reaktionslagen in R- oder S-Richtung werden mitbestimmt von der Stärke und Ausgeglichenheit des Fermentpools und den Aktivitätsänderungen bei Insektizideinfluß.

Zur Erhaltung der Abwehrbereitschaft im R-Organismus ist der zeitliche Ablauf, die Reaktionsgeschwindigkeit, beim wechselnden Einsatz der Mechanismen von großer Bedeutung. Dies erfordert, daß die chemische und nervöse Steuerung nicht oder nur unwesentlich durch das Toxikum betroffen werden darf. Nach Ergebnissen von WIESMANN (91, 96) sowie unseren Befunden scheinen die Steuerungszentren bei R allgemein bedeutend weniger beeinflußbar zu sein als bei S.

Bei Belastungen durch Außenfaktoren zeigt jeder Organismus das Bestreben, einen neuen Ausgleich seiner physiologischen Funktionen zu erreichen. Er verfügt über Fähigkeiten, «Störungen auszugleichen, sich auf neue Gleichgewichte einzustellen oder

sich neuen Gegebenheiten relativ leicht anzupassen» (1). Die toxischen Effekte der DDT-Substanz verursachen aber bei sensiblen Tieren zu starke Störungen des Stoffwechsels und der Steuerungspotenzen, so daß die Ausgleichsfunktionen zusammenbrechen. Im resistenten Organismus ist dagegen ein neuer physiologischer Gesamtzustand vorhanden, der es diesen Fliegen ermöglicht, neue Gleichgewichtslagen zu realisieren.

Die Aufgabe der Gleichgewichts-Steuerungen besteht darin, das «innere Milieu» der Zellverbände, des Plasmas und des spezifischen Stoffaustausches entsprechend der genotypischen Eigenart des biologischen Systems zu erhalten. Bei physiologischen Funktionen «müssen innerhalb der Gewebe ganz besondere Milieubedingungen bestehen, und es muß eine ständige Wechselwirkung zwischen den Zellen angenommen werden» (39), und bei Einflüssen von chemischen Stoffen bestimmen «die strukturellen Eigenschaften der Moleküle und ihr physikalisch-chemisches Verhalten im biologischen Milieu ihre Wirkung» (81).

Wir sind der Auffassung, daß bei der Resistenz gegenüber der DDT-Substanz die Gestaltung des «inneren Milieus» ausschlaggebend ist. R-Fliegen besitzen dank erhöhten und unter Insektizideinfluß im allgemeinen nur wenig geschädigten Substrat- und Enzympotenzen eine höhere Stabilität des Grundmilieus. Außerdem ist anzunehmen, daß die Fähigkeiten zur progressiven Realisation von neuen Gleichgewichtslagen einen zu plötzlichen oder zu extremen Wechsel der Milieubedingungen verhindern. Bei S-Fliegen sind diese Leistungen mangelhaft. Um die Stabilität des «inneren Milieus» zu erhalten, ist eine gute Koordination der Protektivmechanismen notwendig. Die höheren Leistungswerte einzelner Abwehrfunktionen würden allein die starken Resistenzgrade nicht erklären. Maßgebend ist die Koordination aller Inaktivierungsvorgänge zu einer neuen «kombinativen Einheitsleistung» (Analogie aus Entwicklungsphysiologie, LEHMANN, 37). Aus manchen Befunden ergibt sich, daß bei S nach kurzer Zeit der Insektizideinwirkung ein Zusammenbruch der ohnehin schon schwächeren Koordinationsfunktionen erfolgt.

Das Geschehen im resistenten Organismus mit den hohen Leistungspotentialen und der Koordination der Einzelfaktoren zum protektiven Gesamteffekt für die Erhaltung des «inneren Milieus», kann mit dem Begriff «Regulation» zutreffend umschrieben werden. Die «Regulation» umfaßt eine derartige Umstellung des Stoffwechsels, daß auch unter Insektizidbelastung die normalen Lebensfunktionen erhalten bleiben. Für die einzelnen Etappen der Regulationsvorgänge ist eine spezifische strukturelle Gestaltung wichtiger Reaktionsstellen ausschlaggebend.

4.

