

(Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege Dresden.)

## Über Beziehungen oxydierender Stoffe in Bakterien und Hefen zu den zelligen Oxydasen.

Von

Dr. Walter Loele.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. November 1927.)

1902 veröffentlichten *Dietrich* und *Liebermeister* (B. C. I. 19) die ersten Mitteilungen über Vorkommen sauerstoffübertragender Körnchen in Bakterien. Sie fanden, daß in Milzbrandbacillen, wenn dem hängenden Tropfen etwas Dimethylparaphenylendiamin und  $\alpha$ -Naphthol-lösung zugesetzt wurde, eine Blaufärbung einzelner Granula auftrat. Die gleichen Körnchen waren vorhanden in Diphtheriebacillen, in *Bacterium typhi*, *coli*, *pyocyaneum*, *megatherium*, in Cholerabacillen und in jungen Tuberkelbacillen. Dagegen war die Reaktion negativ bei den anaeroben Bakterien des malignen Odems und Rauschbrandes, bei *Bacterium vulgare* (*Proteus*) und *prodigiosum*.

Die Körnchen gaben die Oxydationsreaktion nach Erhitzen auf 100°, nach Behandlung mit Säuren, Laugen, Verdauungsfermenten und fettlösenden Reagentien; mit Lösungen von Jodkali färbten sie sich gelb, in wässrigen Hämatoxylinlösungen violett, mit Sudan rosa, mit Osmium gaben sie keine Reaktion. Die Körnchen stimmten überein z. T. mit den *Babes-Ernstschen*, z. T. mit den *Bungeschen* säurefesten Körnchen. Das Auftreten der Körnchen war abhängig von der Beschaffenheit des Nährbodens, vom Alter der Kultur und von äußeren Bedingungen (Zufuhr von Luftsauerstoff).

Die Verfasser vermuten Verwandtschaft der Körnchen zu den Nucleinen. Später hat *Dietrich* (Zentralbl. f. Pathol. 1908) die oxydierende Eigenschaft der Körnchen abgelehnt. Im Jahre 1909 nahm *Eisenberg* (B. C. I. 48) die gleichen Untersuchungen vor. Im Gegensatz zu *Dietrich* und *Liebermeister* fand er, daß zwar in Milzbrandbacillen die sauerstoffübertragenden Körnchen vorhanden waren, nicht aber in den anderen Bakterien, sie fanden sich dagegen in *Spirillum undula*, wo sie indessen durch Fettlösungsmittel zerstört wurden, in *Spirillum volutans* und in *Bacterium tumescens* (*Zopf*).

*Eisenberg* nimmt zwar auch eine katalytische Beschleunigung der Oxydation an, legt aber größeren Wert auf die Farbstoffbindung, die auf eine Besonderheit des färbbaren Substrates hindeute. *Eisenberg* betrachtet, wie *Dietrich* und *Liebermeister*, den Farbstoff als wasserunlösliches Naphtholblau (im Gegensatz zu der jetzigen Ansicht, wonach der blaue Farbstoff Indophenolblau ist), das zum Protoplasma der Bakterien keine Verwandtschaft besitzt, wohl aber wahrscheinlich eine Lösungsaaffinität zu den Granula. Nach *Eisenstein* stimmen die Körnchen überein mit den durch *Meyer* (B. C. I. 34) und *Preisz* (B. C. I. 35) in Bakterien festgestellten Reservekörnchen von Fett. Hierfür sollen sprechen die Färbbarkeit mit Fettfarbstoffen, die Fähigkeit Jod und Naphthol und Pikrinsäure zu speichern, die dann wie Beizen wirken. (Nach *Eisenstein* stellen die in älteren Milzbrandkulturen sich vorfindenden Kugelformen, die zahlreiche derartige Körnchen enthalten, Fettmastbacillen vor.) Es ist indessen nicht ausgeschlossen, daß mit dem Fett Eiweißbestandteile verbunden sind. *Eisenberg* fand im Gegensatz zu *Dietrich* und *Liebermeister* keine Violettfärbung der Körnchen in Hämatoxylinlösung.

