universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Beitrag zur Wirkung des Prodigiosus auf die Anaeroben-zuechtung

Lehmann, Christl

Innsbruck, 1933

urn:nbn:at:at-ubi:2-2662

II. Exemplar

Christl Lehmann-Liebrecht

BEITRAG ZUR WIRKUNG DES PRODIGIOSUS

AUF DIE ANAEROBEN- ZUECHTUNG.

W a l d a u / Kassel, 22. September 1933.

UB INNSBRUCK
+C201557800

BEITRAG ZUR WIRKUNG DES PRODIGIOSUS AUF DIE ANAEROBEN - ZUECHTUNG.

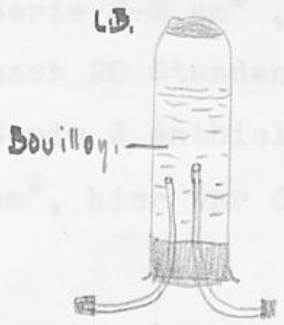
Anaerobe Bakterien sind sauerstoffempfindlich, der Sauerstoff der Luft wirkt wegen seiner zu grossen Spannung giftig auf sie. Wird der Luft der Sauerstoff entzogen, so können die anaeroben Bakterien gedeihen. Die Verminderung der Sauerstoffspannung kann auf die verschiedenste Weise geschehen, aber nur zwei Arten werden uns besonders interessieren: die Sauerstoffzehrung 1. Durch einen Aerobier, den Bakterius Prodigiosus und 2. Zum Vergleich durch ein chemisches Mittel, die Pyrogallussäure.

Die Sauerstoffentziehung wirkt besonders im geschlossenen Raum potentialändernd. Die Spannung der Atmungsluft wird vermindert, und da diese im Gasaustausch mit dem Nährboden steht, wird auch hier der Gehalt an Oxydans kleiner.
Für die Sauerstoffzehrung ist der Bakterius Prodigiosus ein besonders günstiges Objekt wegen seiner grossen Vitalität und der Eigenschaft, auch fakultativ anaerob wachsen zu können. Pyrogallussäure wirkt natürlich stärker sauerstoffzehrend, da sie von Anfang an ein Maximum

an Wirkung besitzt, das die Bakterien erst durch starke Vermehrung und Wachstum erreichen müssen.
Anaerobe Bakterien, die in einer mit Traubenzuckernähragar gefüllten Eprouvette aerob gezüchtet werden, schliessen ihr Wachstum in einer bestimmten Zone des Nährbodens mit einer Platte ab. Oberhalb dieser Zone findet kein Wachstum mehr statt, da vermutlich dort das Oxydationspotential zu gross ist wegen der Nähe der Aussenluft. Gewisse Konzentrationen von Methylenblau, die mit demselben Traubenzuckernährагar vermischt wurden, zeigen ein ähnliches Phaenomen: Die Umwandlung des Farbstoffes in Leukomethylenblau geschieht nur bis zu einer bestimmten Höhe des Nährbodens. An dieser Grenzstelle liegt eine besonders intensiv gefärbte Platte. Der obere Teil des Nährbodens bleibt normal gefärbt. Auch hier liegt vermutlich eine Beeinflussung durch das Potential des Nährbodens vor: Der obere Teil zeigt ein starkes Oxydationspotential, das der Entfärbung eine Grenze setzt.
Wenn durch Sauerstoffentziehung das Potential des Nährbodens verändert werden kann, so muss man auch die Plattenbildungen der Anaerobier und des Methylenblaus beeinflussen können, nämlich wenn diese vom Potential des Nährbodens abhängig sind. Darüber sollen einige Versuche Aufschluss geben. Kompliziert wurden diese noch dadurch, dass dem Traubenzuckernährагar KCy in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde. KCy wirkt Schwer-Metall-bindend und verhindert dadurch die Oxydation des im Glutathion der Zelle enthaltenen Zysteins. Ausserdem ist KCy ein Reduktionsmittel, das somit auch die Reduktionskraft des Nähr-

bodens erhöht.

EHe man in die Versuchsreihen ueber die Potential-ändernde Wirkung des Bakterius Prodigiosus eintreten kann, muss man sich mit seinem Sauerstoffverhältnissen näher befassen. Bachmann (Ztrbl.f. Bakt. Bd. 124, Heft 3-4) stellte eine Kurve für den Sauerstoffverbrauch und die CO_2 -Abgabe des Prodigiosus auf, aus der man ersieht, dass der O_2-Gehalt einer geschlossenen Kammer durch das Wachstum des Prodigiosus in 24 Stunden von 21% auf ungefähr 3% sinkt. Uhrovits (Ztrbl. f. Bakt. Bd. 127, Heft 4-6) fand, dass der Prodigiosus von 20,13 cm^3 O_2-20,01 cm^3 verbrauchte, dass also der Sauerstoff durch die Atmung des Prodigiosus fast ganz verschwunden war. Beide Autoren stellten ihre Werte durch Gasanalyse fest. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt man, wenn man den O_2-Verbrauch durch einen Indikator misst. Als solcher sind besonders Leuchtbakterien geeignet, da sie nur leuchten, wenn ihnen freier Sauerstoff zur Verfügung steht, der aber nur in minimalsten Mengen vorhanden zu sein braucht. Dies wurde durch verschiedene Versuche festgestellt, und zwar war die Technik folgende: Die Kuppe von verschiedenen Eprouvetten wurde mit Fischagar ausgegossen, der mit einer Oese Leuchtbakterien beimpft wurde. Die Eprouvetten wurden umgedreht, mit einem durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen. Durch dessen beide Oeffnungen ragten zwei gebogene Glasröhrchen, die ebenfalls verschlossen werden konnten , in die Eprouvette. Durch das eine Röhrchen wurde sterile Bouillon eingefüllt und zwar in abgestuften Mengen, dass den Bakterien 1-10 cm^3 Luft zur Verfügung stand. Die Bakterien stellten ihr Leuchten



erst nach 7 Tagen ein, also ein Zeichen dafür, dass sie geringe Mengen O_2 sowohl zum Atmen wie zum Leuchten brauchen. Geteilte Petrischalen, in denen auf der einen Seite auf Fischagar Leuchtbakterien, auf der andern auf gewöhnlichem Nähragar Prodigiosus wuchs, leuchteten trotz Plastilin-Abdichtung drei Tage lang. Der Prodigiosus braucht demnach längere Zeit um allen Sauerstoff vollständig zu verbrauchen. Bei Bebrütung solcher geteilt beimpften Schalen, stellten die Leuchtbakterien bereits nach 1½ Stunden das Leuchten ein. Wie durch Versuche festgestellt wurde, lag das Erlöschen nicht nur daran, dass der Prodigiosus durch höhere Temperatur mehr Sauerstoff verbraucht hatte, sondern auch auch daran, dass die Leuchtbakterien 37° nicht vertrugen. Das Leuchtvermögen trat wieder ein, wenn die Bakterien auf frische Nährböden kamen und bei Zimmertemperatur belassen wurden.

Da den Leuchtbakterien und dem Prodigiosus in den Petrischalen zu viel Luft zur Verfügung stand und die Versuche deshalb längere Zeit beanspruchten, musste eine Anordnung gefunden werden, die diesen Nachteil beseitigte. Die Leuchtbakterien wurden deshalb wieder auf Fischagar, der in die Kuppe verschiedener Eprouvetten ausgegossen wurde, geimpft; und die das erstemal sterile Bouillon jetzt durch mit Prodigiosus beimpfte ersetzt. Die den Bakterien zur Verfügung stehenden Luftmengen waren verschieden gross.

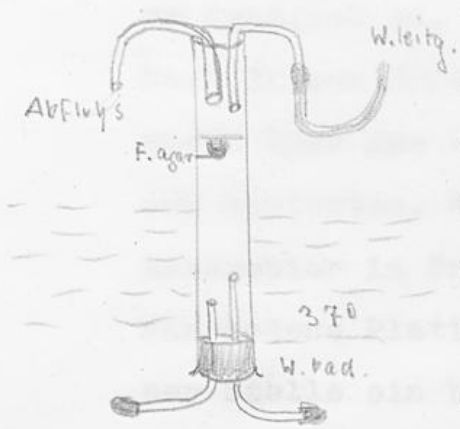
In der Serie 1 war ungefähr 1 cm^3 Luft enthalten, und in Serie 2-2 cm^3, in beiden stellten die Leuchtbakterien nach 20 Stunden das Leuchten ein.

Serie 3 enthielt 3 cm^3, Serie 4 - 4 cm^3, Und Serie 5 - 5 cm^3, hier war das Leuchten nach 40 Stunden erloschen.

Nach 80 Stunden zeigten die Serien, die 6-10 cm^3 Luft enthielten keine Lichterscheinung mehr. Die Kontrolleprouvetten, in denen die Leuchtbakterien ohne Prodigiosus wuchsen, und wo ihnen genügend Luft zur Verfügung stand, leuchteten unbegrenzt weiter.