Erste Regulationsvorgänge spielen sich bei unseren Kontaktversuchen im Integument (Cuticula und Hypodermis) der Tarsen ab. WIESMANN (94) zeigte, daß die Tarsencuticula bei R_1 deutlich mehr Lipoid- und Inkrustenmaterial besitzt, die Hypodermiszellen im histologischen Bild viel aktiver erscheinen und außerdem größere Einschlüsse von Lipoidtropfen aufweisen als bei S_1. Diese Strukturen ermöglichen ein rasches Abfangen von eindringenden DDT-Molekülen. Außerdem ist der fermentative Abbau der DDT-Substanz in der Hypodermis resistenter Fliegen intensiv (87). Das Integument ist daher als ein gestaffeltes System für die ersten Prozesse der Wirksubstanzinaktivierung zu betrachten. Aus den Versuchen mit Zusatzwirkungen zur DDT-Substanz hat sich ergeben, daß durch die Beeinflussung der Biokomplexe der Reaktionsstellen die typische S- oder R-Reaktion in einzelnen Phasen umgestimmt werden kann (z. B. Sublimat).

Im Körperinnern sind verschieden gelagerte Bindegewebsmembranen komplizierten Aufbaus vorhanden (71), die als selektiv ionenpermeable Strukturen weitere Regulationsvorgänge ermöglichen. Die Haemolymphe hat beim offenen Kreislaufsystem der Fliegen die Funktion der Stoffverteilung zwischen den Geweben und der Substratverschiebungen im Körper. Da die Blutzellenzahl bei S und R gleich und auch nach Kontakt annähernd konstant bleibt (96), sind vor allem die gelösten Bestandteile reaktionsbeteiligt. Aus Befunden bei S-Tieren können wir annehmen, daß durch die DDT-Substanz eine allgemeine Zell- und Gewebewirkung hervorgerufen wird. Plasmaveränderungen durch DDT-Substanz sind von SEAMAN (80) bei *Amoeba proteus* nachgewiesen. Bei *Musca* können wir nicht entscheiden, ob für die Zellreaktionen die Diffusion des Insektizides oder der Einfluß indirekter Wirkungen durch Stoffwechselprodukte verantwortlich sind. Zweifellos sind Unterschiede zwischen S- und R-Geweben vorhanden.

Nach längerer Insektizideinwirkung treten unspezifische histologische Veränderungen am Zentralnervensystem auf (64), resistente *Drosophila* weisen die Schädigungsreaktionen in den Ganglien viel weniger häufig auf als sensible (44). Nach noch nicht abgeschlossenen Versuchen (96) dürfte auch bei *Musca* eine ähnliche Situation vorliegen. Nach WIESMANN zeigen die Nervenstrukturen von S- und R-Fliegen starke Unterschiede. Bei behandelten R-Tieren sind Reflexstörungen weniger eingreifend zu beobachten als bei S (91). Färbungsunterschiede und erhöhter Cholesteringehalt geben Anhaltspunkte, daß die Insektizid-Permeabilität der Nervenscheiden bei R geringer ist (96). SCHARF (77, 78) und HÖBER

(29) schreiben den ungesättigten Fettsäuren (z. B. Linolensäure) in den Nervenlipoiden und -lipoproteiden eine wichtige neurophysiologische Funktion zu. Wir vermuten, daß die geringere Nervenempfindlichkeit bei R-Fliegen von solchen Faktoren mitbestimmt wird. Dieser Schutz der Nervenstränge und Zentren ist grundlegend für die Erhaltung der nervösen Steuerung und der gesamten Regulation.

Der Körper resistenter Fliegen stellt somit ein vielfach gestuftes und dynamisch hochspezialisiertes «Filterwerk» zum Abfangen der aufgenommenen DDT-Substanz dar. Bei der restlichen, noch reaktionsbereit verbleibenden Insektizidmenge werden überdies infolge lokaler Gleichgewichtssteuerungen und umfassenden Regulationsvorgängen die toxischen Effekte verhindert oder sie bleiben unterschwellig.

5.

