

## Studien zur Biochemie der Leuchtbakterien

### I. Der Einfluß von Na- und K-Chlorid und Bromid auf die Lichtentwicklung von *Photobacillus radians*

Von

FRANZ FUHRMANN

Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule in Graz

(Mit 21 Textfiguren und 1 Tafel)

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Jänner 1932)

Die zahlreichen, aus verschiedenen Meeren stammenden Leuchtbakterien sind durchwegs „halophil“, was infolge des hohen Salzgehaltes des Meerwassers als des natürlichen Standortes dieser Mikroben auch zu erwarten ist. Allerdings stellt das Meerwasser keineswegs eine Flüssigkeit stets gleichbleibender quantitativer Zusammensetzung vor, wenn auch die anorganischen Bestandteile desselben gleich sind. Wie groß diese Schwankungen in den Mengenverhältnissen der Salze sind, zeigt die folgende Zusammenstellung der Grenzwerte in Grammen nach KÖNIG<sup>1</sup>, auf 1 l Meerwasser berechnet:

NaCl	5·15 — 29·54	CaSO <sub>4</sub>	0·28 — 5·59
MgCl <sub>2</sub>	0·65 — 4·88	MgSO <sub>4</sub>	0·35 — 2·46
NaBr	Spur — 0·56	CaCO <sub>3</sub>	0·00 — 0·37
MgBr <sub>2</sub>	0·00 — 0·03	MgCO <sub>3</sub>	Spur — 0·21
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0·00 — 1·81		

Im Zuge der Versuche über das Licht und die Leuchtfähigkeit von Mikroorganismen erschien es wertvoll und notwendig, die Wirkungsweise jener Salze in den Kulturen messend zu verfolgen, die sich entweder im natürlichen Standort, dem Meerwasser, vorfinden oder letztere in der Wirkungsweise ersetzen können, wenn die vielfach angenommene Vertretbarkeit dieser Verbindungen untereinander tatsächlich zu Recht besteht. Dies bezieht sich in erster Linie auf die Chloride, Bromide und Sulfate der Alkalimetalle *Natrium* und *Kalium*, des Erdalkalimetalls *Kalzium* und des *Magnesiums* und in zweiter Linie auf die Nitrate dieser Elemente. Der vorliegenden ersten Mitteilung seien die Befunde mit den Chloriden und Bromiden des Na und K zugrunde gelegt, wie

<sup>1</sup> J. KÖNIG, Die Chemie der Nahrungs- und Genußmittel 2, S. 1369.

sie unter Verwendung der von mir isolierten Nordseeleuchtbakterie „*Photobacillus radians*“ erhalten worden sind.

*Photobacillus radians* Fuhrmann.

Diese Leuchtbakterienart konnte ich oftmals von Nordseefischen des Grazer Marktes reinzüchten, wobei ich ähnlich wie seinerzeit MOLISCH<sup>2</sup> verfuhr. Vom Schwanzstücke eines Schellfisches schneidet man parallel zur Oberfläche etwa 5 cm im Geviert messende und zirka 2 cm dicke flache Scheiben ab, die mit der Haut nach oben in eine Kochsche Kulturschale gelegt werden, in die 1 cm hoch folgende Lösung gegossen wird:

Meersalz	3·0 g
Pepton	0·5 g
Glyzerin	1·0 g
Wasser	100·0 cm <sup>3</sup>

Dieselbe wurde in einer solchen Menge eingefüllt, daß die Fischteile bis zur Hälfte vorragten. Die so beschickten Schalen wurden im Dunklen bei 15° C gehalten. Schon nach zehn Stunden zeigten die vorragenden Fischteile zahlreiche intensiv blaugrün leuchtende Punkte, während die gesamte Flüssigkeitsoberfläche ebenfalls Licht ausstrahlte. Von der Fischoberfläche wurden nun mit Hilfe des KOCHSCHEN Plattenverfahrens Reinkulturen angelegt. Dazu diente „Fischgelatine“, deren Grundlage Fischfleischwasser bildete, wie es später für die Anlage der Leuchtkulturen beschrieben ist.

Fischfleischwasser	200·0 cm <sup>3</sup>
Leitungswasser	100·0 cm <sup>3</sup>
Pepton sicc. Witte	1·5 g
Meersalz	9·0 g
Glyzerin	3·0 cm <sup>3</sup>
Gelatine	30 g

Mit NaOH wurde die Reaktion stets auf  $p_H = 7 - 7.1$  eingestellt.

Für die Weiterzucht verwendete ich „*Fischagar*“, dessen Zusammensetzung mit jener der Fischgelatine übereinstimmt, nur tritt an Stelle der Gelatine 2% Agar. Die „Fischbouillon“ wird unter Weglassung von Agar bzw. Gelatine hergestellt.

Auf der *Gelatineplatte* bildet *Photobacillus radians* bei Zimmertemperatur runde, milchweiße, bei schräger Beleuchtung wie Tautropfen funkelnde, mäßig dicke Auflagerungen mit allmählich ansteigender Mitte. Die Oberfläche der Kolonien erscheint fein

<sup>2</sup> H. MOLISCH, Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl., Fischer, Jena 1912.

strukturiert, der Umfang scharf begrenzt, wie es Fig. 2 der Tafel zeigt, wo eine 36stündige Oberflächenkolonie bei 30facher Vergrößerung abgebildet ist. Die Gelatine wird *nicht* verflüssigt. Die Kolonien lassen sich, ohne fadenziehend zu sein, leicht mit der Nadel abimpfen.

Die *Gelatinestrichkultur* zeigt nach 24stündigem Wachstum bei 18° C längs des Impfstriches eine zarte, weißliche und stark durchscheinende Auflagerung, die eine wenig wellige, aber scharfe Kontur aufweist. Die Oberfläche erscheint fein strukturiert und feuchtglänzend. Die Auflagerung leuchtet in grünlichblauem Lichte so intensiv, daß das Leuchten schon in zerstreutem Tageslicht bemerkbar wird.

In der *Gelatinestichkultur* tritt längs des ganzen Impfstriches Wachstum ein, während um den Einstich eine zarte, scharf begrenzte, dünne Auflagerung entsteht. Nur die oberen Partien, bis etwa 5 mm in die Tiefe, leuchten.

Eine 24stündige, bei 18° C angewachsene *Agarstrichkultur*, weist längs des Impfstriches eine zirka 1.5 mm breite, mäßig erhabene, aber stark feuchtglänzende Auflagerung auf, die schwach milchweiß und durchscheinend ist. Das Kondenswasser des Agarröhrchens zeigt eine allgemeine Trübung und keine Kahlhaut. Die Beläge lassen sich sehr leicht abimpfen und mangels jedes Fadenziehens mühelos in Flüssigkeiten gleichmäßig verteilen.

Bei der Zucht dieser Bakterienart in „*Fischbouillon*“ entsteht bei 18° C nach 24 Stunden eine allgemeine Trübung ohne Kahlhautbildung. Später setzt sich ein weißlicher Bodensatz in geringer Menge ab.

Im *hängenden Tropfen* untersucht, zeigen die Zellen von *Photobacillus radians* eine *Eigenbewegung*, die unter lebhafter Drehung und förmlichem Überpurzeln vor sich geht. Dabei ist die Fortbewegung langsam und oft stockend. Die Formen der Zellen sind in ein und derselben Kultur verschieden und werden auch von der Art des verwendeten Nährsubstrates wesentlich beeinflußt. Um die Unterschiede der osmotischen Verhältnisse zwischen der Kultur und dem Aufschwemmungsmittel bei der Beobachtung so gering als möglich zu gestalten, diente als solches eine sterile 2.5%ige NaCl-Lösung oder *Fischbouillon*.

Die auf schräg erstarrtem *Fischagar* bei 18° C in 24 Stunden gewachsenen Bakterien waren, im *hängenden Tropfen* beobachtet, wie oben angegeben, beweglich und zeigten verschiedene Formen

von kurzen, plumpen, an den Enden abgerundeten Stäbchen bis zu verbreiterten und spindelig ausgewachsenen Gestalten. Fig. 1 der Tafel stellt ein Photogramm vom Rande eines solchen hängenden Tropfens vor, der mit verdünnter Jodlösung behandelt war. Man sieht hier alle Übergänge von den Kurz- zu den Langformen. Dieselbe Vielförmigkeit zeigen auch die mit Methylenblau oder Karbolfuchsin gefärbten *Ausstrichpräparate*, die in den Fig. 3 und 4 der Tafel wiedergegeben sind. Jedenfalls sind diese Formen als normal zu betrachten und gehören in den *Entwicklungskreis* des *Photobacillus radians*. Ich möchte an dieser Stelle besonders darauf hinweisen, daß ich Ähnliches bereits im Jahre 1906 an anderen Bakterienarten beobachtete und darüber auf der 78. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Stuttgart und in Publikationen<sup>3</sup> berichtete, ohne daß später bei der Neubearbeitung der Entwicklungskreise von Bakterien von anderer Seite davon Notiz genommen worden wäre. Sowohl in den gefärbten als auch ungefärbten Präparaten erscheinen die Zellen selten homogen, sondern enthalten verschiedene lichtbrechende und färbbare Granula, die sich auch Jodlösungen gegenüber abweichend verhalten.

Dies gilt in erster Linie für zarte Färbungen mit wässriger Methylenblaulösung, wodurch diese Inhaltskörper besonders deutlich zur Ansicht gelangen.

Auch die Kolonien auf der *Gelatineplatte* sind durchaus nicht von formgleichen Bakterienzellen aufgebaut, sondern enthalten ebenfalls verschiedengestaltige Mikroben, wenn auch hier die Vielförmigkeit weniger ausgeprägt ist. Fig. 5 der Tafel gibt einen guten Einblick in die Formenverhältnisse einer 72stündigen Kolonie auf neutraler Gelatine. Der mit Methylenblau gefärbte Abklatsch zeigt im allgemeinen schlankere, an den Enden leicht verjüngte Stäbchen, die vielfach an Schraubenformen anklingen, was besonders für die im Teilungsstadium befindlichen verlängerten Zellen zutrifft. Vergleicht man damit die Formen der Fig. 4 der Tafel, so fällt dieser allgemeine Unterschied besonders auf. Es wird dadurch die vielfach bestätigte Annahme, daß auf oder in besonders feuchten oder flüssigkeitsreichen Nährsubstraten die kurzen, in wasserärmeren und zäheren Medien, wie Gelatine, die längeren und schlankeren Formen entstehen, neuerdings bestätigt.

---

<sup>3</sup> F. FUHRMANN, Entwicklungszyklen von Bakterien. Die Umschau, 10. Jahrgang, 41, 1906; derselbe: Entwicklungszyklen bei Bakterien, Beihefte zum Botan. Zentralblatt 23, 1907, Abt. 1.

Besonders verdickte und spindelig verlängerte Stäbchen zeigen noch die Fig. 6, 7 und 8 der Tafel, wo neben Kurzstäbchen in verschiedenen Übergängen zu Langstäbchen auch auffallend vergrößerte Gestalten zu sehen sind. In Fig. 9 der Tafel sind Formen nach Methylenblaufärbung sehr stark vergrößert gezeichnet wiedergegeben, die Teilungsstadien von *Photobacillus radians* und besondere Umformungen im Zuge der Entwicklung betreffen. Neben fast kugeligen Entwicklungsstadien finden sich stäbchenartige Oidien und stark verlängerte und verdickte Formen mit gut definierten Innenstrukturen. Darauf soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

*Photobacillus radians* ist sonach ein *lichterzeugendes Stäbchenbakterium* mit wenig lebhafter Eigenbewegung, das Gelatine *nicht* verflüssigt. Diese Bakterienart vermag sich auch fakultativ anaerob zu entwickeln, leuchtet aber nur bei Zutritt des Luftsaurestoffes.

*Photobacillus radians* hat sein Wachstums- und Leuchtopimum zwischen 15 und 18° C, während dafür das Maximum bei zirka 28° und das Minimum bei etwa 6° C liegt.

Diese Bakterienart zeigt die beste Entwicklung und das stärkste Leuchten bei einer Reaktion des Nährsubstrates entsprechend  $p_{\text{H}} = 7.1-7.4$ , wobei aber auch noch andere Faktoren, wie insbesondere die Temperatur, die Zusammensetzung des Nährbodens und der Salzgehalt, mitspielen.