Dieselbe Versuchsanordnung wurde wiederholt, nur wurde statt des Prodigiosus Pyrogallussäure verwendet. Hierbei erlosch das Licht der Leuchtbakterien schon nach 70 Min. Daraus ergibt sich, dass die Wirkung des Prodigiosus abhängig ist von der Menge der zur Verfügung stehenden Luft und der Anzahl der Kolonien, die in der Bouillon enthalten sind. In den Serien 6-10 war die Luftmenge gross und die Prodigiosusmenge klein, da ja mit steigender Luftmenge die Bouillonmenge sank. Pyrogallussäure hingegen ist bedeutend weniger abhängig von der Luftmenge, sie zehrt selbst grössere Mengen, für die der Prodigiosus Tage braucht, in Minuten auf.

Als nächstes sollte festgestellt werden, ob die Leuchtbakterien ihr Leuchten schneller einstellten, wenn der Prodigiosus bebrütet und damit seine Vermehrung beschleunigt wurde. Für diesen Zweck wurden besondere Glasröhren angefertigt, die oben und unten offen waren. Im oberen Teil enthielten sie eine Scheidewand, an der ein Näpfchen sass, das die Fischagar aufnehmen sollte. Der untere Teil



wurde mit einem Kautschukstopfen geschlossen; durch dessen beide Oeffnungen ragten zwei gebogene Kapillare in das Innere der Röhre. Durch eine von beiden wurde Prodigiosusbouillon eingefüllt, dann wurden beide verschlossen und der untere Teil der Röhre in einer Wasserbad von 37° gestellt. In den

oberen Teil wurden zwei dünne, gebogene Glasröhren gehängt, die eine war durch einen Schlauch mit einer Wasserleitung verbunden, die andere leitete das ständig rieselnde Wasser durch einen Schlauch in das Abflussbecken. Dadurch wurde das Näpfchen mit dem Fischagar, auf dem die Leuchtbakterien wuchsen, ständig gekühlt, und sie hatten nicht unter der Bruttemperatur des Prodigiosus zu leiden. Bei dieser Versuchsanordnung zeigte es sich, dass das Leuchten nach 20 Stunden erloschen war bei einer Luftmenge von 7-9 cm^3. Die Vermehrungsintensität des Prodigiosus war also durch die Bebrütung so gesteigert worden, dass sein Sauerstoffbedürfnis ungefähr viermal grösser war als bei Zimmertemperatur. Dies Ergebnis ist wichtig für die Anaerobierzucht, die ja stets bei Temperaturen von $37^{o}_{\varnothing}$ stattfinden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die sauerstoffzehrende Wirkung des Prodigiosus besonders gross ist, wenn er 1. eine bestimmte Vermehrungsintensität erreicht hat, 2. wenn die zur Verfügung stehende Atemluftmenge klein ist, und 3. wenn Bruttemperatur herrscht. Die Versuchsergebnisse von Bachmann und Uhrovits fanden auch auf anderem als gasanalytischem Wege ihre Bestätigung. Der Sauerstoff der Atemluft wurde völlig aufgezehrt, das Erlöschen des Leuchtbakterienlichtes, das mit den geringsten Sauerstoffmengen unterhalten werden kann, zeigt die sauerstoffreien Atmosphäre deutlich an.

Nach diesen Ergebnissen konnte man indie eigentlichen Versuche über das Verhältnis des Prodigiosus zu den Anaerobiern eintreten. Wie einleitend schon gesagt wurde, geben die Anaerobier in Traubenzuckernährагar in bestimmter Höhe des Nährbodens Plattenbildung; es ist anzunehmen, dass an dieser Stelle ein besonders günstiges Potential liegt, da ja

eine Ansammlung von Bakterien auf sehr günstige Ernährungsbedingungen schliessen lässt. Dem Traubenzuckernähragar wurde KCy in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, damit wurde zweierlei erreicht: Die Reduktionskraft des Nährbodens wurde erhöht und das Atmungsferment der Anaerobier, soweit es von Fe katalysiert wird, beeinflusst.

Die nächste Frage, die uns interessiert, hiess; wie wirkt der Prodigiosus auf die Plattenbildung ein. Um dies feststellen zu können, musste man ~~sich~~ erst eine geeignete Technik ausprobieren.

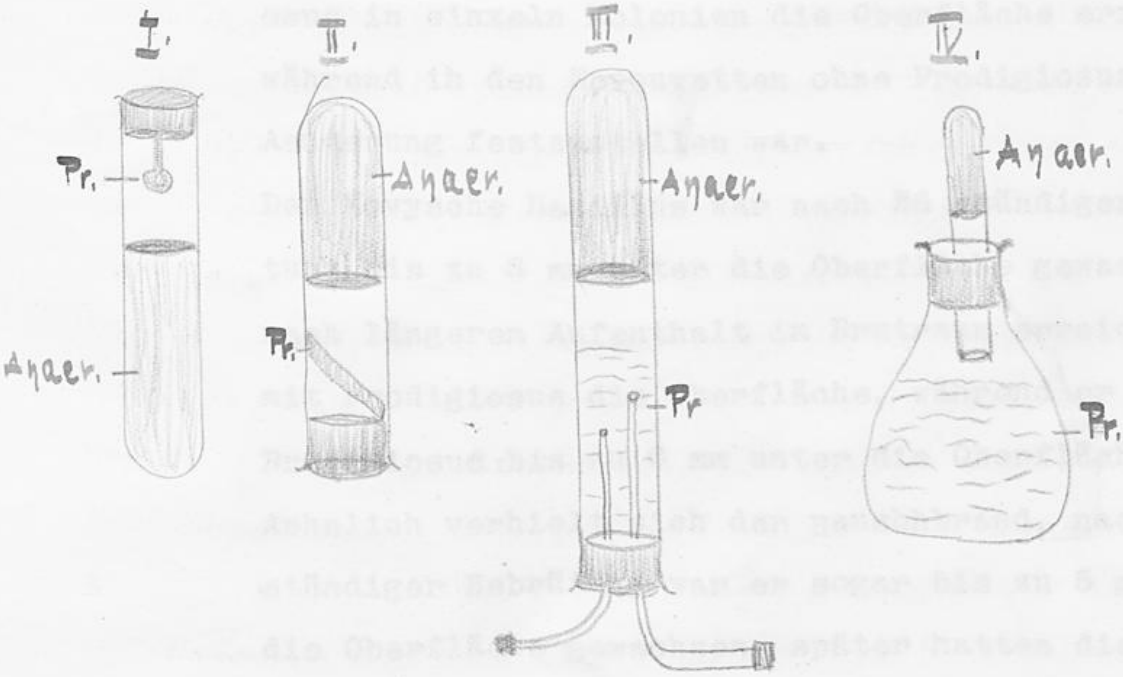
1. Versuch: Kleine Eprouvetten wurden mit einem Korkstopfen verschlossen. Im Stopfen wurde ein Glasstäbchen befestigt, das mit Watte umwickelt war. Die Watte wurde in flüssigen Nähragar getaucht, der mit Prodigiosus beimpft war. Der untere Teil der Eprouvette wurde mit Traubenzuckernähragar gefüllt und mit einem Anaerobier beimpft. Der Nachteil der Technik lag darin, dass der Prodigiosus leicht auf den Traubenzuckernährboden tropfte und sich dort ansiedelte. Ausserdem reichte er nicht aus, um irgendwelche Veränderungen im Nährboden hervorzurufen.

2. Versuch: Die kleinen Eprouvetten wurden wieder mit Traubenzuckernähragar bis zu einer bestimmten Höhe gefüllt, mit einem Anaerobier beimpft, mit Korkstopfen verschlossen und umgekehrt. Kleine Glasröhren wurden in Nähragar ~~getaucht~~ und dann in Prodigiosusbouillon getaucht und in die Eprouvette gestellt. Die Gefahr einer Verunreinigung des Prodigiosus war hier sehr gross, seine Menge nicht ausreichend und die Technik sehr umständlich.

3. Versuch: Grosse Eprouvetten wurden mit einer abgemessenen Menge Traubenzuckernähragar gefüllt, mit einem Anaerobier beimpft, mit einem durchbohrten Gummistopfen verschlossen und umgekehrt gestellt. Durch die beiden Oeffnungen rag-

ten zwei gebogene Glasröhrchen in das Innere der Eprouvette. Durch die eine wurde mit Prodigiosus beimpfte Bouillon eingefüllt und dann beide Röhrchen verschlossen. Zu dieser Anordnung braucht man unnötig viel Nähragar, die Eprouvetten sind schwer zu stellen und die Bouillon benetzt leicht den Nährboden. Dadurch ist die Verunreinigungsgefahr sehr gross.

4. Versuch: Kleine Erlenmeyerkolben wurden mit Bouillon gefüllt, sterilisiert und mit Prodigiosus beimpft. Verschlossen wurden sie mit einem durchbohrten Kautschukstopfen, durch den eine kleine mit Traubenzuckernähragar gefüllte Eprouvette gesteckt war. Diese wurde dann mit dem Anaerobier beimpft. Die Gefahr einer Verunreinigung war hier am geringsten, da alle Teile gut sterilisiert und abgeflammt werden konnten. Vor allen Dingen war hier die Prodigiosusmenge vollständig ausreichend.



Vorversuche mit Technik 3.