Zusammenfassend betrachtet ergeben sich für die Charakterisierung von Resistenz und Sensibilität folgende Aussagen:

Resistenz ist stoffwechselphysiologisch gekennzeichnet durch
- allgemein stärker wirksame Protektivmechanismen
- gute Koordination dieser Funktionen zu einer einheitlichen Abwehrleistung
- höhere Grundpotenz und Stabilität des «inneren Milieus»
- Erhaltung der Milieubedingungen durch progressive Realisation neuer Gleichgewichtslagen
- Regulation gegenüber den sonst toxischen Wirkungen der DDT-Substanz

Sensibilität bedeutet
- mangelnde Koordination für den Einsatz der an sich schwächeren Abwehrfunktionen
- ungenügende Gleichgewichts-Steuerungen führen zu Störungen des «inneren Milieus»
- Schädigung der strukturellen Eigenschaften und physiologischen Reaktionen in verschiedenen Organen und im Nervensystem
- Auftreten von Erschöpfungszuständen

* *
*

Wir glauben annehmen zu dürfen, daß die Vielschichtigkeit des Resistenzbildes mit diesen Darstellungen eine erweiterte Diskussionsbasis erhält, besonders auch im Hinblick auf die Pro-

bleme bei der multiplen oder polyvalenten Insektizidresistenz (69, 70). Ebenso sind wir uns bewußt, daß außer den hier aufgezeigten Wegen noch andere Möglichkeiten des Resistenzablaufes gegeben sein können.

Literatur.

1. ABDERHALDEN, R. (1953). Vitamine, Hormone, Fermente. 4. Aufl. — Basel: Benno Schwabe.
2. BABERS, F. H. & PRATT, J. J. (1953). Resistance of insects to insecticides: the metabolism of injected DDT. — J. econ. Ent. *46,* 997.
3. BALLOU, G. A., BOYER, P. D. & LUCK, J. M. (1945). The electrophoretic mobility of human serum albumin as affected by lower fatty acid salts. — J. biol. Chem. *159,* 111.
4. BARKER, R. J. & ALEXANDER, B. H. (1957). Acid and alkaline phosphatases in house flies of different ages. — Bull. ent. Soc. Amer. *3,* 25.
5. BARNETT, R. J. & SEELIGMAN, A. M. (1951). Histochem. demonstration of esterases by production of indigo. — Science *114,* 579.
6. BEYE, F. (1960). Untersuchungen des Körperlipoidgehaltes sensibler und resistenter Stubenfliegen *(Musca domestica).* — Im Druck.
7. BEYE, F. (1960). Über den Atmungsstoffwechsel resistenter und sensibler Fliegen unter Einwirkung von DDT-Substanz. — Im Druck.
8. BLOCH, K. (1952). Interrelationships of lipid and carbohydrate metabolism. —Ann. Rev. Biochem. *21,* 273.
9. BOELL, E. J. & SHEN, S. C. (1954). An improved ultramicro Kjeldahl technique. — J. exp. Cell. Res. *7,* 147.
10. BOGEN, H. J. & KESER, M. (1954). Eiweißabbau durch Acridinorange bei Hefezellen. — Physiol. Plantarum *7,* 446.
11. BRIGGS, A. P. (1922, 1924). — J. biol. Chem. *53,* 13; *59,* 225.
12. BRITO-BABAPULLE, L. A. P. (1951). An antidote for DDT poisoning—a record of 35 cases seen. — Brit. Vet. J. *107,* 106.
13. BROWN, A. W. A. (1958). Insecticide resistance in arthropods. — Monogr. Ser. WHO Nr. 38, Genf, 240 pp.
14. CERIOTTI, G., SPANDRIO, L. & BERTI, E. (1957). On the in vitro inhibition of catalase by amino acids. — Biochim. biophys. Acta *23,* 362.
15. CHEN, P. S. & HADORN, E. (1954). Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Haemolymphe von *Drosophila, Ephestia* und *Corethra.* — Rev. Suisse Zool. *61,* 437.
16. CHEN, P. S. & KÜHN, A. (1956). Vergleichende Untersuchungen der freien Aminosäuren und Peptide während der Raupen- und Puppenentwicklung verschiedener Genotypen von *Ephestia kühniella.* — Z. Naturforschg. *11b,* 305.
17. CHEN, P. S. (1956). Elektrophoretische Bestimmung des Proteingehaltes im Blut normaler und letaler Larven von *Drosophila melanogaster.* — Rev. Suisse Zool. *63,* 216.
18. COHEN, H. & TAHORI, A. S. (1957). Mode of action of Di-(p-Chlorphenyl)-(Trifluormethyl)-Carbinol, as a synergist to DDT against DDT-resistant house flies. — J. Agr. Food Chem. *5,* 519.
19. DEUEL, H. J., jr. (1950). Chemistry of lipids. — Ann. Rev. Biochem. *19,* 89.
20. DRILHON, A. & VAGO, C. (1953). Modific. dans la figure chromatogr. des acides aminés libres et des substances fluorescentes de l'hémolymphe du *Bombyx mori* consécutive à une paralysie d'origine microbienne. — Exper. *9,* 143.