### Versuchstechnik.

Es lag nahe, für die einzelnen Versuchsreihen eine Nährlösung konstanter, einheitlicher und einfacher Zusammensetzung zu verwenden. In dieser Hinsicht bieten die Leuchtbakterien der Nordsee aber Schwierigkeiten, da es bislang nicht gelungen ist, dieselben auf Lösungen bekannter einfacher Stickstoffverbindungen zur Entwicklung zu bringen. BEIJERINCK<sup>4</sup> reiht diese Bakterien in die Gruppe der „Peptonmikroben“ und „Peptonkohlenstoffmikroben“ ein, was besagt, daß sie zur Erhaltung ihres Lebens als Stickstoffquelle peptonisierte Eiweißstoffe und peptonartige Nährstoffe unbedingt benötigen, im letzteren Fall dazu noch besondere Kohlenstoffquellen. Jedenfalls darf nach den Erfahrungen BEIJERINCK'S Pepton im Nährmedium niemals fehlen. Damit ist aber

<sup>4</sup> M. W. BEIJERINCK, Die Leuchtbakterien der Nordsee im August und September. Folia Microbiologica, Delft, 4. Jahrgang, 1916.

schon die Unmöglichkeit gegeben, eine tatsächlich einheitliche und chemisch wohldefinierte Nährlösung für diese Photobakterien, zu denen auch *Photobacillus radians* gehört, herzustellen. Es mußten Fischfleischabkochungen herangezogen werden, die in besonderem Maße jene noch unbekanntenen *N*-Verbindungen enthalten, die für die Ernährung der Leuchtmikroben besonders nützlich sind. Es sei bereits hier erwähnt, daß aussichtsreiche Versuche im Gange sind, diese im Fischfleisch besonders reichlichen Verbindungen in wirksamer Form isoliert zu erhalten, über die in einer späteren Mitteilung besonders berichtet werden soll.

Da Leuchtbakterien sehr leicht von Seefischstücken zu isolieren sind, wurde das Seefischfleisch als Ausgangsmaterial für die Nährlösungen verwendet.

Um sowohl das *Wachstum* als auch die *Leuchtstärke* in den einzelnen Versuchsreihen messend verfolgen zu können, wurden stets „*Flüssigkeitskulturen*“ verwendet, für die als Ausgangsmaterial eine „*Stammbouillon*“ folgender Herstellung und Zusammensetzung diente:

Zur Bereitung des *Fleischwassers* wurde 1 kg von Haut und Eingeweiden befreites Seefischfleisch mit 1 l dest. Wasser zwei Stunden lang im Dampftopf gekocht, erkalten gelassen und dann durch ein Sehtuch filtriert. Die *Stammbouillon* bestand in einer Lösung von 2% Pepton in dem oben geschilderten Fleischwasser, die mit NaOH auf den  $p_H$ -Wert 7—7.1 gebracht, dann mit Eiklar geklärt, filtriert und in Erlenmeyer-Kolben in Portionen von je 100  $cm^3$  steril aufbewahrt wurde, um für alle Versuche die gleiche Stammlösung zur Verfügung zu haben. Für die einzelnen Kulturen wurde diese Stammbouillon mit den entsprechenden Zusätzen derart versehen, daß eine in allen Versuchsreihen gleiche Nährmittelkonzentration bei gleichzeitiger Variation der zugesetzten Salzmenge erreicht wird.

Die verwendeten *Salze* wurden auf ihre chemische *Reinheit* nach den üblichen Methoden geprüft und davon zweifach normale Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt.

Die *Bestimmung der Leuchtstärke* der einzelnen Kulturen nach gewissen Wachstumszeiten bei der Temperatur von 16° C geschah mit Hilfe der *Schwärzung* einer *hochempfindlichen* photographischen Platte, wobei in bezug auf die Belichtung solche Zeiten gewählt wurden, daß *die Schwärzung in den geraden Ast der Schwärzungskurve* fiel. Ich benützte zur Belichtung einen

Apparat, der die gleichzeitige Aufnahme von sechs Kulturröhrchen gestattet. Derselbe ist in Fig. 1 mit ausgezogenem Schieber und abgenommener Verschlusswand wiedergegeben. Er besteht im wesentlichen aus einem Holzklotz mit sechs nebeneinanderliegenden Bohrungen zur Aufnahme der Kulturröhrchen und ebenso

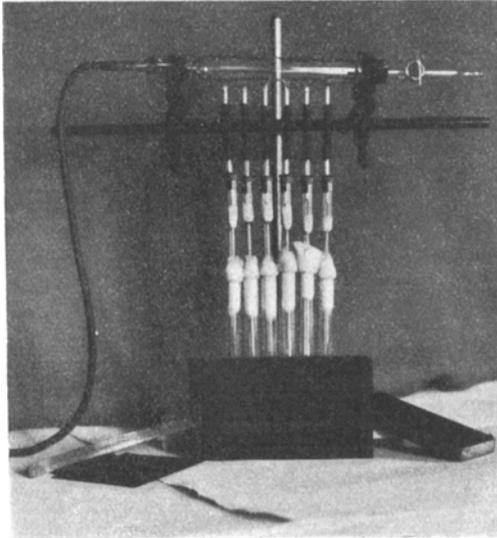


Fig. 1.

vielen darauf senkrechten Löchern, die in der Abbildung schwarz zu sehen sind. Auf letztere wird die photographische Platte mit der Schicht den Röhrchen zugekehrt aufgelegt und durch ein samtbekleidetes Brettchen mit darübergespannter Feder licht-

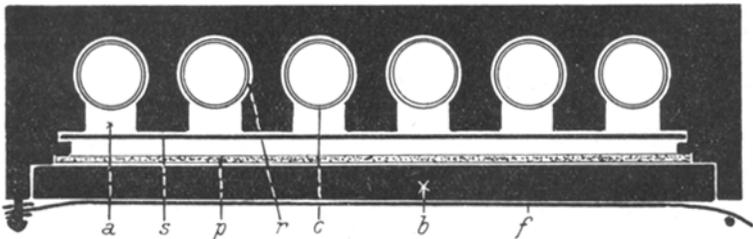


Fig. 2.

dicht verschlossen gehalten. Vor der Platte befindet sich ein Schieber, um vorzeitige Belichtungen hintanzuhalten. Fig. 2 zeigt einen Schnitt durch diesen *Belichtungsblock*, horizontal durch die Mitte der waagrechten Öffnungen geführt. *a* dieser Abbildung stellt den Belichtungskanal (horizontale Bohrung) vor, durch den die in *r* eingestellte Leuchtkultur *c* ihr Licht auf die photogra-

phische Schichte  $p$  strahlt, solange der Schieber  $s$  herausgezogen ist. Den lichtdichten Verschuß bildet das mit Samt belegte Brettchen  $b$ , angedrückt mit der Feder  $f$ . Um eine möglichst gleichmäßige Ausstrahlung durch die Belichtungsöffnung  $a$  zu erhalten, sind die Wände der Löcher mit Gips weiß gestrichen. Dieser gut streuende und matte Anstrich verhindert Reflexbildungen durch die Wand der Kulturröhrchen, welche zu unregelmäßigen Schwärzungen der Platte führen würden, die wegen der folgenden Schwärzungsmessung vermieden werden müssen. Fig. 9 der Tafel zeigt zwei Kopien solcher von verschieden stark leuchtenden Kulturen belichteten Plattenstreifen. Allerdings sind in der positiven Wiedergabe die feinen Schwärzungsunterschiede zum Teil verlorengegangen.

Für solche Aufnahmen eignen sich nur höchstempfindliche und dabei vollkommen klar arbeitende photographische Platten. Ich verwendete für die Versuche dieser Arbeit ausschließlich die Agfa-„Isochromplatte“ mit 23° Scheiner Empfindlichkeit. Die Belichtungszeiten bewegten sich zwischen zwei und vier Minuten. Die Aufnahmen wurden serienweise gleichzeitig in einer Rodinallösung 6 : 100 H<sub>2</sub>O von 18° C Temperatur in der Dauer von genau vier Minuten entwickelt. Die Spülung nach der Entwicklung wurde in Wasser mit einem Gehalt von 0.5% Essigsäure während einer Minute vorgenommen. Für jede Serie von Aufnahmen kam ein frisch vorbereitetes 10%iges Fixierbad mit einem 1%igen Kaliummetabisulfitzusatz zur Verwendung. Sowohl das Einlegen der Platten als auch alle nachfolgenden Operationen der Entwicklung und Fixage geschahen im Finstern unter Ausschaltung jedweder Beleuchtung, um jegliche Nebenlichtwirkung auszuschließen.

Die erzielten Schwärzungen wurden mit dem „Densographen“ nach GOLDBERG<sup>5</sup> ausgemessen und die erhaltenen Werte auf eine einheitliche Belichtungsdauer von zwei Minuten reduziert, sofern nicht von Haus aus diese Belichtungszeit verwendet worden ist. In den Tabellen und graphischen Darstellungen (letztere einfach als Kurven bezeichnet) erscheinen die Messungsergebnisse als „Leuchtgrade“ verzeichnet. Letztere entsprechen dem zehnfachen Wert der Ablesung bzw. der reduzierten Zahlen. Dadurch konnten die Kurven übersichtlicher und klarer gestaltet werden, ohne die relativen Verhältnisse, auf die es in erster Linie ankommt, zu stören.

<sup>5</sup> Erzeugt von den Zeiß-Ikon-Werken in Dresden.

Wie schon eingangs erwähnt, fanden für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich „Flüssigkeitskulturen“ Verwendung, um bei der Belichtung der Platten die leuchtenden Zellen gleichmäßig verteilen und genügend mit Luftsauerstoff versehen zu können. Für diese Zwecke stellte ich „Durchlüftungs-Kulturröhren“ zusammen, wie sie im axialen Längsschnitt die Fig. 3 wiedergibt. In eine Kulturröhre aus Jenaer Glas ragt das am Ende auf 1 mm verjüngte, mit einem erweiterten Ansatz versehene Durchlüftungsrohr aus Glas, mit Watte bakteriendicht eingeführt. Der Ansatz selbst enthält ebenfalls einen Wattebausch als Luftfilter. Diese Anordnung wird vor der Füllung mit Nährflüssigkeiten trocken im Heißluftschrank sterilisiert. Es wurde besonders darauf geachtet, gleich weite Kulturröhren zu verwenden und die Rohrspitze ebenfalls immer gleich groß zu haben. Vor der Füllung wird das Einsatzrohr, welches in der Watteführung verschiebbar ist, etwa 5 cm herausgezogen, so daß eine Auslaufspitze  $\frac{1}{2}$  cm über dem Flüssigkeitsspiegel nach der Füllung steht. In diesem Zustande wird in der üblichen Weise fraktioniert sterilisiert und dann mit den Leuchtbakterien verimpft.

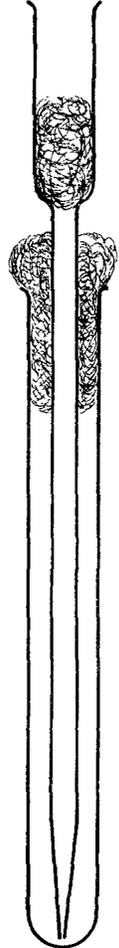


Fig. 3.

Als *Impfmateriale* diente stets eine Aufschwemmung einer 24stündigen Agarkultur unseres Photobazillus in einer 2%igen Lösung jenes Salzes, das dem Nährboden für die betreffende Versuchsreihe besonders zugesetzt worden war. Für alle Reihen wurde zur Verimpfung dieselbe Platinöse von 3 mm innerem Durchmesser benützt, um dadurch wenigstens bei einer Versuchsreihe in jedes Röhrchen die annähernd gleiche Bakterienmenge zu bringen. Da die Abnahme des Kulturrasens vom Nähragar ebenfalls immer mit der gleichen, jedoch nur 1 mm messenden Platinöse geschah und die Aufschwemmungsflüssigkeit jedesmal 5 cm<sup>3</sup> betrug, wurden die quantitativen Impffehler auf das kleinstmögliche Maß heruntergedrückt.