Es sollte zuerst einmal festgestellt werden, ob und wie die Anaerobier in einer Eprouvette auf Traubenzuckernähragar ihr Wachstum änderten, wenn ihnen wenig Luft zur Verfügung stand und diese ausserdem noch durch den Gasstoffwechsel des Prodigiosus beeinflusst wurde. Als erster Anaerobier wurde der Tetanus untersucht. Er wurde mit einer Drahtöse in den noch flüssigen Traubenzucker-Nähragar geimpft und als dieser erstarrt war, wurde die Eprouvette umgekehrt und mit Prodigiosusbouillon gefüllt und in den Brutschrank gestellt. Nach 36 stündiger Bebrütung war sowohl der Traubenzuckernähragar ohne wie mit Prodigiosus bis 10 mm unter der Oberfläche mit Tetanus bewachsen. Nach 10 tägiger Bebrütung hatte der Tetanus in den Eprouvetten mit Prodigiosus in einzeln Kolonien die Oberfläche erreicht, während in den Eprouvetten ohne Prodigiosus keine Aenderung festzustellen war.

Der Novysche Bazillus war nach 36 stündiger Bebrütung bis zu 8 mm unter die Oberfläche gewachsen, nach längerem Aufenthalt im Brutraum erreichte er mit Prodigiosus die Oberfläche, während er ohne Prodigiosus bis zu 6 mm unter die Oberfläche wuchs. Aehnlich verhielt sich der Rauschbrand, nach 36 stündiger Bebrütung war er sogar bis zu 5 mm unter die Oberfläche gewachsen, später hatten die Kolonien die Oberfläche erreicht, in den Eprouvetten ohne Prodigiosus blieb allerdings das Wachstum bis auf 5 mm unter der Oberfläche beschränkt.

Als letzter wurde der Bazillus Hystolytikus angesehn. Er wuchs mit Prodigiosus zusammen bis zu 6 mm unter die Oberfläche, ohne Prodigiosus bis zu 9 mm. Nach längerer Bebrütung trat keine Aenderung mehr ein. An diesen Vorversuchen konnte man schon eine gewisse Abstufung der Anaerobier erkennen, in Bezug auf ihre Reaktion gegenüber den Reduktionskräften des Prodigiosus. Tetanus erwies sich als der am schwersten zu Beeinflussende, erst nabh mehr als 10 Tagen ist der Nährboden soweit verändert, dass einzelne spärliche Kolonien direkt unter der Oberfläche ein Auskommen finden. Dem Tetanus schliesst sich der Histolytikus an, er wächst etwas höher hinauf, nämlich bis zu 6 mm unter die Oberfläche; aber hier ist das Wachstum nicht mehr zu beeinflussen, das Potential des obersten Teiles erlaubt keine Ansiedlung. Der Prodigiosus hat aber Arbeit geleistet: er hat die Wachstumsgrenze dieses Anaerobiers um 3 mm nach oben verschoben. Daraufhin kann man annehmen, dass nicht nur die O_2-Tension der Atemluft verringert werden muss, sondern auch die des Nährbodens.

Am stärksten wurde der Novysche Bazillus und der Rauschbrand vom Prodigiosus beeinflusst. Beide erreichten die Oberfläche und konnten sich in der ihrem Wachstum vorher ungünstigen Zone ansiedeln und vermehren. Der Prodigiosus veränderte für den Novyschen Bazillus eine Zone von 6 mm Breite und für den Rauschbrand eine solche von 5 mm; Rauschbrand verlangt demnach ein geringeres Reduktionspotential, da er ja auch vorher schon höher hinauf wuchs als der Novysche Bazillus.

Interessant sind die Bebrütungszeiten, alle Anaerobier wuchsen bis zu 36 Stunden unbeeinflusst durch den Prodigiosus, dann erst setzt dessen verändernde Kraft ein. Er muss erst selber eine gewisse Wachstumsstärke erreicht haben, ehe er durch seinen Gasstoffwechsel die Anaerobier merkbar beeinflusst. Vielleicht heisst das; dass er 36 Stunden mit dem O_2 der ihm zur Verfügung stehenden Luft ausreicht und dann erst den im Nährboden noch gelöst vorhandenen O_2 in Angriff nimmt. Andererseits könnte man aber auch annehmen, dass der Prodigiosus reduzierende Gase produziert und diese dann die Reduktionsbereitschaft des Anaerobiernährbodens erhöhen. Aber diese Annahme ist nicht so wahrscheinlich, da ja die Pyrogallussäure, die sicher keine reduzierenden Gase entwickelt, die Wirkung des Prodigiosus übertrifft.

Versuche mit Technik 4.

Die Erlenmeyerkolben wurden bis über die Hälfte mit Bouillon gefüllt, die mit Prodigiosus ~~gefüllt~~ beimpft wurde und mit einem Wattebausch verschlossen. Die kleinen Eprouvetten wurden mit 4,5 cm^3 Taubenzuckernähragar und 0,5 cm^3 KCy beschickt. Die KCy-Konzentration waren mol: 7,81 bis mol: 4000 stark. KCy und Traubenzuckernähragar wurden in flüssigem Zustand gut durchmischt und bei 37° (im Wasserbad) mit einem Anaerobier beimpft und ebenfalls mit einem Wattebausch verschlossen. Wenn der Nährboden erstarrt war, wurden die Eprouvetten in den durchbohrten Kautschukstopfen gesteckt, der Erlenmeyer-

mol: 7,81; mol: 15,62; mol: 31,25
mol: 62,5; mol: 125; mol: 250
mol: 500; mol: 1000; mol: 2000 + mol: 4000

kolben verschlossen und das ganze in den Brutschrank (37°) gestellt. Durch Vorversuche war festgestellt worden, welche KCy-Konzentrationen die verschiedenen Anaerobier noch vertragen konnten. Kontrolleprouvetten ohne KCy wurden zum Vergleich in den Versuch miteinbezogen.

Als erster Anaerobier wurde der Tetanus untersucht. Die KCy-Konzentrationen waren mol: 31,25 bis mol: 2000 stark. Nach zwölfstündiger, selbst fünftägiger Bebrütung, hatten die Bakterien in keiner Eprouvette den die Oberfläche erreicht. Die Grenze zwischen dem unbewachsenen und dem bewachsenen Teil des Nährbodens war scharf. Das Wachstum war gut, besonders bei den niederen KCy-Konzentrationen, bei den höheren schwächer. Nach zwölfstündiger Bebrütung trat von mol: 125 bis zu mol: 2000 Gasblasenbildung auf. Die Eprouvetten, die unbeeinflusst von Prodigiosus wuchsen, waren um 10 mm niedriger bewachsen. Die Kontrolleprouvetten, die mit Tetanus und Prodigiosus ohne KCy wuchsen, zeigten die beste Besiedelung, hingegen war das Wachstum in der Eprouvette sehr schlecht, der sowohl Prodigiosusbouillon als auch KCy fehlte. Die Vergleichsversuche, mit Pyrogallussäure statt Prodigiosusbouillon, ergaben, dass hier der Tetanus bereits nach zwölfstündiger Bebrütung in allen Eprouvetten, ausser bei mol: 31,25 die Oberfläche erreicht hatte. Bei mol: 31,25 war das Wachstum schwach, ohne Plattenbildung. Bei mol: 125 trat Gasblasenbildung auf. Nach 24 stündiger Bebrütung war auch der Tetanus bei mol: 31,25 bis zur Oberfläche gewachsen.

Zusammenfassung: Tetanus ist ein ganz ausgesprochener Anaerobier, der ein starkes Reduktionspotential für sein Wachstum verlangt. Pyrogallussäure reduziert den Nährboden ausreichend und ermöglicht dadurch ein Wachstum des Tetanus bis zur Oberfläche. Der Prodigiosus dagegen verringert die O_2-Spannung nicht genügend: der Tetanus kann den oberen Teil des Nährbodens nicht besiedeln. Was die KCy-Konzentrationen anbetrifft, so lässt sich sagen, dass eine Stärke von mol: 31,25 bereits hindernd auf deas Bakterienwachstum einwirkt, vielleicht beeinflusst sie hier einen Schwermetallabhängigen Atmungsmechanismus ungünstig. Mol: 31,25 und mol: 62,5 wirken der Gasbildung entgegen, die Traubenzuckervergärung, d.h. ihre letzte Stufe, die Bildung von H_2 und CO_2 wird unterdrückt. Beim Wachstum des Tetanus, unbeeinflusst durch den Prodigiosus wirkt das KCy viel stärker hemmend. Erst bei der niedrigsten Konzentration von mol: 2000 ist das Wachstum mässig zu nennen. Gasblasenbildung tritt erst bei mol: 500 auf. Da zwei schädigende Faktoren einwirken, das giftige KCy und der O_2 der Luft, ist das schlechte Wachstum leicht zu verstehen.