21. FLORKIN, M. (1956). Vergleich. Betrachtung des stationären Zustandes der nicht-eiweißgebundenen Aminosäuren der Tiere. — 6. Koll. Ges. physiol. Chem., Mosbach.
22. FULLMER, O. H. & HOSKINS, W. M. (1951). Effects of DDT upon the respiration of susceptible and resistant houseflies. — J. econ. Ent. *44*, 858.
23. GEORGE, J. C., VALLYATHAN, N. V. & SCARIA, K. S. (1958). Lipase activity in insect flight muscle. — Exper. *14*, 250.
24. GIESE, A. C. (1947). Radiations and Cell division. — Quart. Rev. Biol. *22*, 253.
25. GLICK, D. (1949). Technique of histo- and cytochemistry. — London: Interscience Publ. N.Y.
26. GUTMAN, A. B. & GUTMAN, E. (1938). — J. clin. Invest. *17*, 473 *.
27. HILDITCH. (1947). The chemical constitution of natural fats. 2nd ed. — London: Chapman & Hall.
28. HIROYOSHI, T. (1955). The correlation between resist. to insecticides and Fe-content in *Drosophila mel.* — Botyu-Kagaku *20*, 109.
29. HÖBER, F. (1958). Physical chemistry of cells and tissues. — Nervenlip. 294/351. — Philadelphia: Blakiston Co.
30. HOSKINS, W. M. & GORDON, H. T. (1956). Arthropod resistance to chemicals. — Ann. Rev. Ent. *1*, 89.
31. IHM, P. (1955). Eine exakte Methode für Varianzanalyse in bestimmten Fällen. — Züchter *25*, 365.
32. KERR, R. W., VENABLES, D. G., ROULSTON, W. J. & SCHNITZERLING, H. J. (1957). Specific DDT-Resistance in Houseflies. — Nature *180*, 1132.
33. KING, E. J. & ARMSTRONG, A. R. (1934). — Canad. med. Ass. J. *31*, 376 *.
34. KNIPHORST, L. C. E. (1946). — Chem. Week *42*, 311 und 328 *.
35. KODICEK, E. (1956). Fat-soluble vitamins. — Ann. Rev. Biochem. *25*, 497.
36. LEA, C. H., RHODES, D. N. & STOLL, R. D. (1955). Phospholipids. 3. On the chromatographic separation of Glycerophospholipids. — Biochem. J. *60*, 353.
37. LEHMANN, F. E. (1945). Einführung in die physiologische Embryologie. — Basel: Birkhäuser-Verlag.
38. LEROUX, E. J. & MORRISON, F. O. (1954). The adsorption, distribution, and site of action of DDT in DDT-resistant and DDT-susceptible house flies using carbon labelled DDT. — J. econ. Ent. *47*, 1058.
39. LEUTHARDT, F. (1955). Lehrbuch der physiol. Chemie. 12. Aufl. — Berlin: Gruyter & Co. Zitat S. 598.
40. LIN, S. & RICHARDS, A. G. (1955). Oxygen consumption of resistant and susceptible houseflies. — J. econ. Ent. *48*, 627.
41. LINDQUIST, W., ROTH, A. R. & HOFFMAN, R. A. (1951). The distribution of radioactive DDT in houseflies. — J. econ. Ent. *44*, 931.
42. LOFGREN, C. S. & CUTCOMB, L. K. (1956). Toxicity of DDT to the Americ. cockroach when lipid content and temper. are varied. — J. econ. Ent. *49*, 167.
43. LÜCK, H. (1957). Katalasehemmung durch organische Säuren. — Biochem. Z. *328*, 411.
44. LÜERS, TH., KÖPF, H., BOCHNIG, V. & LÜERS, H. (1954). Vergl. histologische Untersuchungen am ZNS DDT-resist. & sensibler Stämme von *Drosophila mel.* nach DDT-Einwirkung. — Zool. Anz. *18*, Suppl. 408.
45. MCGINNIS, A. J., CHELDRIN, V. H. & NEWBURGH, R. W. (1956). Enzyme studies of various stages of the blowfly *Phormia regina* (Meig.). — Arch. Biochem. & Biophys. *63*, 427.
46. MCKENZIE, R. E. & HOSKINS, W. M. (1954). Correlation between the length