Die nächsten Arbeiten aus den Jahren 1910 und 1912 stammen von *W. H. Schultze* (B. C. I. 56) und unter seiner Leitung von *Kramer* (B. C. I. 62). *W. H. Schultze* führte eine neue Methode ein, indem er die Bakterien auf einer Agarplatte ausstrich, der das Nadigemisch, wie von *Gräff* der Kürze halber die Mischung der Indophenolblauoxydasereagenzien bezeichnet wird, zugesetzt wird. *Kramer* hat mit dieser Methode zahlreiche Mikroorganismen untersucht und folgendes festgestellt:

Negativ waren sämtliche Kokken (nicht untersucht sind die gram-negativen Kokken). Die Bakterien verhalten sich verschieden. *Kramer* bestätigt die Angaben von *Dietrich* und *Liebermeister* gegenüber *Eisenberg*, wonach Diphtherie-, Typhus-, Coli-, Pyocyanus-, Cholera-, Megatherium- und Tuberkelbacillen positive Nadi-Reaktion geben, während *Bacterium proteus* und anaerobe Bacillen negativ sind. Negativ sind ferner die Influenzabacillen, die Friedländer-Bacillen, die Dysenteriebacillen, die Paratyphusbacillen, das *Bacterium vitulinum*, *violaceum* und *vulgare*. Die aeroben sporenhaltigen Bacillen sind positiv, die Vibrionen positiv mit Ausnahme von *Vibrio proteus*.

*Spirillum rubrum* war negativ, *undula* positiv, Hefen waren positiv, weiter fand *Kramer*, daß die Granula bereits durch Erhitzen auf 60° dann zerstört werden, wenn die Erhitzung 24 Stunden anhielt. Auch durch konzentrierte Salzsäure wurden nach 24 Stunden die Stoffe völlig zerstört.

Nach *Kramer* handelt es sich bei den Körnchen nicht um Fett, sondern um phenolasehaltige Stoffe noch unbekannter Natur. Er stützt sich bei dieser Anschauung auf die bekannten Arbeiten von *F. Winkler* und *W. H. Schultze* über Indophenolblauoxydasen in tierischen Zellen.

Weitere wichtige Feststellungen verdanken wir *Brandt* (B. C. I. 72). Um irreführende Niederschläge gänzlich zu vermeiden, die beim Zu-

sammenbringen des Nadigemisches leicht entstehen, ließ *Brandt* auf den Vorschlag *v. Gierkes* die Dämpfe der Nadireagentien auf Kulturen in Petrischalen oder den hängenden Tropfen einwirken und konnte die Erfahrungen von *Kramer* über Vorkommen oxydierender Bakterienfermente bestätigen.

Aus der Tatsache, daß die Körnchen durch längeres Erhitzen ihre Oxydasen einbüßen, aber sich noch mit einer alkoholischen Indophenolblaulösung färben lassen, schließt *Brandt*, daß es sich um oxydasehaltige Lipoide handle. Auch den Nachweis, daß die Körnchen selbst der Ort der Oxydationsreaktion sind, konnte *Brandt* erbringen. Er zeigte, daß in der Umgebung der Körnchen reduziertes Methylenblau zum Farbstoffe oxydierte (Unnas Rongalitweißreaktion).

Eine Ergänzung zu diesen Arbeiten bilden Beobachtungen an Hefen mit der Indophenolblausynthese und verwandten Reaktionen.

Bereits 1886 fand *Wurster* (Chem. Berichte 29, 318) eine Blaufärbung von Hefe durch Tetramethyl-Paraphenylendiamin. Die älteren Arbeiten über Oxydasereaktionen der Hefe hat *Kohl* in seinem Buche „Die Hefepilze“ (Leipzig: Quelle u. Meyer 1908) zusammengestellt. Von späteren Arbeiten sind außer den bereits erwähnten Untersuchungen von *Schulte* und *Kramer* wichtig die Arbeiten von *Harden* und *Zilva* (Biochem. journ. 1914, S. 217). Diese nehmen bei Hefen das Vorhandensein von Peroxydasen an, weil sie bei Behandlung mit Paraphenylendiamin und  $H_2O_2$  eine Violettfärbung der Keime erhielten. *A. Bach* (Fermentforschung 1916, S. 197) bestreitet das Vorkommen von Peroxydasen und erklärt das Zustandekommen der Reaktion mit der Anwesenheit kolloider Massen, die das Oxydationsprodukt des Paraphenylendiamin leicht adsorbieren und dadurch den Oxydationsakt beschleunigen.