Neben der Feststellung der Leuchtstärke wurde auch versucht, die Vermehrung der eingepfunden Bakterien zahlenmäßig zu verfolgen, was aber große Schwierigkeiten bereitete. Wenn es sich nur um die Feststellung der Keimmenge nach beendetem

Versuch gehandelt hätte, wären die Keimzählmethoden gut verwendbar gewesen. So aber sollte das Wachstum in den einzelnen Kulturen einer Reihe gleichzeitig mit der Lichtstärkemessung bestimmt werden, ohne die Röhrchen zu öffnen und dabei einer Verunreinigung auszusetzen. Deshalb konnten nur *Bestimmungen der Trübung* der einzelnen Kulturen vorgenommen werden, aus deren Zunahme auf die Vermehrung vorsichtige Schlüsse zu ziehen waren. Die Trübungsmessungen wurden mit dem *Zeißschen Trübungsmesser* in Verbindung mit dem *Pulfrich-Photometer*<sup>6</sup> unmittelbar in den Kulturröhrchen ausgeführt. Dabei ist besonders auf die Einhaltung der stets gleichen Temperatur im Wasserbade des Apparates zu achten, die ich ein für allemal mit 18° C festlegte. Ich verwendete das rote Filter und wechselte nur entsprechend der Stärke der zu messenden Trübung die Vergleichsscheibe, um bei der Ablesung der Meßtrommel möglichst in der Mitte der Skala zu bleiben. Für die Auswertung der Ablesungen wurden die erhaltenen Zahlen auf die Vergleichsscheibe 3 umgerechnet, um vergleichbare Werte zu erhalten. Bei allen Proben wurde zuerst die „Anfangstrübung“ der unverimpften sterilen Nährflüssigkeit bestimmt und von den gemessenen Wachstumstrübungen abgezogen. Obwohl die Röhrchen mit der Nährflüssigkeit dem Auge ursprünglich blank und trübungslos erscheinen, erhält man stets Trübungswerte von verschiedener und für die Berechnung jedenfalls zu berücksichtigender Größe. Die „*Trübungszahl*“ der Tabellen und Kurven ist auf diese Weise einheitlich errechnet. Es sei nochmals betont, daß auch hier nur die *relativen* Trübungswerte bestimmt wurden.

Bei relativ niedrigem Salzgehalt der Kulturen können die gemessenen Trübungen in den ersten 36—48 Stunden des Wachstums allerdings mit der Größe der Vermehrung in unmittelbare Beziehung gebracht werden, weil sich unter diesen Verhältnissen die Zellen überwiegend frei in der Flüssigkeit befinden und keine Zoogloen und Verklumpungen bilden. Auch ist die Form und Größe der einzelnen Bakterien bzw. die Menge der verschiedenen Wachstumsstadien der Mikroben ziemlich gleichbleibend. Später und besonders auch bei großer Salzkonzentration erscheinen größere Formen und Zusammenlagerungen und Verklebungen von Zellen, die den Wert der Trübungsmessung für die Beurteilung des

---

<sup>6</sup> Über Konstruktion der Apparatur und deren sonstige Anwendung vgl. die Druckschriften Mess. 430/II und Mess. 4311 von Zeiß in Jena.

Wachstums schädigen. Physikalisch gesprochen, ist die Ungleichheit der lichtstreuenden, also trübenden Teilchen zu groß geworden, um die Lichtstreuung dieser Teilchen mit jenem der einheitlichen kleinen Teilchen des Versuchsbeginnes vergleichen zu können. Dazu kommen noch die Fehler durch die Mitbestimmung der bereits toten in der Flüssigkeit ebenfalls verteilten Mikrobenkörper. Wenn man diese Fehlerquellen genügend berücksichtigt, kann man mit der entsprechenden Vorsicht aus dieser Art der Trübungsmessung Schlüsse auf das Wachstum bzw. auf die Zellvermehrung ziehen.

Zwecks *Messung der Leuchtstärke* einer Serie von sechs Kulturröhrchen wurden dieselben in den mit der photographischen Platte beschickten Belichtungsapparat im Dunkelzimmer eingesetzt und an den an einem Luftgasometer hängenden Luftverteiler angeschlossen, wie es aus Fig. 1 ersichtlich ist. In die Erweiterung der „Durchlüftungsröhren“ kommen durchbohrte Kautschukstopfen mit durchgehendem Glasröhrchen, die durch einen Kautschukschlauch mit den Auslässen des gläsernen Luftvertailers verbunden werden. Die Durchlüftungsröhrchen werden bis 5 mm Abstand vom Boden der Kulturröhrchen in die Flüssigkeit eingeschoben. Der rechte Hahn des Luftvertailers ist geschlossen, während durch den linken Hahn die vom Gasometer einströmende Luft so reguliert wird, daß in einem Tempo von zirka einer Sekunde die Lufblasen durch die Kultur perlen. Zu rasches Durchströmen von Luft führt zu Schaumbildungen, die dann bis zu den Wattedichtungen aufsteigen und diese benetzen, was streng zu vermeiden ist. Es hat sich als vollkommen ausreichend erwiesen, in Intervallen von 15 Sekunden, je fünf Sekunden Luft durchzuführen. Dadurch werden die Bakterien in der Nährflüssigkeit einerseits gleichmäßig verteilt und andererseits erhält die Kultur genügend Sauerstoff, um gleichmäßig maximal zu leuchten. Wenn man durch zwei Minuten auf diese Weise die Durchlüftung vorgenommen hat, zieht man den Verschußschieber von der photographischen Platte weg und belichtet 2—4 Minuten, je nach der Helligkeit des Leuchtens. Auch während der Belichtung schickt man im gleichen Turnus Luft durch die Kulturen.

Schließlich sei noch erwähnt, daß die  $p_{\text{H}}$ -Bestimmungen auf kolorimetrischem Wege mit dem Komperator von WALPOLE und den  $p_{\text{H}}$ -Reihen ohne Puffer nach MICHAELIS unter Anwendung von *m*- und *p*-Nitrophenol gemacht wurden.

## NaCl- und NaBr-Versuchsreihen.

## NaCl - V e r s u c h e.

Schon entsprechend der chemischen Zusammensetzung der Flüssigkeiten des natürlichen Standortes der Leuchtbakterien kommt den Verbindungen des *Natriums* im Lebensablauf dieser Organismen große Bedeutung zu. Nach RICHTER<sup>7</sup> soll es für diese Organismen lebenswichtig sein. Es wurde nun versucht, die günstigste Konzentration des NaCl und NaBr allein und in Verbindung mit Glyzerin als besondere C-Quelle für das Leuchten festzustellen. Die folgende Tabelle 1 ergibt die Zusammensetzung der einzelnen Kulturen und deren Leuchtgrade nach bestimmten Wachstumszeiten.

Tabelle 1.  
NaCl-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>				NaCl-Gehalt		p <sub>H</sub>		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	2-n.-NaCl-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 80 Stunden	37	48	80
1	50	5	45	100	1/10	0·59	7·1	7·5	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	1·17	7·1	7·5	2·2	7·5	0·6
3	50	15	35	100	3/10	1·75	7·1	7·5	8·5	18·0	1·9
4	50	20	30	100	4/10	2·34	7·1	7·5	8·8	15·0	3·9
5	50	25	25	100	5/10	2·92	7·1	7·5	3·2	9·0	5·4
6	50	30	20	100	6/10	3·50	7·1	7·4	2·0	4·5	6·0

Wenn man nach den verschiedenen Zeiten die *Leuchtoptima* betrachtet, findet man dieselben nach 37 Stunden beim Röhrchen 4 mit einem NaCl-Gehalt von 4/10 normal, nach 48 Stunden bei der Kultur 3 mit 3/10 n. NaCl, und nach 80 Stunden bei der Probe 6 mit der NaCl-Konzentration 6/10 normal. Fig. 4 zeigt die mit den Leuchtgraden konstruierten *Kurven*, bei denen die Abszisse die Zeitmarken und die Ordinate die Leuchtgrade trägt. Die den Kurven beigeetzten Zahlen geben das zugeordnete Kultur-röhrchen der Tabelle 1 an, dessen Numerierung mit dem Zehntelnormalgehalt an Salz übereinstimmt.

Die Kurven aller fünf Röhrchen weisen darauf hin, daß in den ersten 48 Stunden ein starker Anstieg der Leuchtfunktion auftritt, während dann der Abfall in den Röhrchen 3, 4 und 5 lang-

<sup>7</sup> O. RICHTER, Anz. Ak. Wiss. Wien (IIb) 1928, S. 163.

samer, aber umgekehrt dem Anstieg erfolgt. Nur die Probe mit größtem NaCl-Gehalt (6) weist auch nach 48 Stunden einen allmählichen, aber stetigen Anstieg auf. *Die optimale Salzkonzentration für NaCl ohne Beigabe einer C-Quelle befindet sich demnach zwischen 3/10 und 4/10 normal.*

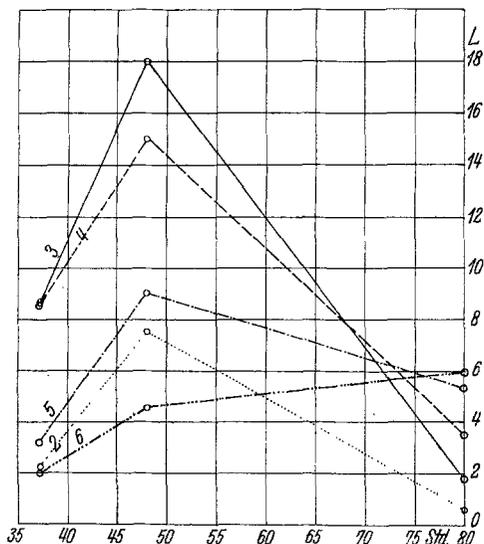


Fig. 4.

Probe 2 nähert sich im Verlauf des Leuchtens der Probe 5, ohne aber die Stärke der Lichtentwicklung der letzteren zu erreichen. Hier ist die Salzkonzentration schon zu niedrig und dadurch auch die geringe Lichtintensität erklärlich.

Die Tabelle 1 zeigt noch, daß die  $p_H$ -Werte während des Wachstums im alkalischen Ast zunehmen und nach 80 Stunden in den fünf ersten Proben 7.5 erreichen, während Röhrechen 6 nach dieser Zeit  $p_H = 7.4$  besitzt.

Die Zugabe einer besonderen C-Quelle in Form von Glycerin in der Menge von 0.69% führt nach den gleichen Wachstumszeiten zu einer Annäherung der Leuchtmaxima in den ersten 48 Stunden bei den Proben 3 und 4, wie es aus der Tabelle 2 ersichtlich ist.

Die absoluten Leuchtstärken sind aber durch den Glycerinzusatz in den Röhren 3 und 4 nicht unbeträchtlich erniedrigt, während dieselben bei höherem NaCl-Gehalt, besonders nach 80 Stunden, erhöht erscheinen. In dem Röhrechen 2 ist die Licht-

bildung wesentlich gedrückt, während gerade dort nach 80 Stunden der höchste  $p_H$ -Wert mit 7.4 erreicht worden ist.

Tabelle 2.

NaCl-Versuch mit 0.69% Glycerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>					NaCl-Gehalt		$p_H$		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	1/2-Mol-Glycerinlsg.	2-n.-NaCl-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 80 Stunden	37	48	80
1	50	15	5	30	100	1/10	0.59	7.1	7.4	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	1.17	7.1	7.4	0.6	0.8	0
3	50	15	15	20	100	3/10	1.75	7.1	7.3	7.2	14.3	0.6
4	50	15	20	15	100	4/10	2.34	7.1	7.2	6.8	14.2	3.0
5	50	15	25	10	100	5/10	2.92	7.1	7.1	2.0	5.0	8.2
6	50	15	30	5	100	6/10	3.50	7.1	7.0	1.8	2.5	6.0

Die Kurven der Fig. 5 zeigen die Leuchtintensitäten und Unterschiede in denselben gegenüber jenen bei der Zucht ohne Glycerinzugabe (Fig. 4). Das Glycerin hat förmlich insofern regelnd in den Leuchtverlauf eingegriffen, als wohl weniger hohe Werte

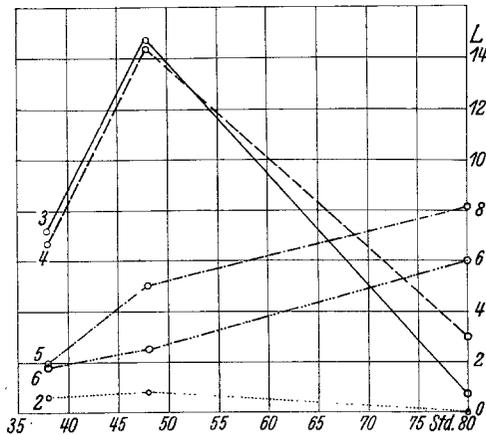


Fig. 5.

erreicht werden, aber dafür der optimale Bereich der NaCl-Konzentrationen weiter gestaltet wird, was besonders die Kurven 3 und 4, entsprechend 3/10 und 4/10 n. NaCl dartun. Es treten dadurch die optimalen Bedingungen noch deutlicher und schärfer hervor, als es sonst ohne Glycerinzusatz der Fall ist.