of the larval period of *Musca dom.* L. and resistance of adult flies to insecticides. — J. econ. Ent. *47*, 984.

47. MEDES, G. (1950). Mitochondria and metabolism of fatty acids. — Ann. Rev. Biochem. *19*, 215.
48. METCALF, R. L. (1955). Physiological basis for insect resistance to insecticides. — Physiol. Rev. *35*, 197.
49. METCALF, R. L. (1955). Organic insecticides, their chemistry and mode of action. — New York: Interscience Publ.
50. MICHAELAZZI, L. (1957). Inactivation of catalase by phospholipide extracts. — Exper. *13*, 444.
51. MOOREFIELD, H. H. & KEARNS, C. W. (1955). Mechanism of action of certain synergists for DDT against resistant house flies. — J. econ. Ent. *48*, 403.
52. MORRISON, P. E. & BROWN, A. W. A. (1954). The effects of insecticides on cytochrome oxidase obtained from the American cockroach. — J. econ. Ent. *47*, 723.
53. MUNSON, S. C. (1953). Some effect of storage at different temperatures on the lipids of Americ. roach and on the resistance of this insect to heat. — J. econ. Ent. *46*, 657.
54. MUNSON, S. C., PADILLA, G. M. & WEISSMAN, M. L. (1954). Insect lipids and insecticidal action. — J. econ. Ent. *47*, 578.
55. MYRBAECK, K. (1953). Enzymatische Katalyse. — Berlin: De Gruyter & Co.
56. NELSON, M. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of Glucose. — J. biol. Chem. *153*, 375.
57. NEUMANN, H. (1948). — Diss. Amsterdam *.
58. PAECH, K. & SIMONIS, W. (1952). Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. — Berlin: Springer.
59. PANT, C. P. & DAHM, P. A. (1957). — Bull. Ent. Soc. Amer. *3*, 26.
60. PARNAS, J. K. (1938). Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation von Parnas u. Wagner. — Z. anal. Chem. *114*, 261.
61. PEARSON, E. S. & HARTLEY, H. O. (1956). Biometric tables for statisticians 1. — Cambridge Univ. Press.
62. PERRY, A. S. & SACKTOR, B. (1955). Detoxification of DDT in relation to cytochrome oxidase activity in resistant and susceptible houseflies. — Ann. Ent. Soc. Amer. *48*, 329.
63. PIMENTEL, D., DEWEY, J. E. & SCHWARDT, H. H. (1951). An increase in the duration of the life cycle of DDT-resistant strains of the housefly. — J. econ. Ent. *44*, 477.
64. PISTOR, K. (1958). Über histologische Veränderungen am Nervensystem von Call. erythr. nach Insektizideinwirkung. — Z. angew. Zool. *45*, 351.
65. REIFF, M. (1955). Nachweis des fermentativen Abbaus der DDT-Substanz mit Fliegenextrakten im Papierchromatogramm (Grundlagen zur Resistenzforschung, 2. Mittg.). — Rev. Suisse Zool. *62*, 218.
66. REIFF, M .(1955). Untersuchungen über den Lipoid- und Proteingehalt der Tarsen von *Musca domestica* L. Vergleich von sensiblen und insektizidresistenten Stämmen. — Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges., Pruntrut, S. 153.
67. REIFF, M. (1956). Untersuchungen des Aminosäurengehaltes der Haemolymphe bei Imagines von verschiedenen Musca domestica-Stämmen. — Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges., Basel, S. 133.
68. REIFF, M. (1956). Einige Befunde über die Selektionsprozesse bei der Entwicklung der Insektizidresistenz (Grundlagen zur Resistenzforschung, 6. Mittg.). — Rev. Suisse Zool. *63*, 317.
69. REIFF, M. (1958). Über unspezifische Abwehrreaktionen bei polyvalent re-

sistenten Fliegenstämmen (Grundlagen zur Resistenzforschung, 9. Mittg.). — Rev. Suisse Zool. *65*, 411.