#### *Eigene Untersuchungen.*

Die Oxydationsreaktion wurde zunächst angestellt mit Paraphenylendiamin allein (Base), in Wasser gelöst und stark verdünnt oder in Substanz (Methode von *v. Gierke-Brandt*). Die Lösung hat den Vorteil, daß sie an der Luft nur langsam oxydiert, so daß sie noch fast ungefärbt erscheint, wenn die damit übergossenen Bakterien bereits gefärbt sind.  $H_2O_2$ -Zusatz ist nicht notwendig, beschleunigt aber den Oxydationsvorgang. Man kann durch Gießen von Paraphenylendiaminlösung auf mit Rachenabstrichen beimpfte bebrütete Serumplatten sehr schnell feststellen, ob *Diplococcus catarrhalis* vorhanden ist (5%), da außer diesem Keim fast nur Hefen sich dunkelbraun färben. Streptokokken\*, Staphylokokken und Diphtheriebacillen waren immer negativ. Wie *Diplococcus catarrhalis* verhalten sich Meningokokken (Stamm aus dem Reichsgesundheitsamt) und Gonokokken. Hefen geben wie die Kokken

\* Auf Blutplatten zeigen die Streptokokken (*haemolyticus*) einen stark braunen Hof bei Einwirkung der Gase, waren auch zum Teil selbst diffus verfärbt; auf Serumplatten bräunt sich der Nährboden im Gegensatz zu Staphylokokken, die die Oxydation verhindern.

meist nur eine diffuse Braunfärbung. Langsamer erfolgt die Braunfärbung nach der Methode von *Brandt* im Brutschrank.

Es ist indessen nicht gleich, ob Paraphenylendiamin allein oder mit  $H_2O_2$  genommen wird, Paraphenylendiamin ist z. B. ein bekanntes Reagens, (*Storch*) um in der Milch die kochempfindlichen Peroxydasen nachzuweisen. Man erhält ohne  $H_2O_2$ -Zusatz keine guten Reaktionen, auch nach längerem Stehen nicht, während bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  sofort eine bläuliche Verfärbung der Milch eintritt. Auch pflanzliche Auszüge geben oft nur bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  starke Indophenolblaureaktion. *König* (Ziegler, Beitr. 75, 198) fand eine ähnliche Reaktion (positive Peroxydase bei negativer Indophenoloxoxydasereaktion) an dem Abnützungspigment menschlicher Herzen.

Die Anwendung von Paraphenylendiamin allein ist zur Schnellorientierung geeignet, da meist diffuse Färbungen eintreten. Brauchbare Körnchenbildung erhielt man erst bei Zusatz von  $\alpha$ -Naphthol. Es ist nicht ganz gleichgültig, ob man das Paraphenylendiamin nimmt oder seine Dimethylverbindung. Dies war besonders charakteristisch, wenn Platten (Traubenzuckeragar) von Oidium lactis, die einige Tage alt waren, mit den drei Reagenzien übergossen wurden und die Platten einige Zeit standen. Die Hefen der Paraphenylendiaminplatte zeigten eine sehr deutliche braune bis violette spärliche Granulierung und teilweise diffuse Färbung.

Auf der Nadiplatte waren die Hefen meist vollgepfropft mit großen und kleinen blauen Kugeln, bei Verwendung des Paraphenylendiamin statt der Dimethylverbindung (der Kürze wegen als Na-PA-Reaktion zu bezeichnen) fanden sich die wiederholt von mir beschriebenen Schlingen und Spiralen. Um bloße Farbstoffausfälle handelt es sich hierbei nicht, denn auch bei anderen Hefen fanden sich die Stäbe und Schlingen nur bei dieser Methode. Ihre Entstehung ist wohl so zu erklären, daß in den lebenden Zellen gewisse Zellstraßen, in denen sich das Plasma anders verhält wie in der Umgebung, durch die Oxydasereaktion durch Fällung fixiert werden. Auf eine solche Stabilisierung von Eiweißstrukturen stößt man ja öfter bei der Untersuchung von Oxydasen. Es sind Fällungen die nur in der lebenden, nicht in der toten Zelle möglich sind, und sie werfen ein Licht auf die Strukturbildung in Zellen überhaupt.