Nach dem Tetanus wurde der Rauschbrand untersucht. Die KCy-Konzentrationen hatten eine Stärke von mol: 7,81 bis zu mol: 500. Es wurde zuerst festgestellt, dass trotz der enorm starken KCy-Konzentration von mol: 7,81 noch Wachstum möglich war. Das Wachstum in den Eprouvetten unterhalb von mol: 500 zeigte nichts besonderes und nichts anderes,

als mol: 500 selber. Das Wuchsbild dieser niederen Konzentration wird dem in den Eprouvetten ohne KCy langsam gleich. Bebrütet wurde 48 Sunden und alle 12 Stunden das Wachstum kontrolliert.
Pyrogallussäure wirkt auch hier wieder so stark reduzierend, dass bereits nach 12 Stunden in allen Eprouvetten Wachstum bis zur Oberfläche festzustellen ist. Nur mol: 7,81 ist erst nach 48 stündiger Bebrütung bis zur Oberfläche bewachsen. Bei allen Eprouvetten ist die untere Hälfte stärker besiedelt als die obere, besonders in der Kontrolleprouvette ohne KCy und in den Eprouvetten mit den Konzentrationen von mol: 31,25 bis mol: 125. Bei letzterer setzt auch wieder die Gasblasenbildung ein. Nach 36 stündiger bezw. 48 stündiger Bebrütung ist das Bild im ganzen dasselbe, das Wachstum hat natürlich zugenommen.
Der Rauschbrand, der unbeeinflusst von Pyrogallussäure oder Prodigiosus gewachsen war, zeigte nach 12 stündiger Bebrütung ein gutes Wachstum, das mit einer Platte durchschnittlich 12 mm unter der Oberfläche abschliesst. Mol: 7,81 ist auch hier wachstumsfrei, mol: 15,62 und die Eprouvette ohne KCy sind nur bis 15 mm unter die Oberfläche gewachsen. Bei der KCy-Konzentration von mol: 125 beginnt die Gasbildung. Nach 36 stündiger Bebrütung ist das Wachstum bis zu 10 mm unter die Oberfläche gestiegen. Es schliesst jetzt aber nicht mehr mit einer Platte ab. Mol zu 7,81 ist noch wachstumsfrei. Nach 48 stündiger Bebrütung ist keine Aenderung eingetreten.

Ganz anders verhält sich derRauschbrand in den Eprouvetten, die von Prodigiosus beeinflusst wgren. Nach 12 stündiger Bebrütung ist allerdings das Wuchsbild dem des Rauschbrsnd ohne Sauerstoff zehrende Medien noch sehr ähnlich. Auch hier ist wie dort die Eprouvette mit der KCy-Konzentration von mol: 7,81 wachstumsfrei, Auch hier beginnt die Gasbildung bei mol: 125. Aber alle Eprouvetten sind durchschnittlich um 2 mm höher gewachsen, mol: 15,62 bis mol: 62,5 schliessen ihr Wachstum ohne Platte ab. Es hat sich also hier an keiner Stelle eine besonders günstige Zone für das Wachstum entwickelt. Nach 36 stündiger Bebrütung haben sich aber di Verhältnisse grundlegend verändert. Mol: 7,81 zeigt jetzt Wachstum, zwar nur im unteren Teil 12 mm sind noch wachstumsfrei. Nach 48 stündiger Bebrütung sind aber auch hier bis zur Oberfläche zahlreiche Kolonien zu sehen. Bei allen KCy-Konzentrationen ist das Wachstum bis zur Oberfläche fortgeschritten. Dabei treten sehr interessante Erscheinungen auf. Mol: 15,62 zeigt in den oberen 10 mm schwächerss Wachstum, darauf folgt eine schöne Platte sehr guten Wachstums, die abgelöst wird von einer eben so breiten (1,5 mm) Zone, die gänzlich bakterienfrei ist. Darunter liegt wieder eine ebenso breite reichlichen Bakterienwuchses. Bis zum Grund der Eprouvette sind von da ab die Kolonien gleichmässig zahlreich. Mol: 31,25 zeigt dieselben Erscheinungen, nur sind hier die Platten schmaler -0,5 mm breit- die bakterienfreie

Zone hat allerdings die gleidhe Breite wie obe (1,5 mm). Die Platten liegen auch an der gleichen Stelle wie bei mol: 15,62. Mol: 62,5 zeigt keine Besonderheiten, die oberen 10 mm sind schwächer besiedelt als der übrige Teil, ausserdem setzt hier jetzt schon die Gasblasenbildung ein. Mol: 125 ist gleichmässig gut bewachsen, 11 mm unter der Oberfläche liegt eine 1 mm breite Wachstumsfreie Platte. Mol: 250 zeigt an dieser Stelle eine Zone besonders guten und reichlichen Wachstums. Mol: 500 ist durchweg gleichmässig bewachsen. Die Eprouvette, der bei sonst gleichen Bedingungen kein KCy zugesetzt war, ist sehr stark von Gasblasen zerrissen, und in den oberen 10 mm schlechter bewachsen als im unteren Teil 12 mm unter der Oberfläche liegt eine Platte aus dichter Bakterienansammlung.

<u>Zusammenfassung:</u> Rauschbrand ist in seinem Verhalten weniger streng anaerob als Tetanus. Er verlangt ein geringeres Reduktionspotential, das im Nährboden schon durch den Einfluss des Prodigiosus zu erreichen ist. Hier tritt uns zum erstenmal ein sogenanntes negatives Niveau entgegen, das heisst, zwischen zwei Zonen starken Wachstums liegt eine gänzlich wachstumsfreie. Man muss annehmen, dass hier ein Ort stärkster Oxydation und deshalb ungünstigster Lebensbedingungen für die Anaerobier vorligt. Dies negative Niveau tritt bei

den starken KCy-Konzentrationen auf, von mol: 15,62 , mol: 31,25 und mol: 125, mol: 62,5 hat allerdings an dieser Stelle eine Platte starken Wachstums. Nach diesen Erscheinungen könnte man annehmen, dass das negative Niveau vielleicht dadurch bedingt ist, dass hier der Sauerstoff der Zehrung durch den Prodigiosus den grössten Widerstand leistet. Bei Pyrogallussäure tritt die negative Niveaubildung nicht auf, Pyrogallussäure wirkt so stark zehrend, dass der Nährboden gleichmässig vom Sauerstoff befreit wird. Pyrogallussäure und Prodigiosus ermöglichen es dem Rauschbrand selbst bei der stärksten KCy-Konzentration von mol: 7,81 zu wachsen, das Oxydationspotential wird so günstig gestaltet, dass trotz der Atmung hemmenden Wirkung des KCy das Wachstum stattfinden kann.

In der dritten Versuchsreihe wurde der Novysche Bazillus benutzt. Novy ohne Sauerstoffentziehende Mittel zeigte gutes Anaerobes Wachstum, das nabh zwölfstündiger Bebrütung ungefähr 13 mm unter der Oberfläche abschloss. Gasblasenbildung tritt nur in der Eprouvette auf, der kein KCy zugesetzt war. Mol: 7,81 und mol: 15,62 zeigten nur ganz im Grunde des Nährbodens ganz schwaches Wachstum. Nach 36 s stündiger Bebrütung war das Wachstum durchschnittlich um 1-2 mm mehr an die Oberfläche

gestiegen in allen Eprouvetten. Mol: 7,81 war nur im Grunde der Eprouvette spärlich bewachsen, mol: 15,62 zeigte jetzt auch Plattenbildung. Bei mol: 250 traten die ersten Gasblasen auf. Nach 48 stündiger Bebrütung hatte sich das Bild kaum verändert. die Eprouvetten, in denen der Prodigiosus den Sauerstoff aufzehrte, waren nach zwölfstündiger Bebrütung durchschnittlich bis 9 mm unter die Oberfläche bewachsen. Das Wachstum schloss ab mit Plattenbildung. Gasblasen traten bei mol: 500 erstmalig auf. Mol: 7,81 und mol: 15,62 blieben unbesiedelt. Nach 36 stündiger Bebrütung war mol: 7,81 immer noch unbewachsen, bei mol: 15,62 hatten sich zarte Kolonien gebildet, die den unteren Teil des Nährbodens durchzogen. Mol: 31,25 bis mol: 125 schlossen ihr Wachstum mit Platten ab. Die Gasblasenbildung beginnt jetzt bereits bei mol: 62,5. Bei mol: 250 und mol: 500 reicht das Bakterienwachstum bis zur Oberfläche. Nach 48 stündiger Bebrütung tritt bei mol: 7,81 spärliche Koloniebildung auf, bei mol: 25,62 hatte sich das Wachstum verstärkt. Die übrigen Konzentrationen zeigten keine wesentliche Veränderung. Bedeutend stärker als der Prodigiosus wirkt natürlich wieder die Pyrogallussäure. Nach 12 stündiger Bebrütung sind die Kolonien bei mol: 31,25 nur noch 7 mm von der Oberfläche ent-

fernt, bei mol: 62,5 nur mehr 4 mm, bei beiden schliesst das Wachstum mit einer Platte ab. Bei allen übrigen schwächeren Konzentrationen haben die Bakterien die Oberfläche erreicht. Gasblasen sind erst bei mol: 500 zu finden. Mol: 7,81 ist wachstumsfrei, mol: 15,62 zeigt schwache Koloniebildung. Nach 36 stündiger Bebrütung sind alle Eprouvetten ausser mol: 7,81 das wachstumsfrei geblieben ist, bis zur Oberfläche des Nährbodens bewachsen. Gasblasen treten jetzt schon bei mol: 125 auf.