Wenn man nun die *Vermehrung* der Mikroben mit der Lichtentwicklung derselben in Beziehung zu bringen versucht, so kann man, wie schon früher bemerkt, dazu die nach verschiedenen Wachstumszeiten auftretenden *Trübungen* heranziehen. Man muß sich nur über die Fehlerquellen solcher Trübungsmessungen im klaren sein, auf die schon an anderer Stelle hingewiesen wurde. Die erhaltenen *Trübungszahlen* der oben besprochenen Versuchsreihen sind in der folgenden Zusammenstellung wiedergegeben.

Trübungszahlen der NaCl-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden		
		37	48	80
NaCl + Glycerin	3	90	100	47
	4	91	102	49
	5	83	86	86
	6	65	81	89
NaCl	2	35	52	62
	3	73	95	67
	4	67	90	72
	5	72	67	60
	6	55	64	50

Man ersieht daraus, daß bei den NaCl-Reihen mit und ohne Glycerinzusatz im allgemeinen die Höchstwerte der Trübungen wieder bei den optimalen Salzkonzentrationen zu finden sind, was besonders für die ersten Vermehrungszeiten gilt. Hier darf man auch füglich aus dem Trübungsgrad auf die Größe der Vermehrung schließen und annehmen, daß *die für das Leuchten beste Salzkonzentration auch das Wachstum am meisten fördert*.

Verfertigt man mit den Trübungszahlen der einzelnen Proben als Ordinatenmarken Kurven, wie sie in Fig. 6 für Kulturen *mit* Glycerin und Fig. 7 für solche *ohne* diesen Zusatz wiedergegeben sind, während die Abszissen die Zeitmarken tragen, so kann man das Wachstum auch mit den Leuchteffekten in unmittelbaren Zusammenhang bringen. Zu dem Ende ist in jede dieser beiden Figuren noch eine Kurvenschar eingezeichnet, deren Abszisse die Leuchtgrade der Tabellen 1 und 2 trägt. Es ist dies durch die Buchstaben *T* (Trübungszahl) links und *L* (Leuchtgrade) rechts

angedeutet, während die Zeitmarken für beide Kurvenscharen übereinstimmen. Zur leichteren Unterscheidung sind die Trübungskurven dick gezeichnet, während die Leuchtkurven dünn gezeichnet wurden.

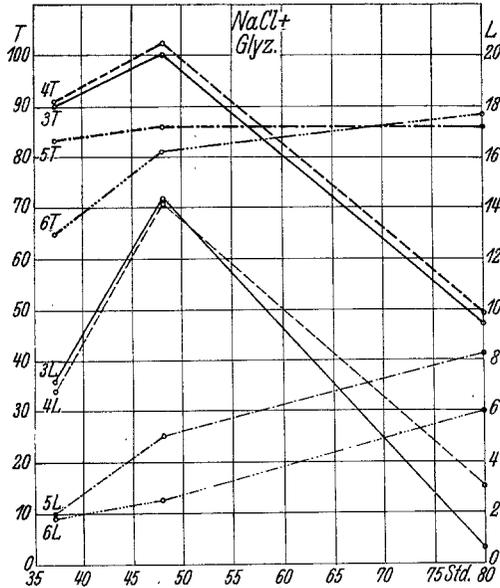


Fig. 6.

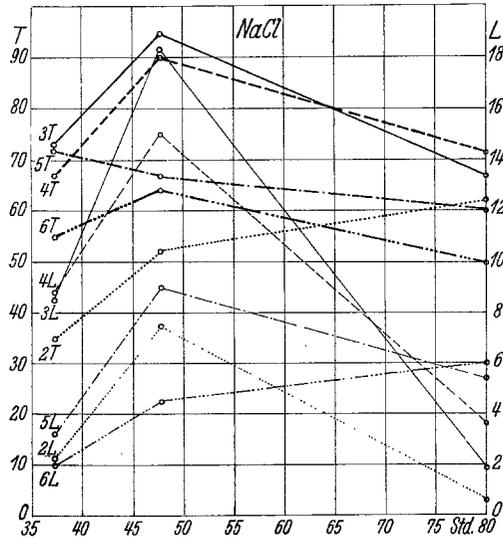


Fig. 7.

Betrachten wir den Verlauf der Kurven 3 L und 3 T in der Fig. 6, so finden wir eine gute Übereinstimmung im Wachstum und Leuchten, was auch für die Kurven 4 L und 4 T ohneweiters

gilt. Bei 5 und 6, also den Röhrechen mit hohen Salzkonzentrationen, schreitet nach 48 Stunden das Leuchten anscheinend rascher fort als die Vermehrung. Man darf aber nicht vergessen, daß die erhöhten NaCl-Gehalte zu einer deutlichen Verklebung von Zellen führen, wodurch der früher erwähnte Fehler der Trübungszahlen in den Vordergrund tritt.

Vergleicht man damit die Verhältnisse beim Wachstum und Leuchten *ohne* Glyzerinzusatz, wie sie die Kurven der Fig. 7 darstellen, so findet man hier noch weitgehendere Unstimmigkeiten, wenn auch die Optima bei 3 und 4 in bezug auf Trübung und Vermehrung zusammenfallen. Bei 5 und 6 tritt die Salzwirkung ganz besonders insofern in den Vordergrund, als im ersteren Falle (5 *T*) die höchste Trübung nach 37 Stunden zu erhalten ist und von da ab ständig fällt, während sich optimales Leuchten nach 48 Stunden trotz verringerter Trübung einstellt, um weiterhin allmählich zu fallen. Bei 6 scheint allerdings eine Übereinstimmung zwischen Wachstum und Lichtbildung bis 48 Stunden zu bestehen; dann aber verringert sich die Trübung, obwohl das Leuchten noch ansteigt. Für die Zeit nach 48 Stunden zeigt die Probe 2 gerade das Umgekehrte, indem bei abnehmendem Leuchten die Trübung zunimmt (2 *L* und 2 *T* der Fig. 7). Die hier herrschende niedrige Salzkonzentration vermag keine besondere Lichterzeugung zu unterhalten, gestattet aber eine gleichmäßige Vermehrung der Mikroben ohne stärkere Zusammenballung derselben.

#### NaBr - V e r s u c h e.

Unter den gleichen Nähr- und Züchtungsbedingungen wurden Versuchsreihen angelegt, in denen das Chlornatrium durch NaBr vertreten war, indem an Stelle des Kochsalzes äquimolare Mengen des Bromides zugesetzt wurden. Wieder enthielten die sechs Proben steigende Mengen NaBr, entsprechend 1/10 bis 6/10 n. NaBr. Somit herrschten in diesen Bromidreihen die gleichen osmotischen Verhältnisse wie bei den früher besprochenen Chloridversuchen.

Aus der Tabelle 3 ist die Zusammensetzung der einzelnen Proben ohne Glyzerin und die durch sie erzeugten Leuchtstärken zu entnehmen. Wie man auch ersieht, ist der prozentuelle Salzgehalt in den einzelnen Röhrechen fast doppelt so groß wie in der Chloridreihe, weil eben das NaBr ein viel größeres Molekulargewicht besitzt als NaCl.

Tabelle 3.  
NaBr-Versuch ohne Glycerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>				NaBr-Gehalt		p <sub>H</sub>		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	2-n.-NaBr-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 63 Stunden	22	46	63
1	50	5	45	100	1/10	1.03	7.0	7.0	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	2.06	7.0	7.5	0	0	0
3	50	15	35	100	3/10	3.09	7.0	7.5	6.0	8.0	9.0
4	50	20	30	100	4/10	4.12	7.0	7.5	11.0	14.6	13.2
5	50	25	25	100	5/10	5.15	7.0	7.5	8.2	16.0	15.8
6	50	30	20	100	6/10	6.18	7.0	7.5	6.6	14.0	14.5

Die Leuchtoptima liegen bei einer NaBr-Konzentration von 4/10 bis 5/10 n., sind also gegenüber jenen bei Kochsalzzusatz *gegen die höheren Konzentrationen zu verschoben*. Auch hier besteht das Bestreben, beim Wachstum die Alkaleszenz des Nährbodens zu erhöhen, denn die ursprünglichen p<sub>H</sub>-Werte (7) der Proben sind auf p<sub>H</sub> = 7.5 gestiegen, sofern Wachstum eingetreten ist. Nr. 1 dieser Reihe zeigte weder eine Entwicklung noch eine Lichtproduktion, während 2 zwar Wachstum, jedoch kein Leuchten aufwies. Um beides zu ermöglichen, ist eine Mindestkonzentration von über 2/10 n. NaBr notwendig.

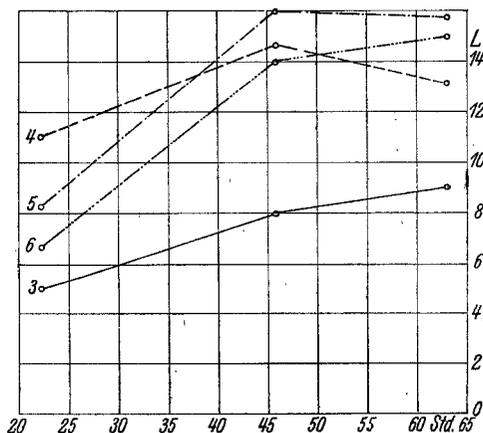


Fig. 8.

Fertigt man mit den Leuchtgraden auf der Ordinate und den Zeitmarken auf der Abszisse die *Leuchtkurven* dieser Proben an, wie es in Fig. 8 geschehen ist, so zeigen die Röhren 4, 5 und 6

nach 46 Stunden einen raschen Anstieg des Leuchtvermögens. In der Probe 3 ist die Leuchtkraft überhaupt geringer, die Lichtzunahme langsamer, und über 46 Stunden hinaus fast gleich zunehmend wie in den ersten Wachstumszeiten. Auch im Leuchten der Probe 6 tritt innerhalb der Beobachtungszeit keine Abnahme auf. Es verhält sich hier in bezug auf den Anstieg wie im Röhrchen 3. Bei den Kulturen 4 und 5 ist der Wendepunkt nach 46stündiger Entwicklung deutlich. Jedenfalls weichen die Leuchtkurven bei Verwendung von NaBr sehr auffallend von jenen mit NaCl ab (vgl. Fig. 4), wenn auch keine so großen Leuchtwerte erreicht werden. Weiters ist die Erscheinung beachtenswert, daß *Photobacillus radians* *weit größere Mengen von NaBr im Nährboden durch lange Zeit verträgt* als solche von NaCl. Ebenso bemerkenswert ist die verhältnismäßig starke Alkalibildung in den NaBr-Kulturen (von  $p_H = 7$ , auf  $p_H = 7.5$ ).

Wesentlich anders gestalten sich die Leuchtverhältnisse bei der Zucht mit NaBr-Zusätzen und *Glyzeringaben*, wie die folgende Tabelle 4 dartut, in der die Zusammensetzung der Nährlösungen in einer Versuchsreihe mit NaBr und Glyzerin und deren Leuchtergebnisse zusammengefaßt sind.