Da manche Oxydasen sowohl durch  $\alpha$ -Naphthol wie durch Alkali gelöst werden (*v. Gierke*) und dem Nachweis entgehen könnten, wendet man am besten beide Methoden an, sowohl die von *Winkler-Schultze* wie die von *v. Gierke-Gräff*. Das Übergießen von Kulturen mit dem Nadigemisch ist besonders zur Orientierung geeignet, der hängende Tropfen, die *Schultzesche Plattenmethode* und die Methode von *Brandt* sind zum Vergleich heranzuziehen. Bei Anwendung dieser Methoden konnte

ebenfalls in den nach der *Gramschen* Methode nicht färbbaren Kokken eine „Oxydase“ nachgewiesen werden. *Bacterium Friedländer* war immer negativ, dagegen fanden sich nur diffuse Oxydationsreaktionen gelegentlich, wenn auch nicht gleichmäßig in allen Gliedern der *Typhus-Coli*-Ruhrguppe, *Diphtheriebacillen* gaben in hängenden Tropfen vereinzelt die Oxydasereaktion (Körnchen). Die Zusammensetzung des Nährbodens ist demnach, wie schon *Dietrich* und *Liebermeister* fanden, nicht gleichgültig. Im *Bacterium Metschnikoff*, das auf Glykollagar gezüchtet nur Kugelformen (A-Formen von *Kuhn*) zeigte, waren nach dem Übergießen der Kultur mit den Indophenolblau-reagentien manche Kugeln mit blauen großen Körnern vollgestopft und glichen den Fettmastbazillen *Eisenbergs*. Der schleimige Charakter der Kultur deutet darauf hin, daß es sich eher um verschleimende Granula handelt als um Fett.

Zahlreiche Untersuchungen habe ich mit sehr wechselnden Ergebnissen in den letzten 6 Jahren mit Hefen angestellt, die besonders deshalb Beachtung verdienken, weil hier Oxydationsreaktionen mit Benzidin gelangen. Die Benzidinreaktion mit  $H_2O_2$ , also eine Peroxydase-reaktion, ist an menschlichen Leukozyten von *Fischel* zuerst mit alkoholischen, von mir mit wäßrigen Benzidinlösungen vorgenommen worden. Ich habe dann ein größeres tierisches Material (Virch. Arch. 261) untersucht und gefunden, daß die Benzidinperoxydasen nicht mit den  $\alpha$ -Naphtolperoxydasen übereinstimmen, aber meist mit ihnen verbunden sind, und daß beide sich in vielen Fällen aus einem gemeinschaftlichen Oxydasekomplex abspalten. Bakterien enthalten, soweit bisher festgestellt, keine Stoffe, die sich mit den Benzidinfarben darstellen lassen, wenigstens nicht in Kulturen, dagegen geben sie manchmal Reaktionen in eitrigen Sekreten. Hier liegt die Möglichkeit vor, daß sie die Peroxydasen aus den Eiterzellen aufgenommen haben.

Zur Darstellung der Benzidinperoxydase löst man das Benzidin (Base) durch kräftiges Schütteln mit Wasser, worin es nur wenig löslich ist, filtriert die Lösung und setzt auf 9 Teile Filtrat 1 Teil einer 1 proz.  $H_2O_2$ -Lösung zu. Mit dieser Flüssigkeit übergießt man die Kultur oder Objektträgerausstriche.

Wenn überhaupt Farbreaktionen auftreten, so kann man 3 verschiedene Bilder nach Behandlung der Hefe mit dem Peroxydasereagens unterscheiden:

1. Das Braunbild, 2. das Buntbild, 3. das Rotbild.

Der Ausfall der Reaktion hängt zum Teil vom Alter der Kultur ab, wie der folgende Versuch zeigt.

Es wurden gleichzeitig verschieden alte Hefekulturen (aus Käse gezüchtete *Torula*-art) mit der Benzidinlösung übergossen (Agar-, Traubenzucker, Schrägröhrchen). Durch Schütteln wurden die Hefen gleichmäßig verteilt. Nach 10 Minuten wurde die Färbung festgestellt.

Alter der Kultur	Färbung
2 Tage . . . . .	keine Färbung
6 " . . . . .	blaß grünblau
13 " . . . . .	himmelblau
16 " . . . . .	bräunlich
17 " . . . . .	grünlich
20 " . . . . .	bräunlich violett
27 " . . . . .	grünbraun
28 " . . . . .	braunviolett.