Zusammenfassung: Dass die Plattenbildung mit dem anaeroben Wachstum zusammenhängt, zeigt sich hier besonders deutlich. Sie ist am ausgeprägtesten in den Eprouvetten, die nicht von der Aussenluft abgeschlossen waren. Wo das Wachstum aufhörte, war eine Platte zu sehen, eine reiche Ansammlung von Bakterien, die in dieser Zone, wie es scheint das ihnen am meisten zusagende Potential finden. Die Plattenbildung hängt auch von der KCy-Konzentration ab, denn diese wirkt ja potentialmitbestimmend, da sie die reduzierenden Kräfte erhöht. Dort wo der Prodigiosus durch sein Wachstum auf den Nährboden einwirkt, ändert sich auch die Plattenbildung. Z.T. wird sie undeutlich, das mag daran liegen, dass durch die ständige Aenderung im Stoffwechsel des Prodigiosus der Nährboden der Anaeroben kein bestimmtes Potential ausbilden kann, z.T. verschwindet sie

ganz, besonders dort, wy die reduzierenden Kräfte schon ein Wachstum bis zur Oberfläche ermöglicht haben. Die Pyrogallussäure lässt die Plattenbildung ganz aufhören. Dass aber auch hier die Verhältnisse im Nährboden nicht überall die gleichen sind, sieht man daran, dass der untere und mittlere Teil des Nährbodens oft besser und stärker besiedelt ist als der obere. Da aber die Pyrogallussäure nicht eher ruht, als bis dem Nährboden aller Sauerstoff entzogen ist, so haben sich nach längerer Bebrütungszeit auch die Bakterien gleichmä ssig verteilt, denn sie finden ja jetzt vermutlich überall die gleichen Wachstumsbedingungen vor. Die starken KCy-Konzentrationen sind für den Novyschen Bazillus stark wachstums- und atmungshemmend. ~~Trotzdem~~ Obgleich ihm durch die Pyrogallussäure und den Prodigiosus die Lebensbedingungen verbessert werden, kann er bei mol: 7,81 und mol: 15,62 sehr schlecht gedeihen. Die Gasblasenbildung wird lange Zeit gehemmt, besonders gut ist sie überhaupt nur in den Eprouvetten ohne KCy entwickelt. Erst bei längerer Bebrütung ist es den Bakterien möglich ab mol: 125 den Traubenzucker völlig zu vergären. Wo aber die Schädigung durch KCy nicht gemildert wird, durch ein Potential verbesserndes Medium, also in den Eprouvetten , die mit der Aussenluft in Verbindung stehen, tritt die Gasblasenbildung erst nach 36 stün-

diger Bebrütung bei mol: 250 auf.

Der Fraenkelsche Gasbazillus erwies sich unter den bisher untersuchten Anaerobiern als der, der das geringste Reduktionspotential verlangte. Schon nach 12 stündiger Bebrütung war er in dem Traubenzuckenähragar, der mit der Luft in Verbindung stand, bis 3 mm unter die Oberfläche gewachsen. Dort schloss er sein Wachstum mit einer 2 mm dichten Platte ab. Mol: 7,81 blieb wachstumsfrei, mol: 15,62 war spärlich bewachsen, mol: 31,25 dagen gut gut und war von Gasblasen durchsetzt, bei mol: 62,5 und allen folgenden niederen Konzentrationen hatte das Gas den Nährboden so zerrissen, dass besondere Einzelheiten in Bezug auf Wachstum und Plattenbildung nicht mehr festzustellen waren. In den Eprouvetten, in denen die Pyrogallussäure den Sauerstoff zehrte, hatten die Bakterien bereits nach 12 Stunden die Oberfläche erreicht. Mol: 7,81 blieb auch hier wachstumsfrei, mol: 15,62 war nur zart besiedelt, während die 4 mm, die direkt unter der Oberfläche lagen, dicht bewachsen waren. Das selbe Bild war bei mol: 31,25 zu sehen, hier durchsetzten aber schon zahlreiche Gasblasen den Nährboden. Mol: 62,5 und alle folgenden KCy-Konzentrationen waren gleichmässig bewachsen und von den Gasblasen zerrissen.

Mol: 7,81 blieb auch da wachstumsfrei, wo der Prodigiosus auf den Nährboden einwirkte. Mol: 1 5,62 war schwach besiedelt, mol: 31,25 etwas stärker, die obersten 4mm aber besonders gut und dicht. Hie

beginnt die Gasbildung, die bei mol: 62,5, wo der Nährboden gleichmässig gut bewachsen ist, stärker wird um in den folgenden Konzentrationen den Nährboden zu zerreissen.

Zusammenfassung: Der Fräenkelsche Gasbazillus ist weniger streng anaerob als die bisher untersuchten Bakterien, da er schon nach 12 stündiger Bebrütung mit den potentialändernden Medien bis zur Oberfläche gewachsen ist. Sein Bestreben, den Traubenzucker zu vergären, ist besonders stark ausgeprägt, selbst die KCY-Konzentration von mol: 31,25 kann ihn nicht daran hindern. Das KCy wirkt nur bei mol: 7,81 absolut giftig und unterdrückt dort sein Wachstum völlig, während mol: 15,62 schon nach 12 stündiger Bebrütung gleichmässiges Wachstum ermöglicht. Fe scheint hier demnach kein wichtiger Atmungskatalysator zu sein. Die Plattenbildung ist besonders breit ausgebildet, und zwar bei mol: 15,62 und mol: 31,25 direkt unter der Oberfläche . Also muss dort bei den starken KCy-Konzentrationen für ihn das Reduktionsoptimum liegen. Vielleicht sind in der Tiefe des Nährbodens die Reduktionskräfte zu gross, weil dort der O_2 scheinbar stärker herausgezogen und ausserdem die Reduktion noch durch KCy vergrössert wird.

Methylenblauversuche.

Um nun über das Reduktionsvermögen des Prodigiosus noch etwas mehr zu erfahren, liess man ihm auf Farbstoffe, besonders auf Methylenblau einwirken.

Aus dem Verhalten eines Organismus einem Farbstoff gegenüber kann man nämlich leidht Schlüsse ziehen auf den Chemismus seines Stoffwechsels, da das lebende Gewebe O_2 verbraucht und CO_2 produziert, wirkt es reduzierend. Dieses Reduktionsvermögen kann man näher definieren, wenn man seine Einwirkung auf Farbstoffe und ihre Leukoverbindungen ansieht. Die Versuchsanordnung blieb die gleiche wie bei den Bakterienversuchen, 4,5 cm^3 Traubenzuckernähragar wurden mit 0,5 cm^3 KCy und 0,5 cm^3 Methylenblau versetzt. (1 g Farbstoff gelöst in 4 l H_2O). Zum Vergleich wurde auch wieder Pyrogallussäure herangezogen. Methylenblau entfärbt sich nicht bei einfacher Sauerstoffentziehung, denn um in Leukomethylenblau überzugehen, muss der Farbstoff Wasserstoff aufnehmen. Dieser Prozess ist reversibel, kann das Leukomethylenblau ein H-Atom und ein Elektron abgeben, so verwandelt es sich wieder in das Methylenblau zurück. Falls der Prodigiosus durch O_2-Zehrung wirklich das Potential des Nährbodens ändert, mit dem das Methylenblau vermisdht ist, so muss dieses seine Farbe ändern. Aus den Versuchen mit den Anaerobiern hat sich überdies ergeben, dass bestimmte Zonen des Nährbodens vom Wachstum bewonders begünstigt werden; es erhebt sich nun hier die Frage, ob es ebensolche Zonen für das Methylenblau gibt, d.h. ob an irgendwelchen Stellen des Nährbadens der Farbstoff mehr oder weniger entfärbt wird, wie anä andern. Dabei interessiert besonders, die Ein-

wirkung des Prodigiosus, werden diese Zonen, bzw. Plattenbildungen durch seinen Stoffwechsel verändert. Um überhaupt erst einmal festzustellen, ob der Prodigiosus Einfluss besitzt auf die Entfärbung, wurden mehrere Vorversuche mit Technik 3 angesetzt. Das Methylenblau hatte verschiedene Verdünnungsgrade und zwar ~~eins~~: 4000, ~~eins~~: 8000 ~~eins~~: 16000. Nach 12 stündiger Bebrütung zeigte si sich, dass in allen Verdünnungen das Methylenblau im unteren Teil der Eprouvette entfärbt war, während die oberen 11 mm (1:4000) und 12 mm (1:8000 und 1:16000) noch unverändert waren. In den Kontrolleprouvetten ohne Prodigiosus war die Entfärbung 3-4 mm wniger weit fortgeschritten. Der gleiche Versuch mit Pyrogallussäure an Stelle des Prodigiosus ergab bereits nach 12 stündiger Bebrütung eine vollständige Entfärbung des Nährbodens. An diese Vorversuche schlossen sich die Versuche mit Technik 4 an. Die KCy-Konzentrationen liefen wieder von mol: 7,81 bis mol: 1000, Methylenblau hatte die Verdünnungen 1:4000 und 1:8000. Bei stärkeren Konzentrationen schritt die Umwandlung in Leukpmethylenblau zu langsam fort, bei grösseren Verdünnungen war der Nährboden zu schwach gefärbt.