Tabelle 4.  
NaBr-Versuch mit Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>					NaBr-Gehalt		$p_H$		Leuchtgrad nach Stunden		
	Stamm-Bouillon	$\frac{1}{2}$ -Mol. Glyzerinlsg.	2-n.-NaBr-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 63 Stunden	22	46	63
1	50	15	5	30	100	$\frac{1}{10}$	1.03	7.0	7.0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	$\frac{2}{10}$	2.06	7.0	7.3	1.4	7.7	1.0
3	50	15	15	20	100	$\frac{3}{10}$	3.09	7.0	7.3	6.4	17.0	4.0
4	50	15	20	15	100	$\frac{4}{10}$	4.12	7.0	7.3	7.0	19.4	9.5
5	50	15	25	10	100	$\frac{5}{10}$	5.15	7.0	7.3	6.0	19.0	15.5
6	50	15	30	5	100	$\frac{6}{10}$	6.18	7.0	7.3	5.8	20.0	13.0

Vor allem leuchtet auch die Probe 2 mit  $\frac{2}{10}$  n. NaBr. Dann sind die *Leuchtmaxima* nach 46 Stunden in den Röhrchen 4 bis 6 kaum nennenswert verschieden, aber alle zeigen scharfe Umkehrpunkte bei 46 Stunden. Von dieser Zeit ab tritt ein dem Aufstieg fast gleicher Abfall der Leuchtfunktion ein. Bei der passendsten NaBr-Konzentration nähert sich im Falle der Glyzerinzugabe der

Verlauf sehr jenem bei den NaCl-Versuchen mit Glycerin. Es zeigt sich aber die Glycerinwirkung bei Verwendung des Bromsalzes weitaus prägnanter. Die Fig. 9 zeigt die Leuchtkurven dieser Ver-

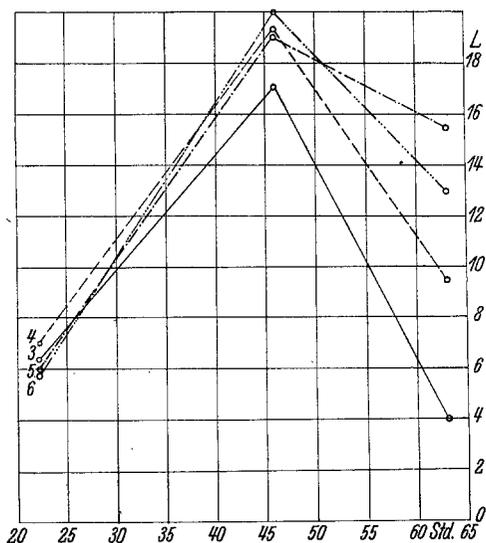


Fig. 9.

suchsreihe nach den Leuchtgraden der Tabelle 4. Hier treten die geschilderten abweichenden Verhältnisse noch krasser hervor. Die Lichtstärke ist ebenfalls durch den Glycerinzusatz sehr bedeutend erhöht (NaBr + Glycerin maximal = 20, gegenüber NaBr ohne Glycerin = 16).

Soweit *Trübungsmessungen* einigermaßen Schlüsse zulassen, kann allgemein gesagt werden, daß die Vermehrung trotz sehr guten Leuchtens bei den optimalen Salzbedingungen als geringer einzuschätzen ist als bei den NaCl-Versuchen, einerlei ob mit oder ohne Glycerin.

#### Trübungszahlen der NaBr-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden			Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden		
		22	46	63			22	46	63
NaBr + Glycerin	2	13·0	33·0	39·0	NaBr	2	5·7	16·2	29·2
	3	15·0	53·0	47·0		3	13·5	46·0	51·0
	4	16·5	53·2	61·2		4	12·5	40·5	49·5
	5	19·5	49·5	72·0		5	12·3	36·8	46·8
	6	19·1	45·6	71·6		6	11·5	27·0	38·0

Die Zusammenstellung der *Trübungszahlen* der NaBr-Veruchsreihen läßt weiter erkennen, daß die Vermehrung im allgemeinen durch den Glycerinzusatz etwas erhöht wird.

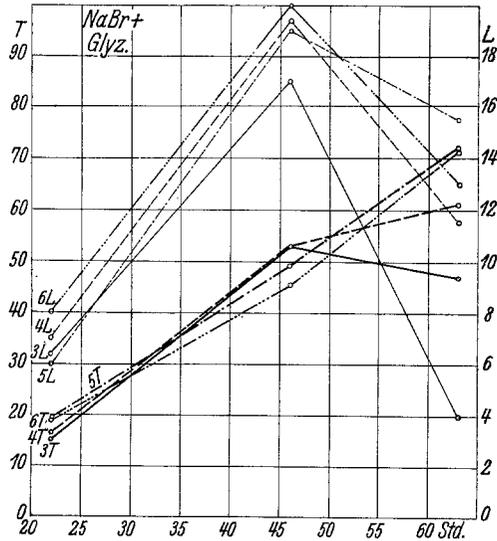


Fig. 10.

Die Natriumbromidzugaben scheinen überhaupt die Neigung der Zellen zu Verklebungen zu steigern, was die niedrigen Trübungszahlen auch bei guter Lichtentwicklung verständlich macht.

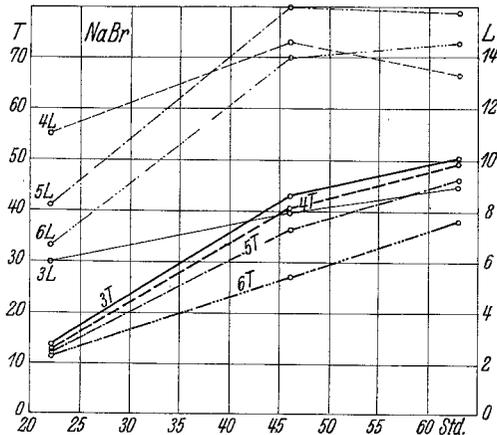


Fig. 11.

Wenn man die Trübungszahlen der einzelnen Proben graphisch auswertet, erhält man die in den Fig. 10 und 11 wiedergegebenen *Trübungsverlaufslinien*. Sowohl bei Glycerinzugabe

(Fig. 10) als auch ohne eine solche (Fig. 11) sind die Kurvenscharen geschlossen und bis zur Wachstumszeit von 46 Stunden ansteigend; von da ab bei Glyzerinmangel weiter steigend und bei Glyzeringaben in den höheren Konzentrationen mehr oder weniger ansteigend, in den niederen dagegen fallend. Vergleicht man damit die in diesen Bildern dünn eingetragenen Leuchtkurven (3 L, 4 L, 5 L und 6 L), so zeigt sich ebenfalls ein wesentlicher Unterschied im gegenseitigen Verlauf beim Fehlen und Vorhandensein von Glyzerin. Auffallend ist auch der Zug der Leuchtkurve 3 L und der Trübungskurve 3 T in Fig. 11, also ohne Gly-

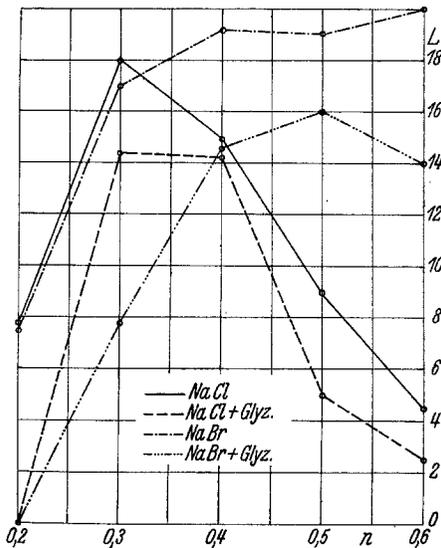


Fig. 12.

zerinzusatz. Trotz relativ guter Vermehrung ist die Leuchtfähigkeit doch nur als gering anzusehen. Hier greift das Glyzerin verbessernd ein, wie es 3 L und 3 T der Fig. 10 erkennen lassen.

Um die *Wirkungsweise* des Chlorides und Bromides hinsichtlich der Beeinflussung der Leuchtfähigkeit unseres Photobazillus besser überschauen zu können, wurde das Schaubild der Fig. 12 hergestellt. Die Abszisse trägt die Konzentrationsmarken in Zehntel-Normalmengen der versuchten Salze. Die Leuchtgrade sind auf der Ordinate verzeichnet. Weiters wurde für diese Übersicht die Wachstumszeit von 46 bzw. 48 Stunden gewählt und die dieser Zeit entsprechenden Leuchtgrade herausgehoben. Es bauen sich somit diese Kurven auf den Leuchtgrad nach 46 bzw. 48 Stunden jeder der vier Salzkombinationen, NaCl allein, NaCl mit Gly-

zerin, NaBr allein und NaBr mit Glycerin, in den auf der Abszisse angesetzten Konzentrationen auf.

Verfolgt man den Leuchtverlauf bei verschiedenem NaCl-Gehalt ohne Zusatz von Glycerin, sieht man das Leuchtmaximum im Röhrechen mit einer NaCl-Konzentration von  $3/10$  n. auftreten. Es ist jedenfalls eng begrenzt, denn bei niedrigerer oder höherer Konzentration fällt die Leuchtfähigkeit steil ab. Vergleicht man damit die Leuchtcurve mit NaBr ohne Glycerinzugabe, verläuft sie bis  $3/10$  n. Salzlösung annähernd parallel mit der NaCl-Linie. Dann aber erhebt sie sich weiter allmählich ohne ausgesprochenen Abstieg und bekommt erst bei  $6/10$  n. Salzlösung ihren in der Beobachtungsdauer von 48 Stunden höchsten Stand. Dieser Vergleich zeigt klar und einwandfrei, daß dem *Cl* und *Br* als Anionen eine weitgehende Beeinflussung des Leuchtens in dem Sinne zukommt, daß *ersteres ebenso wie letzteres* bei Konzentrationen von  $2/10$  bis  $3/10$  n. Salzlösung die Lichterzeugung wesentlich fördert, *von da ab aber bei den höheren Salzgehalten das Cl'-Ion die Leuchtfähigkeit hemmt, das Br'-Ion dagegen dieselbe noch weiter günstig beeinflusst. Trotz vollkommener Isotonie beider Salzlösungen können sich diese Salze doch nicht vollwertig vertreten*, denn sonst müßten beide Kurven entweder zusammenfallen oder mindestens parallel knapp nebeneinander verlaufen, wie es annähernd bei den niederen Konzentrationen der Fall zu sein scheint.

Führt man Glycerin zu, so ändert sich das Bild des Verlaufes dieser Kurven dahin, daß auch bei den niederen Gehalten der parallele und nahegelegene Verlauf aufhört, während die Erscheinungen bei den höheren Konzentrationen  $4/10$  und  $6/10$  n. keinen tiefgehenden Unterschied durch den Glycerinzusatz erfahren.

#### KCl- und KBr - Versuchsreihen.

Im allgemeinen wurden die Versuchsreihen mit KCl und KBr, in verschiedenen Konzentrationen angewendet, den Natriumversuchsreihen analog durchgeführt. Deshalb ging ich wieder von Normallösungen dieser beiden Salze aus und wählte jenen Gehalt an denselben, der steigend  $1/10$  bis  $6/10$  normal umfaßte. Dementsprechend deckt sich die Numerierung der Proben der einzelnen Versuchsreihen mit ihrem Salzgehalt an Zehntelnormal. So wurde in allen gleich bezifferten Kulturen die Isotonie der Nährlösungen gewahrt und die Vergleichsmöglichkeit für alle Proben geschaffen. Es schien auch wünschenswert, in die gegenseitige Vertretbarkeit

von K und Na in bezug auf Leuchten und Wachstum dieser Bakterienart Einblicke zu erhalten, zumal in dieser Hinsicht messende Untersuchungen für Leuchtbakterien mir nicht bekannt wurden. BELJERINCK<sup>8</sup> spricht zwar von einer Vertretbarkeit des Kochsalzes durch andere Salze, sofern diese in isotonischen Mengen angewendet werden, welcher Ansicht sich auch MOLISCH<sup>9</sup> anschloß; jedoch wurden prozentuelle Vergleichslösungen zu den Versuchen verwendet und die Leuchtstärken nicht vergleichend gemessen.

Ohne auf Einzelheiten dieser und anderer älterer Literaturangaben einzugehen, hielt ich eine Überprüfung der Befunde, welche die Basis der genannten Ansichten abgeben, durch Meßversuche in tatsächlich isotonischen Nährmedien für notwendig.