Nach 24 Stunden haben sich alle Hefen zu Boden gesetzt und, soweit sie gefärbt sind, haben sie eine ockergelbe Farbe angenommen. In Ausstrichen findet man dann nur diffuse Färbungen. Auch an jungen Kulturen erhält man Farbreaktionen, wenn man die Benzidinlösung auf angetrockneten Hefeausstrichen auf dem Objektträger langsam verdunsten läßt, wobei allerdings die durch Luftoxydation gebildeten Farbstoffe adsorbiert werden und nicht die Oxydation in der Hefezelle selbst stattfinden dürfte. Betrachtet man die Hefe unmittelbar nach Eintritt der Färbung, so bietet sich dem Auge oft ein außerordentlich buntes Bild. In oder an der Wand der Vakuole, die meist nur in Einzahl vorhanden ist, liegt ein gelbes, rotes oder grünes Korn, das zackige oder spangenartige Formen annimmt, manchmal wie bei einer Kernteilung in zwei sich gegenüber stehende Teile zerfällt. Das der Vakuole entsprechende Mittelfeld der Hefe erscheint oft blau. In der Umgebung der Vakuole treten zahlreiche meist kleine Körner auf von gelber, roter und grüner und blauer Farbe. Die blaue Farbe herrscht besonders bei den großen Hefeformen vor, die gelbe bei den kleinen.

Diese Bilder traten dann leicht auf, wenn die Hefe besonders viel Katalase enthielt. Bei der Behandlung von Hefeausstrichen auf Objektträgern gelang es einige Male reine Rotbilder zu erhalten, die eine äußerst regelmäßige Zeichnung darboten, während bei den Buntbildern alle möglichen Formen gefärbter Körnchen vorhanden waren. Es waren dann 3 Formen besonders auffallend.

1. In oder an der Vakuole tritt ein Körnchen auf, das diphtherie-bacillenartig auswächst oder sich in 2—3 Körnchen teilt.

2. Das Korn vergrößert sich, und es treten kleine Granula außerhalb der Vakuole auf.

3. Das Korn tritt aus der Vakuole, es bilden sich eine Anzahl kleiner Vakuolen, die größere Körner enthalten. Alle Körner zeigen die gleiche rote Farbe, die etwa einer Färbung mit Neutralrot gleicht. Die Ursache der Rotfärbung liegt vermutlich darin, daß die Peroxydasen mit phenolartigen Chromogenen verbunden sind, die den Benzidinfarbstoff beeinflussen.

Die Wand der Vakuole ist manchmal mit Sudan rot oder gelbrot färbbar, mit Indophenolblau violett, mit Benzidin gelb, es verhält sich

die Vakuolenwand demnach wie Fett, doch läßt sich das Fett nicht durch Alkohol, Xylol und Äther ausziehen. Mit Carbolfuchsin-Schwefelsäure behandelt, ist die Wand bisweilen säurefest.

Den Benzidinbildern sind durchaus nicht gleich die Bilder, die man mit der Indophenolblaureaktion erhält. Wurde statt der Dimethylverbindung Paraphenylendiamin mit  $\alpha$ -Naphthol verwendet, so konnte häufig eigenartige dorn- und spiralförmige Bildungen beobachtet werden, besonders schön, wenn man das Gemisch von Naphthol und Paraphenylendiamin längere Zeit einwirken ließ. (Vgl. Virchows Archiv, 265, 839, Abb. 4.)

Es waren an Hefen folgende Formen oxydierender Stoffe festzustellen:

1. Diffuse Färbung der Hefezellen,
2. Oxydationsort ist übereinstimmend mit einer Hefestruktur,
  - a) mit der Vakuolenwand,
  - b) mit dem Kern von *Möller, Kohl, Henneberg, Zettnow* u. a.,
  - c) mit dem Nucleolus von *Schuhmacher*,
  - d) mit Volutinkörnern (Nucleinsäurekörner von *Schuhmacher*).
3. Der Oxydationsort erscheint als Granulum ohne Beziehung zu einer der genannten Strukturen,
  - a) als einzelne Körnchen in der Vakuole am Vakuolenrand oder im „Kern“,
  - b) als gleichmäßige Granulierung,
  - c) als Diplokokkus, ferner Hantel, Nagel und Spiralfaden (z. T. gleich mit 1b—d).

Durch Vergleichsfärbungen läßt sich meist feststellen, an welche Struktur die Oxydationsreaktion gebunden ist. Struktur und Oxydationsbild entsprechen sich manchmal außerordentlich, z. B. das Bild der Volutinkörnchen oder das Kernkörperchenbild nach *Schuhmacher*, aber vielfach fehlt das Oxydationsbild, trotzdem die erwähnten Strukturen leicht nachweisbar sind. Diese Beobachtungen stimmen ganz zu den Erfahrungen, die man auch mit Bakterien gemacht hat. Die Erklärung liegt darin, daß die Substanzen die Oxydationsreaktionen geben, keine reine Stoffe sind, sondern Gemische von Lipoiden mit Phenolaten und anderen Stoffen, darunter gelegentlich auch Nucleinen, wie *Dietrich* und *Liebermeister* vermutet haben. Das Auftreten der oxydierenden Stoffe hängt von verschiedenen Einflüssen ab, von der Art der Keime, von der Beschaffenheit des Nährbodens, vom Alter der Kultur, von der Lebenstätigkeit der Keime und von äußeren Einflüssen.