Methylenbläuverdünnung 1:4000: Nach 12 stündiger Bebrütung waren die Verhältnisse bei den Eprouvetten mit oder ohne Prodigiosus recht ähnlich. Die Kontrolleprouvetten ohne KCy waren bis zu 17 bzw. bis zu 12 mm (mit Prodigiosus) entfärbt und

schlossen mit einer schönen stärker gefärbten Platte gegen den unteren farblosen Teil des Nährbodens ab. Mol: 7,81 ohne Prodigiosus war bis zu 8 mm entfärbt, 5 mm unter der Oberfläche war eine zarte Platte ~~ausgebildet~~ ausgebildet. Mol: 7,81 mit Prodigiosus war ebenso weit entfärbt, die Platte lag nur 0,5 mm tiefer. Mol: 15,62 war bis zu 10 mm entfärbt, bei 10, 6, und 4 mm war eine Platte ausgebildet, bis zu 4mm unter der Oberfläche war der Nährboden stärker gefärbt, als tiefer Mit Prodigiosus zusammen reichte die Entfärbung nur bis zu 11,5 mm, eine Platte lag 8 mm unter der Oberfläche. Mol: 31,25 war bis zu 14 mm unter der Oberfläche gefärbt, mit Prodigiosus bis zu 12,5 mm, beide Nährböden zeigten keine Platten bildung. In Mol: 62,5 reichte die Entfärbung bis zu 12 mm unter die Oberfläche, bei 12 und 8 mm lag eine Platte, Die Eprouvette mit Prodigiosus zeigte daselbe Bild, hier lag die zweite Platte aber bei 10 mm . Mol: 125 bis mol: 1000 mit und ohne Prodigiosus waren durchschnittlich bis zu 14 mm unter der Oberfläche entfärbt, an der Grenze zum ungefärbten Teil des Nährbodens lag eine dunkler gefärbte Zone oder eine schöne, klare Platte. Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen sind also wieder nach 12 stündiger Bebrütung kaum angedeutet. Die Entwicklung ~~de~~ des Prodigiosus ist noch nicht so weit fortgeschritten, dass er den Nährboden durch seinen Stoffwechsel irgendwie merkbar beeinflusst. Auch

hier treten wie bei den Anaerobierversuchen Plattenbildungen an bestimmten Stellen des Nährbodens auf. Dort waren es Ansammlungen einer grösseren Anzahl von Kolonien, hier ist es eine Zone besonders ausgesprochener Färbung. Es fragt sich jetzt, ob sich diese Zonen bei längerer Bebrütungsdauer irgendwie verschieben. Die Versuche bestätigten dies tatsächlich. Nach 36 stündiger Bebrütung haben sich nämlich die Verhältnisse völlig verändert. War die Plattenbildung bisdahin einzeln und zart aufgetreten, so sieht man sie jetzt breit und zahlreich ausgebildet. Schon bei den Kontrolleprouvetten ohne KCy treten Doppelplatten auf, eine liegt direkt an der Grenze zur ungefärbten Zone und eine etwas höher. Die Entfärbung ist jetzt bis zu 10 mm unter der Oberfläche fortgeschrschritten. Die Eprouvette mit Prodigiosus hat ihre Platte an der Grenze eingebüsst. Mol: 7,81 hat vier stärker gefärbte Bänder in kurzen Abständen übereinander gelagert, die Prodigiosuseprouvette hat wieder nur eine zarte Platte, die im Laufe der 24 Stunden etwas höher gerückt ist. Auch die Entfärbung ist damit etwas weiter fortgeschritten. Bei mol: 15,62 lagern fünf verschiedene breite stärker gefärbte Zonen im Abstand von 2mm übereinander, die Eprouvette mit Prodigiosus hat sich bereits ganz entfärbt. Bei dieser KCy-Konzentration scheinen die stärksten Reduktionskräfte im Nährboden tätig zu sein, weil einmal die überaus reichliche Plattenbildung auf Umsetzungen und Bewegungen im Agar hindeutet, und zweitens, weil

in der Prodigiosuseprouvette dieser Konzentration als einziger unter allen vorangegangenen und folgenden die vollständige Entfärbung erreicht ist. Mol: 31,25 zeigt eine breitere und zwei ganz schmale, stärker gefärbte Zonen, die mit Prodigiosus nur eine zarte 2 mm über der Grenze. Bei mol: 62,5 liegen 3 gleichbreite Platten in 2mm Abstand übereinander, die Prodigiosuseprouvette hat jetzt zwei Platten ausgebildet, die gefärbte Zone hat noch die gleiche Breite wie bei 12 stündiger Bebrütung. Mol: 125 bis mol: 1000 zeigten ähnliche Verhältnisse wie die Nährböden mit den stärkeren KCy-Konzentrationen. Der Traubenzuckernähragar, der durch Prodigiosus beeinflusst wurde, war in allen diesen Konzentrationen bis auf einen schmalen Streifen direkt unter der Oberfläche entfärbt. Nach 48 stündiger Bebrütung waren alle Prodigiosuseprouvetten farblos geworden, während in der Vergleichsserie ohne Prodigiosus die Verhältnisse die gleichen geblieben waren.

Methylenblauverdünnung 1:8000: Diese zweite Versuchsreihe zeitigte ähnliche Ergebnisse wie die erste. Nach 12 stündiger Bebrütung war wieder zwischen beiden Eprouvettenserien - mit oder ohne Prodigiosus - kaum ein Unterschied vorhanden. Nach 36 stündiger Bebrütung unterschieden sie sich wesentlich, und nach 48 stündigem Aufenthalt in der Brutzelle waren die Nährböden, auf die der Prodigiosus einwirkte, völlig entfärbt. Dieses zeigt wieder, dass der Prodigiosus zuerst

eine bestimmte Wachstumsintensität haben muss, um eine merkbare Beeinflussung ausüben zu können. Diese Intensität kann er aber erst im Laufe von 48 Stunden erreichen, er braucht eine bestimmte Zeit um zu wachsen, sich zu vermehren und seinen Stoffwechsel ein Optimum an Reduktionsintensität erreichen zu lassen. Bevor dies Optimum nicht da ist, findet keine Einwirkung auf den Nährboden statt. Vermutlich muss erst die vorhandene Luft aufgebraucht sein, ehe die Umwandlung des Nährbodens in Angriff genommen werden kann. Ist dann auch noch etwa aller vorhandener Sauerstoff aus dem Nähragar gezogen worden, so wird die Ernährung des Prodigiosus abklingen bzw. sich der Stoffwechsel auf fakultative Anaerobiose umstellen. Die Beinflussung des Nährbodens wird nicht weiter fortschreiten, die Einwirkung des Aeroben Prodigiosusstoffwechsels ist also nur eine zeitlich begrenzte, denn da keine frische Luft mehr hinzutreten kann, werden sich die Verhältnisse wohl eine zeitlang stabil halten.

Nach 12 stündiger Bebrütung waren die beiden Kontrolleprouvetten ohne KCy bis ungefähr zu 14 mm entfärbt, die Grenze zum ungefärbten Teil war scharf ohne jedoch mit einer Platte abzuschliessen. Mol: 7,81 und mol: 15,62 waren in beiden Serien bis zu 7 mm entfärbt, an der Grenze lag eine zarte, stärker gefärbte Zone. Mol: 31,25 war bis bis zu 10 mm farblos, der Nährboden ohne Prodigiosus schloss mit einer dünnen Platte ab. Mol: 62,5 ohne Prodigiosus war bis zu 13 mm entfärbt,

am Uebergang zum farblosen Teil des Nährbodens lag eine schmale Platte. Mit Prodigiosus war die Entfärbung bis zu 11 mm fortgeschrittwn, der Uebergang von gefärbt zu ungefärbt vollzog sich ohne Markierung. Mol: 125 bis mol: 500 waren durchschnittlich bis zu 12 mm farblos, die Eprouvetten ohne Prodigiosus schlossen mit einer Platt gegen den ungefärbten Teil des Nährbodens ab, die mit Prodigiosus dagegen nicht. Mol: 1000 wark bei beiden Serien bis zu 14 mm entfärbt, auch ~~hi~~ hier war die Platte nur in der Serie ohne Prodigiosus ausgebildet. Hieraus ergibt sich, dass KCy den Reduktionseinfluss unterstützt, die Reihe mit den stärkeren Konzentrationen sind nämlich in der Entfärbung weiter fortgeschritten, als die mit den schwächeren oder gar die Kontrolleprouvetten ohne KCy.

Nach 36 stündiger Bebrütung hatte sich das Aussehen der Kontrolleprouvetten nobh nicht wesentlich verändert. Mol: 7,81 bis mol: 62,5 waren in der Prodigiosusreihe schon vollständig entfärbt, während die Serie ohne Prodigiosus noch 9mm Farbe behalten hatte und mit einer Platte gegen den ungefärbten Teil des Nährbodens abschloss. Mol: 125 und mol: 250 mit Prodigiosus waren bis zu 12 mm entfärbt, mol: 250 hatte, ebenso wie die Eprouvetten ohne Prodigiosus in diesen beiden Konzentrationen eine Platte als Abschluss. Mol: 500 und mol: 1000 mit Prodigiosus schlossen bei 13mm die Entfärbung mit einer dunkleren Zone ab, die Eprouvetten ohne Prodigiosus zeigten fast die

gleichen Verhältnisse. Nach 48 stündiger Bebrütung waren alle Prodigiosuseprouvetten entfärbt, die Reihen ohne Prodigiosus hatten sich gegen die 36 stündige Bebrütung nicht wesentlich verändert. Der KCy-Einfluss auf die Entfärbung ist recht wesentlich, er unterstützt die Tätigkeit des Prodigiosus noch erheblich. In den stäkeren Konzentrationen erhöht das KCy die Reduktionskraft des Nährbodens bedeutend. Das Methylenblau wird schneller in Leukomethylenblau umgewandelt, als in den schwächeren. Mol: 500 und mol: 1000 nähern sich langsam in ihrer Reduktionsintensität derjenigen des Nährbodens ohne KCy, diese Konzentrationen sind nicht mehr ausreichend, um die Entfärbung merkbar zu beschleunigen.