70. REIFF, M. (1960). Die Bedeutung von Selektionsvorgängen für polyvalente Insektizidresistenz. — Im Druck.
71. RICHARDS, A. G. & SCHNEIDER, D. (1958). — Über den komplexen Bau der Membranen des Bindegewebes von Insekten. — Z. Naturforsch. *13b*, 680.
72. RINGEL, S. J. (1956). The copper content of resistant and susceptible houseflies. — J. econ. Ent. *49*, 569.
73. ROBISON, F. A. (1951). The Vitamin B-Complex. — London: Chapman & Hall.
74. ROEDER, K. D. (1953). Insect Physiology. — New York: Wiley, S. 147—190.
75. RUDOLPH, W. (1958). Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe. — Beih. int. Z. Vit.-Forsch. 5.
76. SACKLIN, J. A., TERRIERE, L. C. & REMMERT, L. F. (1955). Effect of DDT on enzymatic oxidation and phosphorylation. — Science *122*, 377.
77. SCHARF, J. H. (1952). Untersuchungen über Nervenlipoide unter besonderer Berücksichtigung der Milznerven des Hausrindes und des Menschen. — Acta neuroveget. *4*, 31.
78. SCHARF, J. H. (1952). Polarisationsoptische Untersuchungen an markhaltigen Ganglienzellen in der Wirbeltierreihe und beim Menschen. — Mikroskopie *7*, 174.
79. SCHLECHTER, M. S., SOLOWAY, S. B., HAYES, R. A. & HALLER, H. L. (1945). Colorimetric determination of DDT. Color test for related compounds. — Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. *17*, 704.
80. SEAMAN, G. R. (1947). The effect of DDT on the protopl. in Amoeba proteus. — Trans. Amer. Microsc. Soc. *66*, 212.
81. SEXTON, W. A. (1958). Chem. Konstit. und biol. Wirkg. Übersetzung F. Hölscher & G. Hübscher. — Verlag Chemie Weinheim, Zitat S. 11.
82. SHAPIRO, B. (1957). Progress i. Chemistry of Fats and other Lipoids *4*, 177.
83. SOMOGYI, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. Determination of blood sugar. — J. biol. Chem. *160*, 61 und 69.
84. STEPHAN, J. (1932). Untersuchungen über das Verhalten der Katalase im Samen. — Jb. wiss. Bot. *75*, 771.
85. STERNBURG, J., VINSON, E. B. & KEARNS, C. W. (1953). Enzymatic dehydrochlorination of DDT by resistant flies. — J. econ. Ent. *46*, 513.
86. STERNBURG, J., KEARNS, C. W. & MOOREFIELD, H. (1954). DDT-Dehydrochlorinase, an enzyme found in DDT-resistant flies. — J. Agr. Food Chem. *2*, 1125.
87. TAHORI, A. S. & HOSKINS, W. M. (1953). The absorption, distribution and metabolism of DDT in DDT-resistant houseflies. — J. econ. Ent. *46*, 302 und 829.
88. WEST, T. F. & CAMPBELL, G. A. (1950). DDT and newer persistent insecticides. 2. Aufl. — London: Chapman & Hall.
89. WIESMANN, R. (1947). Untersuchungen über das physiologische Verhalten von *Musca domestica* L. verschiedener Provenienzen. — Mitt. Schweiz. ent. Ges. *20*, 484.
90. WIESMANN, R. (1955). Der heutige Stand des Insektizid-Resistenzproblems (Grundlagen zur Resistenzforschung, 1. Mittg.). — Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw. Berlin-Dahlem, Heft 83, 17.
91. WIESMANN, R. (1955). Vergl. Untersuchungen über die Reizleitung sensibler und resistenter Imagines v. *Musca domestica* unter der Einwirkung von DDT-Substanz (Grundlagen zur Resistenzforschung, 3. Mittg.). — Mitt. Schweiz. ent. Ges. *28*, 251.