Es sei gleich betont, daß die folgenden Versuche insofern als „unrein“ zu bezeichnen sind, als eine völlige Ausschaltung des Natriums aus denselben nicht geschehen ist. Schon das *Seefischfleischwasser* enthält beträchtliche Mengen Natrium, denn die Aschenanalyse<sup>10</sup> des Fleisches vom *Schellfisch* (*Gadus aeglefinus*) ergibt einen Gehalt von 13·84% Kali und 36·51% *Natron* neben 3·39% Kalk und 1·9% Magnesia. Ein großer Teil der Natriumverbindungen des Fleisches geht aber in die Brühe über. Diese Verbindungen sind in den vorliegenden Versuchen nicht ausgeschaltet und stören die Reinheit derselben. Allerdings kann man das gleiche in bezug auf Kaliumverbindungen für die Natriumversuche des vorigen Abschnittes aussagen. Im Anschluß an die früher erwähnten laufenden Untersuchungen über die Gewinnung der für die Ernährung dieser Mikroben notwendigen chemisch reinen N-Verbindungen werden Versuche mit ausschließlichen Na- bzw. Kalium-Gehalten ausgeführt, deren Ergebnis einer späteren Mitteilung vorbehalten ist. Entsprechende Vorversuche haben gezeigt, daß sich dadurch im wesentlichen nichts ändert.

#### KCl - V e r s u c h e.

Die Zusammensetzung der Nährflüssigkeiten, die nach bestimmten Wachstumszeiten erhaltenen Leuchtwerte und die Anfangs- und Endreaktion der Versuchsreihe mit KCl *ohne* Glycerinzugabe sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

<sup>8</sup> M. W. BELJERINCK, *Le photobacterium luminosum, bactérie lumineuse de la mer du nord*. Arch. Néerlandaises des Scienc. Exact. et Natur., Haarlem, T. XXIII, 1889.

<sup>9</sup> H. MOLISCH, *Leuchtende Pflanzen*, 2. Auflage, Fischer, Jena 1912.

<sup>10</sup> Vgl. J. KÖNIG, *Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel* 2. 1904, S. 483.

Tabelle 5.  
KCl-Versuch ohne Glycerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>				KCl-Gehalt		p <sub>H</sub>		Leuchtgrade nach Stunden			
	Stamm- Bouillon	2-n.-KCl- Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs- anfang	Nach 60 Stunden	24	36	48	60
1	50	5	45	100	1/10	0.75	7.1	7.2	0	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	1.49	7.1	7.3	0	0	4.0	4.8
3	50	15	35	100	3/10	2.24	7.1	7.4	0	2.5	3.5	4.0
4	50	20	30	100	4/10	2.98	7.1	7.4	2.6	4.0	7.5	7.0
5	50	25	25	100	5/10	3.73	7.1	7.4	6.3	4.7	5.0	6.8
6	50	30	20	100	6/10	4.47	7.1	7.4	0.2	8.5	7.4	8.8

In derselben sind die maximalen Leuchtgrade für jeden Beobachtungsabschnitt fett hervorgehoben. Vor allem sind die niederen Werte derselben auffallend. Die höheren Konzentrationen an KCl fördern den Leuchtprozeß noch am meisten. Das Optimum des Salzgehaltes liegt hier um 6/10 n. KCl. Die geringeren Salz- mengen von 2/10 bis 3/10 n. KCl wirken anscheinend überhaupt nur schwach. Auch in dieser Versuchsreihe nimmt beim Wachstum die Alkaleszenz des Nährbodens zu, wie aus der Abnahme der ursprünglichen Wasserstoffionenzahl entsprechend p<sub>H</sub> = 7.1 auf p<sub>H</sub> = 7.4 zu ersehen ist.

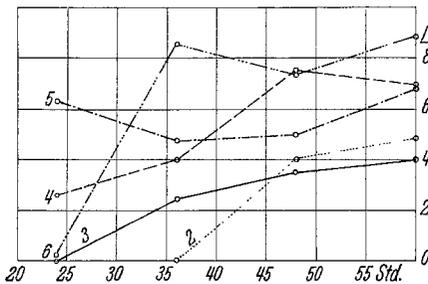


Fig. 13.

Das mit den Leuchtgraden ausgeführte Schaubild der Licht- entwickung mit KCl ist in Fig. 13 wiedergegeben. Das Leucht- vermögen der Kulturen 2 und 3, entsprechend der Konzentration 2/10 und 3/10 n. KCl steigt allmählich an, ohne in der Beobach- tungszeit von 60 Stunden höhere Werte zu erhalten. Eine ähnliche Zunahme zeigt auch die Probe 4, bei der aber nach 48 Stunden bereits der Abfall einsetzt. Die Probe 6 mit dem höchsten Gehalt an KCl bietet für das Leuchten die optimalen Bedingungen, da

ein rascher Anstieg erfolgte, den ein geringer Abfall ablöste, um einem zweiten Anstieg zu weichen, der das Leuchtmaximum erreichte. Nicht ohneweiters klar sind die im Zuge der Leuchtlinie 5 und 6 eingestreuten Senkungen. Auf dieselben wird bei der Betrachtung der Trübungskurven zurückgekommen. Die eingetragenen Anfangsleuchtgrade der Proben 2 bis 4 zeigen deutlich die Steigerung der lichtfördernden Eigenschaften zunehmender Salzkonzentration.

Durch die *Zugabe von 0.69% Glycerin* bei gleichem KCl-Gehalt treten wesentliche Änderungen im Leuchtvermögen auf, wie es die folgende Tabelle 6 zeigt.

Tabelle 6.  
KCl-Versuch mit 0.69% Glycerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>					KCl-Gehalt		p <sub>H</sub>		Leuchtgrade nach Stunden			
	Stamm- Bouillon	1/2-Mol- Glycerinslg.	2-n.-KCl- Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs- anfang	Nach 60 Stunden	24	36	48	60
1	50	15	5	30	100	1/10	0.75	7.1	7.1	0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	1.49	7.1	7.2	0	2.0	6.3	7.7
3	50	15	15	20	100	3/10	2.24	7.1	7.2	0	3.0	7.5	8.5
4	50	15	20	15	100	4/10	2.98	7.1	7.2	3.7	4.6	10.5	10.0
5	50	15	25	10	100	5/10	3.73	7.1	7.2	4.8	7.7	18.0	12.4
6	50	15	30	5	100	6/10	4.47	7.1	7.2	1.9	9.3	18.3	12.4

Das *Leuchtmaximum* liegt zwar wieder bei 6/10 n. KCl, jedoch sind die Leuchtwerte an sich bedeutend gestiegen und selbst bei den niederen Konzentrationen ist unter dem Einflusse des Glycerins nicht unerhebliches Leuchten eingetreten. Es wurde auch wesentlich weniger Alkali gebildet, denn die p<sub>H</sub>-Zahlen sind von 7.1 nur auf 7.2 gestiegen.

Die Unterschiede im Verlauf der Lichtbildung mit und ohne Glycerinbeigabe zeigen sich besonders in der graphischen Auswertung der Leuchtgrade, wie sie die Fig. 14 darstellt. Der Verlauf der Leuchtcurven ist eindeutig und klar und frei von eingestreuten Senkungen und erinnert hinsichtlich der Röhren 5 und 6 an den Zug der NaCl-Kurven 3 und 4 der Fig. 5. *Dieser Vergleich allein zeigt überzeugend, daß die Isotonie nicht das wirksame Agens sein kann.* Wäre sie es, müßten die Leuchtcurven der KCl-Proben 3 und 4 mit jenen der NaCl-Röhren 3 und 4 parallel laufen oder sich decken, was aber nicht der Fall ist. Das Kation

K wirkt erst bei weit höherer Konzentration ungefähr ebenso wie das Kation Na. Es gestaltet die Glycerinzugabe auch in diesem Falle die Entwicklung und das Leuchten stetiger in seinem Verlauf und verhindert das Auftreten von eingestreuten Senkungen.

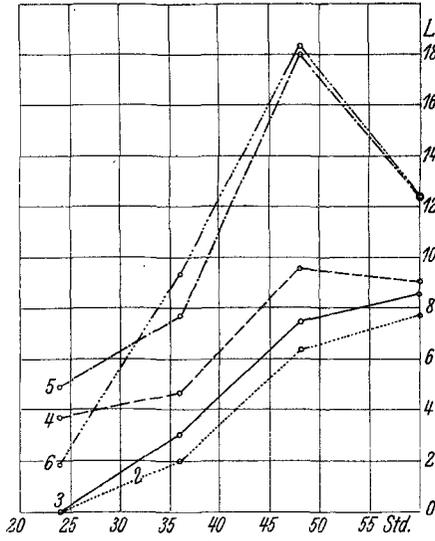


Fig. 14.

Die auf die Vermehrung bezogenen *Trübungszahlen* sind im allgemeinen niedrig, wie aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich ist. Auch Glycerinzusätze erhöhen dieselben nur unwesentlich.

Trübungszahlen der KCl-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahlen nach Stunden			
		24	36	48	60
KCl + Glycerin	2	1·0	2·5	13·0	13·5
	3	1·0	3·5	11·5	15·5
	4	8·7	13·0	22·5	25·4
	5	8·6	16·5	21·0	27·0
	6	5·0	14·5	15·5	25·0
	KCl	2	2·8	5·6	10·5
3		3·0	4·0	12·0	15·0
4		8·0	15·5	17·0	22·0
5		11·4	17·3	19·8	24·3
6		5·4	13·4	15·9	20·9

Nach der *Trübung* beurteilt, wäre das *Vermehrungsoptimum* mit und ohne Glycerinzusatz bei der Konzentration des Röhrchens 5 anzunehmen, also bei  $1/2$  n. KCl, während wir das Leuchtoptimum bei  $6/10$  n. KCl feststellen konnten. Es muß jedoch dazu bemerkt werden, daß das KCl die Bildung größerer Zellformen und Verklebungen der Mikroben begünstigt, was besonders für die höheren Konzentrationen gilt. Auch die früher bei den Leuchtkurven 5 und 6 der Figur 13 hervorgehobenen eingefügten Abfälle dürften auf eine Vergrößerung der lichtstreuenden Teilchen durch Verklebung von Zellen zu Zellenhäufchen zurückzuführen sein, wobei die Lichtausstrahlung ebenfalls vermindert wird, wenn auch nicht in so hervortretender Weise.

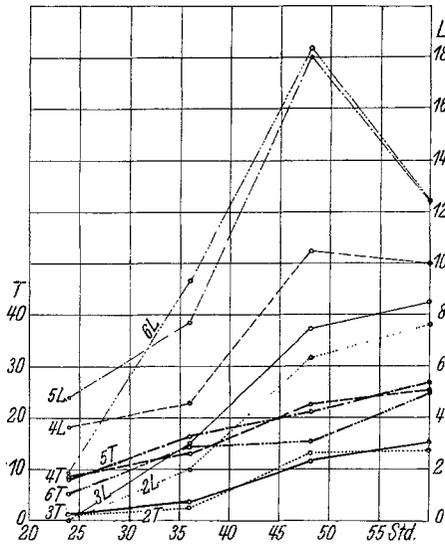


Fig. 15.

Aus den Kurvenscharen der Figuren 15 (mit Glycerin) und 16 (ohne Glycerin) ersieht man mit größter Deutlichkeit die Regelmäßigkeit des Trübungsverlaufes während des Wachstums (Kurven  $2T$ ,  $3T$ ,  $4T$ ,  $5T$  und  $6T$ ). Die dünn gezeichneten Leuchtkurven zeigen bei den höheren Konzentrationen der Reihe ohne Glycerin gar keinen Zusammenhang mit den dazugehörigen Trübungskurven, wie es ganz besonders  $5L$  und  $5T$  und auch  $6L$  und  $6T$  der Fig. 16 dartun. Im ersteren Fall findet im Zeitintervall 23 bis 27 Stunden ein Anstieg der Trübung ( $T$ ) statt, während gleichzeitig das Leuchtvermögen zurückgeht. Es hat fast den Anschein, als läge eine Störung des üblichen Zusammengehens von Wachstum und Leuchten vor. Durch die Darreichung von Glycerin werden diese Diskrepanzen größtenteils vermieden, wie es aus den Kurven

der Fig. 15 hervorgeht. Die Leuchtkurven 5L und 6L steigen in den ersten 48 Stunden der Vermehrung steil an, während die zugeordneten Trübungskurven einen allmählichen Anstieg aufweisen. Nach 48 Stunden läßt das Leuchten allerdings auch rapid nach, obwohl die Trübung weiterhin stetig zunimmt. Die schwächeren KCl-Konzentrationen mit Glyzerin zeigen dagegen während der ganzen Versuchsdauer eine gute Übereinstimmung zwischen Trübung bzw. Vermehrung und Lichtentwicklung.