In weiteren Versuchen wurden noch verschiedene andere Reduktionsmittel in ihrer Wirkung auf Methylenblau untersucht. Es wurde ja schon festgestellt, dass alkalische Pyrogallussäure die Entfärbung ungeheuer beschleunigt, und dass nach 12 stündiger Bebrütung die Nährböden farblos waren. Als nächstes wurden verschiedene Eprouvetten mit Methylenblau und in Traubenzuckernähragar evakuiert; erst nach 30 tägiger Bebrütung war der Nährboden entfärbt, um sofort wieder Farbe anzunehmen, nachdem Luft zutreten konnte.

Im folgenden Versuche wurde Methylenblau in Traubenzuckernähragar in einem Erlenmeyerkolben befestigt, (Technik 4) in dem durch

H_2SO

H_2SO_4 und Zn Wasserstoff entwickelt wurde. Auch hier war nach längerer Bebrütung keine völlige Entfärbung festzustellem.

UM beide Einflüsse zu kombinieren, nämlich die Evakuierung und die Wirkung des Wasserstoffes, wurden Eprouvetten mit Farblösung (1:4000,1:8000) in Traubenzuckernährагar in ein Rexglas gebracht. Dazu wurde eine Eprouvette gestellt, die etwas metallisch gepulvertes Zn enthielt. Auf diese wurde eine kleine Kugel gesetzt, die an einer Stelle eine kleine Oeffnung hatte und ganz mit verdünnter H_2SO_4 gefüllt war. Das ganze wurde jetzt evakuiert; bei einem bestimmten Druck tropfte dann H_2SO_4 auf das Zn und es entwickelte sich Wasserstoff, der langsam die ganze Atmosphäre ausfüllte, und die Stelle der ausgepumpten Luft einnahm. Trotzdem durch die Evakuierung der Einfluss eines andern Gases ziemlich ausgeschlossen war, wurde das Methylenblau nach 12 stündiger Bebrütung nicht völlig entfärbt, es blieb selbst in der Verdünnung 1:8000 in 3 mm Breite unter der Oberfläche ~~de~~ des Traubenzuckernährагars gefärbt. Damit wurde einerseits festgestellt, dass Luftabschluss allein nicht zur Entfärbung genügt, dass noch andere Faktoren als reiner Wasserstoff einwirken müssen, und andererseits, dass selbst die Kombination beider Faktoren nicht ausreicht, um eine Umwandlung des Farbstoffes in Leuko-

Methylenblau zu veranlassen. Daraus kann man entnehmen, dass der Prodigiosus nicht allein durch O_2-Zehrung oder vielleicht durch Bildung von Wasserstoffgas auf den Nährboden einwirkt, sondern dass noch andere Faktoren in Betracht kommen müssen, um eine Aenderung des Potentiales im Traubenzuckernähragar zu ermöglichen. Ausser Wasserstoffgas wurde dann noch der Einfluss von Leuchtgas auf das Methylenblau untersucht, aber auch hier kam es zu keiner völligen Entfärbung. 10 mm des Nährbodens unter der Oberfläche blieben selbst nach 48 stündiger Bebrütung blau. In den nächsten Versuchen wurden dem Prodigiosus durch Absorptionspapiere seine Stoffwechselgase entzogen. Geteilte Petrischalen wurden mit Blutnähragar ausgegossen, auf die eine Hälfte wurde Prodigiosus geimpft, auf die andere ein Anaerobier. Die Schalen wurden umgedreht, und in den Deckel, der jetzt unten lag, ein Filtrierpapier gelegt, das mit verdünnter NaOH, verdünnter H_2SO_4, Bleiazetat oder Kalkwasser getränkt war. NaOH sollte etwaige Säuren, H_2SO_4 Basen, Bleiazetat Schwefelwasserstoff und Kalkwasser CO_2 absorbieren. Die Petrischalen wurden mit Plastilin abgedichtet und bebrütet. Das Wachstum des Fraenkelschen Gasbazillus war unter diesen Bedingungen ausnahmslos gut, es setzte 24 Stunden später ein als das des Prodigiosus. Der Rauschbrand wuchs recht schlecht, in den Petrischalen mit Kalk-

wasser oder NaOH bildete er erst nach einer Woche Kolonien, mit H_2SO_4 oder Bleiazetat blieb das Wachstum ganz aus. Der Novysche Bazillus verhielt sich genau so. Der unempfindlichste dieser drei Anaerobier in Bezug auf die Absorption der Stoffwechselgase ist der Fraenkelsche Gasbazillus, der sich in allen bisherigen Versuchen als derjenige gezeigt hatte, der das geringste Reduktionspotential verlangte und der am leichtesten zu züchten war. Rauschbrand und der Novysche Bazillus können überhaupt nicht gedeihen, wenn ihnen die basischen Gase und der Schwefelwasserstoff nicht zur Verfügung stehen; werden ihnen die des CO_2 des Prodigiosus und etwaige freie Gase entzogen, so ist das Wachstum schlecht, es kann sich erst spät entwickeln und bleibt kümmerlich. Bei vorsichtiger Beurteilung dieser Versuche kann man auch hier wenigstens das als sicher hinstellen, dass der Prodigiosusnicht nur allein durch die O_2-Zehrung den Anaerobiern das Wachstum ermöglicht, sondern dass noch andere Umsetzungen seines Gasstoffwechsels in Betracht gezogen werden müssen. Näheres kann man hieraus nicht erschliessen, dazu waren die Versuche nicht erschöpfend genug und die Technik zu unvollkommen.

Als letztes sollte der Traubenzuckernähragar auf etwaige katalytische Substanzen geprüft

werden. Um vielleidht im Minimum vorhandene zu verstärken, wurden dem Nährboden verschiodene Zusätze beigemengt, wie metallischgepulvertes Fe, CuO, Blutkohle, Ton oder abgetötete Prodigiosusbakterien. Daraus sollte sich ergeben, ob möglicherweise einer dieser Faktoren besonders beschleunigend auf die Entfärbung des Methylenblaues einwirkte, zumal wenn in den Erlenmeyerkolben wieder Wasserstoff entwickelt wurde. Nach 12 stündiger Bebrütung zeigte sich folgendes Bild: der Nährboden ohne jegliche Zusätze war bis auf 9 mm unter der Oberfläche entfärbt, er schloss gegen den ungefärbten Teil mit einer stärker gefärbten Platte ab. Dort, wo dem Nährboden abgetötete Prodigiosusbakterien (fünf Stunden bei 56° in Bouillon) beigemischt waren, war die Entfärbung bis zu 10mm eingetreten, davon waren 8mm leicht, und die 2 mm direkt unter der Oberfläche stärker gefärbt, dort lag auch eine Platte. Der Traubenzuckernähragar mit metallischgepulvertem Fe war bis auf 5 mm entfärbt derjenige, der ausserdem noch abgetötete Prodigiosusbakterien enthielt, bis auf 3 mm. Blutkohle und Ton absorbierten wegen ihrer grossen Oberfläche den Farbstoff, demzufolge war der Blutkohlenährboden gänzlich entgärbt, während der Tonnährboden noch eine zarte Blaufärbung erkennen liess. CuO wirkte oxydierend, Sauerstoff verhinderte eine Aenderung des Po-

tentiales nach der negativen Seite hin, der Nährboden behielt deshalb seine Färbung vom Grund der Eprouvette bis zur Oberfläche. Die Verhältnisse bei beiden Verdünnungen des Methylenblaues (1:4000,1:8000) entsprachen einander. Daraus ist zu schliessen, dass, wie zu erwarten war, Fe, das als Atmungskatalysator wirkt, auch hier seine katalytischen Fähigkeiten entfaltet und den Entfärbungsvorgang günstig beeinflusst. Abgetötete Prodigiosusbakterien werken nur geringfügig auf den Nährboden ein, die Entfärbung wird nicht beschleunigt und der gefärbte Teil des Nährbodens nicht verkleinert, wohl aber wird die Färbung zarter. Der Einfluss des Prodigiosus auf den Nährboden ist also in der Veränderung durch Stoffwechselgase zu suchen und ist nicht katalytischer Natur.

Ergebnisse:

1.) Leuchtbakterien sind gute Indikatoren für den O_2-Verbrauch des Prodigiosus; sie leuchten nur, wenn ihnen freier Sauerstoff zur Verfügung steht, mit dem Erlöschen geben sie den genauen Zeitpunkt an, wo die Eprouvette durch den Stoffwechsel des Prodigiosus gänzlich sauerstoffrei geworden ist. Bei ungefähr zwei cm^3 Luft und bei Zimmertemperatur braucht der Prodigiosus 20 Stunden um allen Sauerstoff zu verbrauchen, bei 8 cm^3 und Bruttemperatur ebenfalls 20 Stunden, er benötigt also bei höher

rer Temperatur das vierfache des D_2 für seinen Stoffwechsel.