92. WIESMANN, R. & REIFF, M. (1956). Untersuchungen über die Bedeutung der Lipoide bei der Insektizidresistenz von *Musca domestica* L. (Grundlagen zur Resistenzforschung, 7. Mittg.). — Verh. Naturforsch. Ges. Basel *67*, 311.
93. WIESMANN, R. (1956). Neue Erkenntnisse über das Wesen der Insektizidresistenz (Grundlagen zur Resistenzforschung, 5. Mittg.). — C.R. J. europ. Phytopharmacie *3*, 69.
94. WIESMANN, R. (1957). Vergleichend histologische Untersuchungen an normalsensiblen und gegen DDT-Substanz resistenten Stämmen von *Musca domestica* (Grundlagen zur Resistenzforschung, 8. Mittg.). — J. Insect Physiol. *1*, 187.
95. WIESMANN, R. (1958). Zur Physiologie der Rüsselspeicheldrüse von *Musca domestica* L. — Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges., Glarus, S. 150.
96. WIESMANN, R. — Mündl. Mitteilung.
97. WINTERINGHAM, F. P. W. (1956). Labelled metabolic pools for studying quantitatively the biochemistry of toxic action. — Int. J. appl. Radiat. Isotopes *1*, 57.
98. WUHRMANN, O. Untersuchungen über die Wirkung von protektiven Mechanismen bei der DDT-Resistenz von Drosophila melanogaster. — Diss. im Druck.
99. ZEBE, E. (1953). Über den respiratorischen Quotienten der Lepidopteren. — Naturwiss. *40*, 298.

---

* Zitate nach C. ENGEL, 1953 (Zentralinstitut Ernährungsforschg., TNO, Utrecht, Holland). Engel-Kolorimeter Bedienungsvorschrift, Delft.

Résumé.

La résistance des Arthropodes, spécialement de *Musca domestica* à la substance active DDT, a suscité un grand nombre de recherches spéciales. Ce travail s'occupe des bases physiologiques de la résistance chez la mouche domestique. Dans ces recherches, effectuées avec trois souches de mouches sensibles (types S) et deux souches de mouches résistantes (types R) sélectionnées avec l'insecticide DDT, nous avons constaté une série de résultats spécifiques, c'est-à-dire différents pour les deux types, au cours des phases d'intoxication. Les mouches S étant très sensibles aux effets toxiques de l'insecticide, ne possèdent qu'un faible pouvoir de détoxication et le substratum spécifique est pauvre en lipides, protides, etc. Chez les types R, par contre, la situation est différente : la teneur en lipides, protides, etc. du substratum est plus élevée et la stabilité des complexes biologiques plus forte.

La consommation d'oxygène et la production de bioxyde de carbone in vivo sont, chez les mouches résistantes et après le traitement insecticide, plus équilibrées que chez les types S. Le quotient respiratoire indique que les mouches S ont besoin de lipides et de protides, tandis que les types R ne présentent pas ce désavantage.

Les différents niveaux des valeurs en acides aminés, protides et lipides sont examinés pour les mouches R et S en pratiquant des extractions de mouches entières et d'organes de mouches, tels que tarses, hémolymphe et ganglions thoraciques. Toutes ces observations concourent à montrer que la capacité fondamentale des structures biochimiques est d'une importance vitale. En rapport avec ces résultats, des expériences sur les réactions spécifiques (activité des lipases, protéinases, phosphatases, de la catalase, etc.) prouvent une participation directe et indirecte de ferments au métabolisme typique pour R.

Notre terme « milieu interne » comprend, en plus de « vigor » (d'après HOSKINS et GORDON), la somme des réactions enzymatiques. Nous pensons que les

processus de nature moins spécifique sont aussi importants pour la distinction des types S + R que les réactions très typiques, par exemple celle de la déhydrochlorinase et autres. La teneur plus élevée en lipides chez le type R rend possible un plus grand dépôt d'insecticide dans les différents tissus du corps et provoque une pénétration plus faible dans les centres vitaux. La capacité d'équilibrer le nombre et l'intensité des effets de l'insecticide dans le « milieu interne » est mieux réalisée chez le type R.