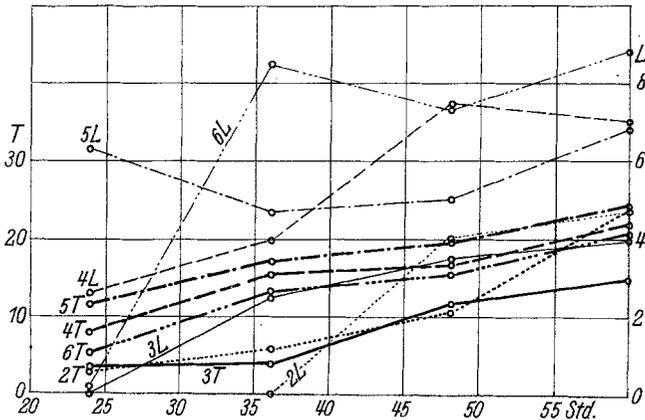


Fig. 16.

KBr - Versuche.

Bei diesen Versuchsreihen wurde das KCl durch KBr äquivalent ersetzt, so daß auch hier dieselben osmotischen Verhältnisse obwalten. In Tabelle 7 sind die Zusammensetzungen der Nährlösungen, die  $p_H$ -Zahlen und die Leuchtgrade nach den verschiedenen Wachstumszeiten zusammengefaßt.

Tabelle 7.

KBr-Versuch ohne Glyzerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>				KBr-Gehalt		$p_H$		Leuchtgrad nach Stunden				
	Stamm-Bouillon	2-n.-KBr-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchsanfang	Nach 82 Stunden	35	45	58	70	82
1	50	5	45	100	1/10	1·19	7·0	7·0	0	0	0	0	0
2	50	10	40	100	2/10	2·38	7·0	7·4	8	3·8	3·9	2·8	0
3	50	15	35	100	3/10	3·57	7·0	7·5	2·3	5·0	4·5	1·8	1·6
4	50	20	30	100	4/10	4·76	7·0	7·4	5·4	6·0	3·2	2·6	4·9
5	50	25	25	100	5/10	5·95	7·0	7·3	9·7	5·3	5·2	5·0	4·7
6	50	30	20	100	6/10	7·14	7·0	7·2	11·3	5·0	3·0	3·9	2·0

Schon nach 35 Stunden ist in der Kultur 6 die größte überhaupt beobachtete Leuchtstärke erreicht, also in der Probe mit  $6/10$  n. KBr. Diese starke Lichtstrahlung hat jedoch nur eine sehr kurze Dauer, denn nach weiteren zehn Stunden ist sie unter die Hälfte zurückgegangen, um in der Folge allmählich noch weiter zu fallen. Auch in der Probe 5 mit  $1/2$  n. KBr ist ebenfalls nach 35stündigem Wachstum der für dieses Röhrchen höchste Leuchtwert erreicht, der aber absolut kleiner ist als bei 6. Der Rückgang erfolgte aber weniger steil, so daß sich selbst nach 82 Stunden am Ende des Versuches noch immer eine gute Lichtbildung zeigte. Bei den Kulturen mit kleinerem KBr-Gehalt treten die Leuchtmaxima erst nach 45 bzw. 58 Stunden auf.

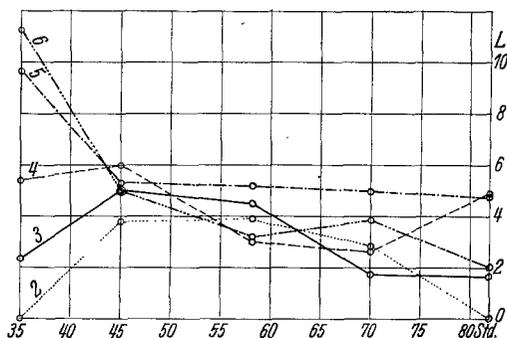


Fig. 17.

Diese Verhältnisse zeigen sich in der graphischen Darstellung der Fig. 17 besonders deutlich. *Im allgemeinen bewirkt das KBr einen sehr raschen Anstieg des Leuchtens innerhalb der ersten 35 Wachstumsstunden, wenn es in der Menge von  $4/10$ — $5/10$  normal angewendet wird.*

Mit abnehmender Dosis tritt diese rapide Wirkung immer mehr zurück. Es werden dann aber auch nur geringe Lichtmengen ausgesandt. Die stimulierenden Eigenschaften der größeren Konzentrationen sind bei KBr viel ausgeprägter als bei KCl oder gar NaCl. Dafür ist bei KCl der Rückgang des Leuchtens bei den optimalen Konzentrationen sanfter und weniger steil.

Auch hier ändert die Anwesenheit von *Glyzerin* die Leuchtverhältnisse einschneidend. Tabelle 8 zeigt den Aufbau und die Ergebnisse einer KBr-Versuchsreihe *mit Glyzerin*.

Es bleibt wohl auch hier der Probe 6 das Leuchtmaximum erhalten, das aber niedriger liegt als ohne Glyzerin. Nach 45 Stunden weist jedoch das Röhrchen 3 die größte Lichtintensität

auf, die jener der Probe 6 nach 35 Stunden sehr nahe kommt. In diesem Leuchtstadium verbleibt nun die Kultur 3 bis zu etwa 70 Stunden, um dann rasch fast zu erlöschen. Die Proben 4 und 5 erreichen diese Leuchtgrade überhaupt nicht, obwohl gerade die Kultur 5 selbst nach 82 Stunden noch gut leuchtet.. Die  $p_H$ -Zahlen lassen erkennen, daß die 6/10 n. KBr enthaltenden Kulturen wenig alkalisch geworden sind und trotzdem bei  $p_H = 7.2$  die Leuchtmaxima aufweisen, einerlei ob Glycerin vorhanden ist oder nicht.

Tabelle 8.  
KBr-Versuch mit 0.69% Glycerin.

Nummer der Kultur	cm <sup>3</sup>					KBr-Gehalt		$p_H$		Leuchtgrad nach Stunden				
	Stamm-Bouillon	1/2-Mol-Glycerinlg.	2-n.-KBr-Lösung	H <sub>2</sub> O	Summe	normal	Prozent	Versuchs-anfang	Nach 82 Stunden	35	45	58	70	82
1	50	15	5	30	100	1/10	1.19	7.0	7.0	0	0	0	0	0
2	50	15	10	25	100	2/10	2.38	7.0	7.2	0	4.0	6.5	7.0	0
3	50	15	15	20	100	3/10	3.57	7.0	7.3	1.4	<b>7.3</b>	<b>8.0</b>	<b>8.3</b>	2.0
4	50	15	20	15	100	4/10	4.76	7.0	7.3	3.1	5.7	5.0	4.0	3.8
5	50	15	25	10	100	5/10	5.95	7.0	7.2	3.9	6.0	6.2	4.9	<b>6.0</b>
6	50	15	30	5	100	6/10	7.14	7.0	7.2	<b>9.2</b>	4.0	6.8	4.0	3.5

In Figur 18 sind diese Verhältnisse in Kurven dargestellt, welche die Verschiedenheit gegenüber dem Leuchten ohne Glycerinzusatz gut erkennen lassen. Die Kurven mit Ausnahme der dem

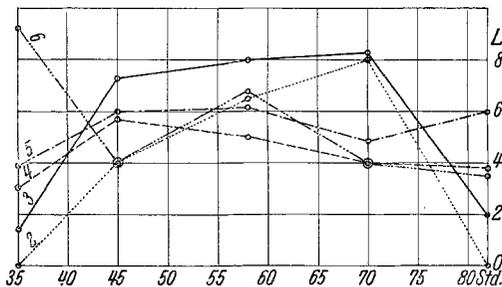


Fig. 18.

Röhrchen 6 zugeordneten verlaufen höher und langsamer ansteigend, während die Größe der Leuchtgrade nach den ersten 35 Stunden beim Glycerinzusatz vermindert erscheint. Besonders in den Röhrchen mittlerer Konzentration ist die Leuchtfähigkeit

nicht unwesentlich gesteigert und verlängert, was übrigens auch für das Röhrchen 2 mit 2/10 n. KBr zutrifft (Kurve 2). Der Verlauf des Leuchtens im Röhrchen 6 hat sich durch die Glycerinzugabe nicht wesentlich geändert. Im Vergleich zum NaBr ist die Förderung des Leuchtens durch KBr mit und ohne Glycerin nur als gering zu bezeichnen.

Auch die *Kulturtrübungen* beim Wachstum werden durch KBr anders beeinflusst als durch KCl, wie aus der folgenden Zusammenstellung der *Trübungszahlen* der KBr-Versuchsreihen zu entnehmen ist.

Trübungszahlen der KBr-Versuchsreihen.

Kultur	Nr.	Trübungszahl nach Stunden			
		35	45	58	70
KBr + Glycerin	2	5·6	14·6	23·6	36·6
	3	10·7	19·7	31·2	43·2
	4	15·0	22·0	37·5	30·5
	5	17·4	19·4	20·7	27·4
	6	8·3	10·0	14·0	18·0
KBr	2	8·5	18·2	26·9	31·2
	3	12·7	22·7	28·7	31·7
	4	15·7	27·2	29·2	36·2
	5	9·6	23·7	24·9	34·6
	6	9·2	11·2	12·2	17·2

Im allgemeinen sind die *Trübungszahlen größer* als bei den Proben mit KCl, was besonders für die mittleren und niederen Konzentrationen hervorgehoben sei. Umgekehrt zeigen die Proben mit den höchsten Konzentrationen (6/10 n. KBr) kleinere Trübungswerte als die gleichen Proben mit KCl.

Eine Übersicht über den Verlauf der *Trübungen* bzw. des Wachstums in bezug auf die zugehörigen Leuchtkurven geben die Fig. 19 und 20, von denen sich die erstere auf die Versuchsreihe mit Glycerin bezieht.

Die Kurven 3 *T*, 4 *T* und 5 *T* der Fig. 19 verlaufen ansteigend mit fortschreitender Wachstumszeit und dabei divergierend, während beim Mangel an Glycerin dieselben sanfter ansteigen und nicht auseinandergehen (Fig. 20). Bei niedriger Konzentration bewirkt der Glycerinzusatz einen etwas höheren An-

stie $\ddot{g}$  (Fig. 19, 2 T). Die Trübungen in den Proben 6 mit 6/10 n. KBr mit oder ohne Glycerin verlaufen annähernd gleich. Zwischen den Leuchtgraden und den zugehörigen Trübungen herrschen bei den KBr-Versuchen ohne Rücksicht auf den Glycerinzusatz mehr oder

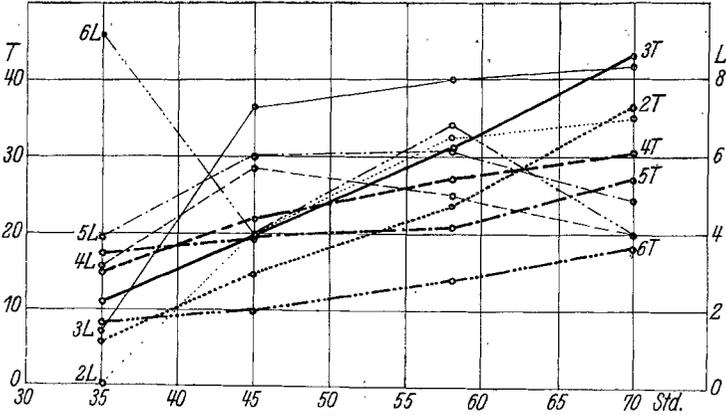


Fig. 19.

minder auffallende Unstimmigkeiten. Vielfach entsprechen geringe Trübungswerte hohen Leuchtgraden und umgekehrt. Letzteres zeigt sich besonders bei den Proben ohne Glycerin in den Wachstumszeiten nach 45 Stunden und bei den mittleren Kon-

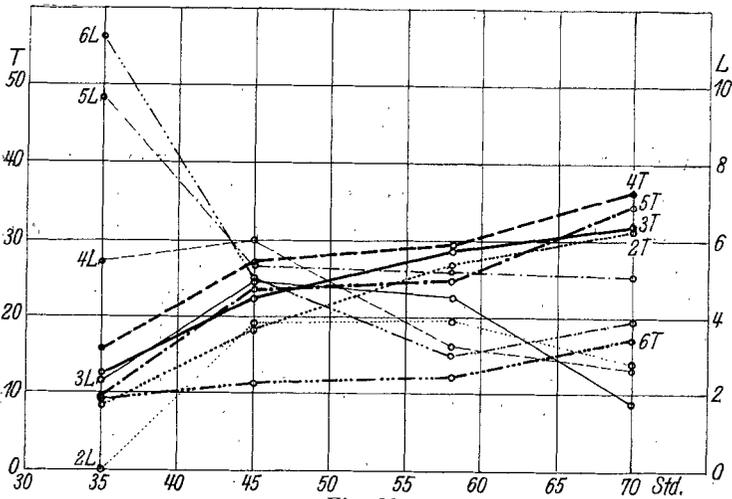


Fig. 20.

zentrationen (2, 3 und 4 der Fig. 20), während die entsprechenden Kulturen mit Glycerin eine bessere Übereinstimmung in diesen Konzentrationsbereichen aufweisen.