2.) Anaerobe Bakterien schliessen in Eprouvetten mit Traubenzuckernähragar ihr Wachstum in bestimmter Höhe des Nährbodens mit einer Platte ab, diese Platte wird durch die Stoffwechseltätigkeit des Prodigiosus nach oben verschoben. Der Prodigiosus beeinflusst also das Potential des Anaerobiernährbodens nach der negativen Seite hin, er vergrössert das Reduktionpotential und ermöglicht damit den Anaerobiern ein Wachstum in einer Zone, die sonst wegen ihrer Aussenluftnähe unbesiedelt geblieben wäre.

3.) Ehe der Prodigiosus wirken kann, muss er eine gewisse Wachstumsintensität erreichen; Bruttemperatur beschleunigt hier diesen Vorgang.

4.) Die Anaerobier lassen eine Abstufung erkennen, in Bezug auf die Grösse ihres zum Wachstum notwendigen Reduktionspotentiales, Tetanus verlangt das höchste, der Fraenkelsche Gasbazillus das niedrigste.

5.) Die Anaerobier vertragen sehr hohe Konzentration von KCy, als Atmungskatalysator scheint hier demnach kein Schwermetall in Betracht zu kommen.

6.) KCy wirkt in den stärkeren Konzentrationen gärungshemmend, in den schwächeren ab mol:250 beeinflusst es das Wachstum fast garnicht.

7.) Die Konzentration, die die Gärung noch hemmt, ist für die einzelnen Anaerobier verschieden, sie fällt mit längerer Bebrütung. Der Fraenkelsche Gasbazillus vergärt nach 12 stündiger Bebrütung bereits bei mol: 31,25, der Rauschbrand erst bei mol: 125.

8.) Die Empfindlichkeit gegen KCy differiert bei den einzelnen Anaerobiern, Rauschbrand gedeiht selbst bei mol: 7,81 sehr gut, Tetanus erst bei mol: 62,5.

9.) Die Schädigung der Bakterien durch KCy wird gemildert durch bessere Lebensbedingungen: Bei Beeinflussung durch sauerstoffentziehende Mittel können sie bei stärkeren Konzentrationen wachsen und den Traubenzucker eher vergären. (Novyscher Bazillus).

10.) Der Prodigiosus ermöglicht nicht nur durch O_2-Zehrung den Anaeroben das Wachstum, sondern es mössen auch noch andere Umsetzungen seines Stoffwechsels in Betracht gezogen werden. Sein Einfluss ist aber nicht katalytischer Natur.

11.) Die Plattenbildungen der Methylenblauversuche bestätigen, dass das Potential im Traubenzuckernährагar nicht einheitlich ist. Der untere Teil des Nährbodens hat ein starkes Reduktionspotential - das Methylenblau wird dort entfärbt, die Anaerobier können dort auch ohne O_2-zehrende Mittel gedeihen. Im oberen Teil herrschen wegen der Nähe der

Aussenluft die Oxydationskräfte vor, das Methylenblau behält dort seine Farbe, die Anaerobier können sich dort nicht ansiedeln.

12.) Wachstumsfreie und gefärbte Zone entsprechen sich ungefähr in ihrer Breite.

13.) Durch Prodigiosus, stärker noch durch Pyrogallussäure, wird das Potential des Nährbodens verändert, die wachstumsfreie, bzw. gefärbte Zone wird verkleinert oder verschwindet sogar ganz.

==========

Beenutzte Literatur:

Arbeiten aus der Biologischen Reichs-

Anstalt für Land- und Forstwirtschaft:

- Bd. 20, Heft 1, Hey - Die Diagnose des Abbaugrades von Kartoffelknollen durch elektrometrische Messungen. -

Archiv für Hygenie:

- Bd. 26, Scheurlen - Studien über den Prodigiosus. -

- Bd. 28, Hesse - Ueber den Ursprung der in Kulturgläsern auftretenden CO_2. -

- Bd. 38, S.235, Spitta. -

- Bd. 48, Rubner - Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen. -

- Bd. 57, Rubner - Energieumsatz im Leben einiger Spaltpilze. -

- Bd. 71, Riemer - Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels von Micr.pyoc.Aureus. -

- Bd. 101, Knorr - Die Anaerobenkultur. -

Biochemische Zeitschrift:

- Bd. 88, Moller - Die Einwirkung von Dizyandiamid auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen. -

- Bd. 119-121, Warburg - Physikalische Chemie der Zellatmung. -

- Bd. 204, Silberstein - Eine Methode zur Bestimmung der Atmung von Bakterien. -

Flügge: - Die Mikroorganismen , 3. Aufl. -

Fuhrmann: - Studien zur Biochemie der Leuchtbakterien. -

Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden:

- Abt. 3, Fodor - Bestimmung der Acidität, Michaelis - Die elektrometrische Titration, Mislowitzer - Die Potentiometrie. -

- Abt. 4, Müller - Ausführung von Gasanalysen. -

- Abt. 11, S. 151, Stoklasa, S. 6,7,8 Schröder. -

- Abt. 12, Pringsheim - Nachweis der H_2S-Bildner auf Platten, S. 610, Fuhrmann und Pribam. -

Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen:

-Bd. 1, S. 129, Energieverhältnisse der Bakterien.-

- Bd. 6, S. 695, Brucella abortus Bang. -

- Bd. 10, Zeissler - Anaerobenzüchtung.-

Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie:

- Bd. 40, Schittenhelm und Schröder - Ueber Bakterienwachstum mit Ulchinskyschscher Lösung. -

- Bd. 109, Heft 5. -

Michaelis: Oxydations- Reduktionspotentiale, 2. Teil 1929.

Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie:

- Bd. 191, Lipßschitz. -

Zeitschrift für Hygenie:

- Bd. 15, Hesse - Ueber die gasförmigen Stoffwechselprodukte der Bakterien. -

- Bd. 20, Kedrowsky - Existenzbedingungen für anaerobe Bakterien bei O_2-Zutritt. -

- Bd. 27, Scholz - Wachstum anaerober Bakterien. -

- Bd. 100, Bieling - Untersuchungen über die intramolekulare Atmung von Mikroorganismen. -

Zeitschrift für Infektionskrankheiten der Haustiere:

- Heft 2, Fortner - Neuzeitliche Oberflächenkultur der Anaerobier. -

Zeitschrift für Untersuchungen der Lebensmittel:

- Bd. 54, Heft 1-2, Tiedmanns - Ueber die Bestimmung der elektrischen Reduktion Oxydationspotentiale und ihre Anwendung in der Lebensmittelchemie.-

Zentralblatt für Bakteriologie, I. Abt. Originale:

- Bd. 69, Heft 5-6, Frieber - Die Bedeutung der Gasabsorption in der Bakteriologie. -

- Bd. 82, Heft 3-4, Eisenberg - Ueber Niveaubildung bei aeroben Sporenbildnern.

- Bd. 90, Heft 2, Bieling - Quantitative Bestimmung der Atmung von Mikroorganismen. -

- Bd. 93, Beilage, Braun. -

- Bd. 110, Fortner - Zur Technik der aeroben Züchtung zur Differenzierung der Anaerobier. -

- Bd. 121, Frei und Riedmüller - Reduktionspotentiale und Anaerobenzüchtung. -

- Bd. 122, Heft 1-3, Braun - Zur Assimilation und Dissimilation von Bakterien, Hirsch,- Die allg. energetischen, chemischen Grundlagen der bakteriel len Assimilation und Dissimilation.

- Bd. 123, Heft 5-6, Sonnenschein - Leuchtvibrionen als O_2-Zehrer bei der Anaerobenzüchtung und als O_2-Indikato

-Bd. 124, Heft 3-4, Bachmann - Ueber die Fernwirkung einer Hefekultur auf Mikroorganismen. -

- Bd. 127, Heft 1-3, Braun und Guggenheim - Ueber Atmungstypen bei fakultativ aeroben, pathogenen Bakterien. Heft 4-6, Uhrovits - Versuche über den Bakterienstoffwechsel. -

II. Abteilung:

- Bd. 14, Lehmann und Curchod - Beiträge zur Erkenntnis des Bakterienniveaues von Beyierinck und der Bakteriengesellschaften von Jegunow. -

Zentralblatt für Hygenie:

- Bd. 5-6, Studien über das Redoxpotential. -

- Bd. 7-8, Feiton -Ein neuer Indikator zum Nachweis der Reduktionskraft der Bakterien. -

- Bd. 11-12, Klark und Mansfield. -

- Bd. 16, Aubel - Ueber die Oxydations- Reduktionspotentiale der Hefe- und der Nährböden. -

- Bd. 18, Aubertin und Mitarbeiter - Zur Kultur obligater Anaerobier in Lufthaltigem Medium. -

Die Umschau: Heft 11, Klinkowsky - Der Kartoffelabbau und seine Diagnose. -

,,,,,,,,,,,,,,,,,,,