Une certaine capacité de régulation physiologique se produit cependant aussi chez le type S. Les mouches S montrent une détoxication et des réactions fermentatives incomplètes et, en outre, une coordination insuffisante qui provoque un déséquilibre. Le type R, au contraire, est capable d'atteindre, selon l'influence et l'effet de l'insecticide, un équilibre biochimique plus élevé. Les différentes souches R peuvent réaliser cette régulation de manières variées, la chaîne des réactions peut être modifiée, mais les procédés fondamentaux restent les mêmes.

La *résistance* est caractérisée en général par les possibilités suivantes du métabolisme :

— mécanismes de protection hautement actifs,
— coordination de ces fonctions dans le sens d'une réaction antitoxique générale,
— haut degré de potentialité fondamentale et de la stabilité du « milieu interne »,
— capacité de contrebalancer les actions toxiques.

La *sensibilité* signifie :

— perte de la capacité initiale de coordonner les réactions antitoxiques.
— équilibre du « milieu interne » facilement dérangé par des substances toxiques tel que l'insecticide DDT,
— lésion des structures intracellulaires, des réactions physiologiques dans différents organes (nerfs et centres nerveux),
— consommation des substances essentielles, effondrement métabolique suivi de mort.

Summary.

The resistance of Arthropods, especially *Musca domestica* L. to DDT active ingredient induced numerous investigations on the actual processes. This paper deals with the physiological aspects of resistance in houseflies.

Three sensitive (S) and two resistant (R) strains were investigated and a variety of different responses to intoxication were found. Sensitive strains are more susceptible to the toxic agent because of lower potency of detoxication and lower content of specific substrates such as lipids, protein components, etc. For R strains the stability of biological complexes such as lipoproteids seems to be important for the practical resistance and also for the higher content of substrates.

Oxygen consumption and carbon dioxide production in vivo are better balanced after insecticidal treatment in R strains. The respiratory quotient points to a surplus consumption of vital substrates in S flies. Resistant types can avoid this disadvantage of metabolism.

The different levels for aminoacids, proteins and lipids in the tarsi, haemolymph, thoracic ganglion and whole body were examined for S and R flies. All these observations and the investigation of some correlated enzymes, such as activity of lipase, catalase, proteinases, phosphatases, etc. lead to the conclusion that substrate base as well as specific and non-specific enzymes are linked.

The "vigor" conception of HOSKINS and GORDON is extended. The term "inneres Milieu" comprises vigor as well as the sum of reactions of enzymes, substrates, and complexes. Substrate contents, activity of enzymes and potency to form biological complexes are as important for the separation between S and R flies as the more specific processes, i.e. the activity of dehydrochlorinase and others. The higher level of more specific substrates such as lipids, etc. in resistant flies produces more insecticidal depots, possibly lower penetration and adsorption. The ability to balance the number and intensity of insecticide induced reactions with the mobile elements, enzymatic reactions and formation of biological complexes is better realized in our resistant strains.

However, the partial potency of regulation is also realized up to a certain point by S individuals. S flies show a certain amount of detoxication and other enzymatic reactions, substrate potencies, but the final co-ordination is not satisfactory. The organism of S is not able to balance completely the action of insecticide and to reach a new state of balance. In R strains this ability is realized in various patterns. The resistance is not identical in different steps of reactions, but the predominant reactions are of the same type.

Resistant houseflies have the following metabolic characteristics:

- highly active protective mechanisms,
- co-ordination of these functions in the sense of a general anti-insecticidal reaction,
- high basic potency and stability of "inneres Milieu",
- ability to counterbalance toxic actions.

Sensitivity means:

- loss of initial ability to co-ordinate anti-insecticidal reactions,
- balance of "inneres Milieu" easily disturbed by toxicants, such as DDT a.i.,
- injury of intracellular structures, physiological reactions in various organs (nerves and nervous centres),
- consumption of essential substances, extensive breakdown of metabolism, followed by death.