Um die Wirkung der Salze KCl und KBr ohne und mit Glycerin klar zu überschauen, erscheint es zweckmäßig, die Größe

der Leuchtgrade in jedem Röhrchen, also bei jeder Konzentration dieser Salze, nach einer bestimmten Wachstumszeit herauszuheben und mit diesen Werten eine graphische Darstellung anzufertigen, bei der die Abszisse die Marken in Zehntelnormal-Salzmengen trägt. Dieselbe ist in Fig. 21 wiedergegeben. Die frühere Fig. 12 brachte ein ähnliches Schaubild für die Lichtwirkung bei NaCl und NaBr, welches mit dieser Figur unmittelbar vergleichbar ist.

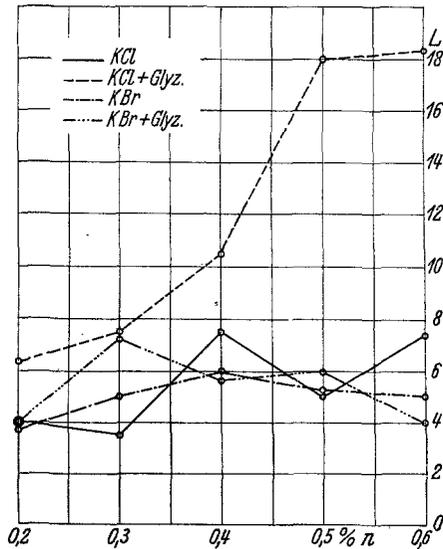


Fig. 21.

Wenn man die nach 48 Stunden erhaltenen Leuchtwerte der *KCl-Reihe* in ihrer gegenseitigen Lage betrachtet, findet man einen *ruckweisen Aufstieg des Leuchtens* bei zunehmender Konzentration, so daß bei 4/10 und 6/10 n. KCl *Leuchtspitzen* erscheinen. Der Zusatz von Glycerin *glättet* den Verlauf der Lichtzunahme mit der Erhöhung der Konzentration, wobei das Maximum in den Bereich von 6/10 n. KCl zu liegen kommt.

Das *KBr ohne* Glycerinzusatz bewirkt das Auftreten eines *einzigsten Leuchtmaximums* nach 48 Stunden bei 4/10 n. KBr. Dasselbe ist aber kleiner als bei 4/10 n. KCl. Wir finden bis zum Maximum einen fast linearen sehr scharfen Anstieg und von dort weg einen fast ebenso gestalteten Abfall. Wenn wir *Glycerin* zusetzen, erhalten wir auch bei der *KBr-Reihe zwei* Leuchtspitzen, eine bei 3/10 n. KBr und eine andere und geringere bei 5/10 n. KBr. Die Verbindung der Leuchtgrade dieser *KBr-Glycerinreihe* ergibt eine Schaulinie, die einen ähnlichen Verlauf auf-

weist wie jene der KCl-Proben *ohne* Glyzerin, *aber gegen die geringere Konzentration zu verschoben*. Im Falle des KBr wirkt demnach der Glyzerinzusatz in bezug auf die Bildung von Leuchtspitzen *gerade umgekehrt* wie bei KCl. Bei den KBr-Reihen fördert das Glyzerin die Lichterzeugung viel weniger als bei den KCl-Proben.

Vergleicht man die Kurvenschar der K-Reihen mit jener der Na-Versuche (Fig. 12), erkennt man sofort die große Verschiedenheit der Wirkung der Na- und K-Salze mit und ohne Glyzerin. Der Leuchtverlauf an sich und die Lage der Maxima zeigen sehr einschneidende Unterschiede. Nach diesen Befunden kann man von einer gegenseitigen Vertretbarkeit dieser Kationen und Anionen bei gleichbleibender Wirkung in bezug auf das Leuchten wohl nicht sprechen. Jedes Salz der untersuchten Reihen hat sein eigenes Konzentrationsoptimum, das bei dem Photobazillus radians das beste Leuchten erzeugt. Es scheint der Fall so zu liegen, daß *die verschiedenen Kationen und Anionen die Bakterien veranlassen, ihre eigenen osmotischen Plasmaverhältnisse fallweise einzustellen*. In dieser Weise dürften sich besonders die Kationen (Cl' und Br') bemerkbar machen. *Jedenfalls können sich die untersuchten Salze, auch in isotonischen Lösungen angewendet, nicht gegenseitig wirkungsgleich vertreten*.

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

Die von Nordseefischen reingezüchtete Leuchtbakterienart wird morphologisch und physiologisch kurz charakterisiert und unter dem Namen Photobazillus radians als neue Art geführt, mit der die beschriebenen Versuche ausgeführt wurden.

Ohne Zugabe einer besonderen C-Quelle tritt das Leucht optimum in der verwendeten Bouillon bei der NaCl-Konzentration von 3/10 normal nach 48stündigem Wachstum bei 16° C ein.

Im NaCl-Versuch ohne Glyzerin als C-Quelle werden bei einer Menge von 6/10 n. NaCl Wachstum und Leuchten wesentlich verlangsamt, dafür aber durch längere Zeit steigend erhalten.

Die mit Glyzerin kombinierten NaCl-Kulturen zeigen ihr optimales Leuchten bei einer Kochsalzmenge von ebenfalls 3/10 normal nach 48stündiger Zucht, jedoch wird dasselbe knapp an die Leuchtstärke der Probe mit 4/10 n. NaCl herabgedrückt. Glyzerin schwächt im Falle der NaCl-Kulturen das Leuchten sehr beträchtlich bei niedrigeren Konzentrationen als 3/10 normal, hebt

dasselbe aber für die höheren Konzentrationen über 4/10 normal NaCl in den Wachstumszeiten nach 65 Stunden.

NaBr ohne Glycerin wirkt in einer Menge von 5/10 normal nach 48 Stunden optimal auf das Leuchten, wobei dasselbe schon nach 22stündiger Kultur stark zu bemerken ist.

Bei NaBr *mit* Glycerin wird die Leuchtfähigkeit sehr ausgiebig in den Proben von 3/10 bis 6/10 normal gebessert, wobei das Optimum nach 48 Stunden in der Probe mit 6/10 normal festzustellen ist, dem sich die Leuchtgrade der Röhren 4 und 5 aber sehr nähern.

In den NaBr-Kulturen mit Glycerin geht aber das Leuchten nach 48 Stunden rasch und stark zurück.

Bei demselben Kation Na<sup>+</sup> ist die Wirkung der Anionen Cl<sup>-</sup> und Br<sup>-</sup> derart verschieden, daß eine gegenseitige Vertretbarkeit der Salze NaCl und NaBr mit gleicher Wirksamkeit in isotonischen Lösungen nicht möglich ist. Die Anionen äußern hinsichtlich der Lichterzeugung unterschiedliche Wirkungen.

KCl in einer Konzentration von 6/10 normal ohne Glycerin ruft nach 37 Stunden ein Leuchtoptimum hervor, das nach einem leichten Rückgange in der Folge beibehalten wird. Es ist aber viel kleiner, als es bei NaCl in einer Konzentration von 3/10 normal nach 48 Stunden erreicht wird. Zur Erreichung eines raschen Leuchtanstieges braucht man bei Anwendung von KCl an Stelle des NaCl eine weit höhere Konzentration.

Die Beigabe von Glycerin in diesen KCl-Versuchsreihen läßt diese Verschiebung in den Bereich höherer Konzentrationen besonders deutlich hervortreten. Nach 48 Stunden wird ein sehr hoch liegendes Optimum des Leuchtens bei 6/10 n. KCl erreicht, dem sich die Leuchtstärke der Probe mit 5/10 n. KCl sehr nähert.

Das KBr wirkt in den ersten 35 Stunden des Wachstums auf das Leuchten in Mengen von 5/10 bis 6/10 normal außerordentlich stimulierend, denn nach dieser Zeit ist bereits das Leuchtoptimum bei letzter Konzentration erreicht.

Die Wirkung dieser optimalen Mengen bremst ein Glycerinzusatz in den ersten Züchtungszeiten, was besonders für 5/10 normal zum Ausdruck kommt. In den folgenden Wachstumszeiten fördert das Glycerin die Lichtbildung.

Die K-Reihenversuche zeigen ebenfalls eine verschiedene Einflußnahme der beiden Anionen auf die Lichterzeugung bei den verschiedenen Salzmengen.

Die versuchten Kaliumsalze zeigen die bessere Wirkung auf das Leuchten in höheren Konzentrationen von 5/10—6/10 normal.

Das Kation  $K^+$  beeinflusst den Leuchtprozeß anders als  $Na^+$ , weshalb es auch letzteres nicht vollwertig isotonisch dabei zu vertreten vermag.

KCl und KBr bewirken eine Neigung zur Verklebung der Mikrobenzellen in den Kulturen, besonders bei stärkeren Konzentrationen, während diese Erscheinung in den Na-Kulturen nur bei großem Salzreichtum eintritt.

Wegen dieser Verklebungserscheinungen sind die Trübungsmessungen nur mit Vorsicht zur Bestimmung der Vermehrung verwendbar.

Es scheint das stärkere Leuchten keineswegs immer mit einer größeren Zellvermehrung zusammenzuhängen und umgekehrt trotz zunehmender Trübung die Lichterzeugung nicht nur nicht zu steigen, sondern bei höheren Konzentrationen sogar zu fallen.

#### Tafelerklärung.

- Fig. 1. Hängender Tropfen, hergestellt in 0.3 n. NaCl-Lösung mit einer 24stündigen Agarkultur bei 18° C, mit JJK-Lösung behandelt. 1300fach vergr.
- Fig. 2. 36stündige Oberflächenkolonie auf Fischgelatine. 30fach vergr.
- Fig. 3. Ausstrich der Aufschwemmung in 0.3 n. NaCl-Lösung einer 24stündigen Fischagarkultur, bei 18° C gezüchtet. Färbung mit wässriger Methylenblaulösung. 1300fach vergr.
- Fig. 4. Ausstrich wie Fig. 3, jedoch mit verdünnter Karbolfuchsinlösung gefärbt. 1300fach vergr.
- Fig. 5. Klatschpräparat einer 72stündigen Oberflächenkolonie von einer neutralen Fischgelatineplatte, mit wässriger Methylenblaulösung tingiert. 1300fach vergr.
- Fig. 6. Ausstrich von einer Gelatineplatten-Oberflächenkolonie nach 48stündigem Wachstum bei 16° C. Methylenblaufärbung. 1300fach vergr.
- Fig. 7 u. 8. Ausstriche einer 20stündigen Fischagarkultur, bei 12° C gezüchtet.  $\frac{1}{8}$  Karbolfuchsinfärbung nach Fixierung in Osmiumsäuredämpfen. 750fach vergr.
- Fig. 9. Innenstrukturen des Photobacillus radians. Nach Ausstrichpräparaten gezeichnet, die einer Aufschwemmung in 0.3 n. NaCl-Lösung entstammen. Färbung mit Methylenblau. Zirka 3000fach vergr.
- Fig. 10. Positiv einer Schwärzungsreihe von den Kulturen mit verschiedenem NaCl-Gehalt, oben ohne und unten mit einem Glycerinzusatz. Die Zahlen geben die Kulturnummern in der Reihe und den Zehntelnormalgehalt von Salz an.