Es sind also ähnliche Verhältnisse wie bei den tierischen und pflanzlichen Zellen und es ist schon deshalb notwendig, diese mit den bakteriellen zu vergleichen, weil in den Zellen des tierischen und des pflanzlichen Zellstaates infolge einer stärkeren Differenzierung die Verhältnisse etwas klarer liegen, als in den einzelligen Bakterien.

Die wichtigsten Feststellungen bei Bakterien sind noch einmal kurz zusammengefaßt die folgenden:

1. Die oxydierenden Stoffe sind an verschiedenartige, häufig lipoide Strukturen gebunden.
2. Manche Bakterien bilden auch bei Anwesenheit von Sauerstoff niemals oxydierende Substanzen, manche immer, manche sind bald positiv, bald negativ.
3. Ohne Sauerstoff bilden sich keine oxydierenden Stoffe.

Hieraus ergibt sich, daß die Oxydasen unter besonderen Bedingungen an Stoffe verschiedener Natur gebunden werden und daß eine dieser Bedingungen die Anwesenheit von Sauerstoff ist.

Welche Rolle spielt nun der Sauerstoff und welche Bedeutung haben die Oxydasen?

Durch die Untersuchungen von *Gräff* und *Katsunuma* ist es sehr wahrscheinlich, daß der positive Ausfall der Indophenolblaureaktion in tierischen Zellen parallel dem Eisengehalt geht, so daß vielleicht die Reaktion als eine katalytische Oxydationsbeschleunigung aufzufassen wäre, die auf der Anwesenheit von (gebundenen) Eisen beruht.

Angaben über Beziehung zwischen Eisengehalt der Bakterien und Oxydasegehalt konnte ich nicht finden.

Durch eigene Untersuchungen konnte ich feststellen, daß wenigstens bei Hefen dann die Oxydasegranula besonders groß waren und eine starke Blaufärbung bei Anwendung der Indophenolblaureaktion zeigten, wenn dem Nährboden Eisensalze zugesetzt waren in Mengen, die das Bakterienwachstum nicht schädigten. Das Wachstum des oxydasehaltigen *Micrococcus catarrhalis* wurde durch Eisenzusatz begünstigt, das des oxydasefreien *Staphylococcus* gehemmt. Vielleicht besteht hier ein Zusammenhang zwischen Oxydasegehalt und Eisenbindung.

Es ist zunächst nicht wahrscheinlich, daß der Sauerstoff selbst zum Aufbau der Oxydase notwendig ist, etwa durch Umformung in ein organisches Peroxyd. Näher liegt der Gedanke, daß der Sauerstoff mittelbar notwendig ist, indem er zur Oxydation der Stoffe dient, die die Bindung des Eisens bewirken. In dieser Weise wirkt der Sauerstoff bei der Bindung von Eisen an eosinophile Granula menschlicher Leukozyten. Diese Granula lassen sich dann mit Eisenhämatoxylin färben, wenn man sie vorher mit Phenolen behandelt hat und durch die Einwirkung der Oxydase oder Peroxydase das Phenol in einen Farbstoff oxydiert ist, der, von den Granula angenommen, nunmehr als Beize das Eisenhämatoxylin bindet. Diese Bindung des Eisens ist ohne Anwesenheit von Sauerstoff nicht möglich. Vorausgesetzt, daß die Oxydasereaktion der Bakterien eine Eisenreaktion ist, könnte man sich vorstellen, daß die Eisenbindung auf ähnliche Weise stattfindet.

Weiter ist es möglich, daß bei der Oxydasebindung, auch ohne das

Eisen beteiligt zu sein braucht, Sauerstoff vorhanden sein muß, auch hierbei könnten Chromogene sich beteiligen.

Auf die Rolle der Oxydasen fällt ein Licht, wenn man die Erfahrungen berücksichtigt, die man an tierischen und pflanzlichen oxydierenden Stoffen macht.

Im Gegensatz zu den Bakterien gibt es hier eine größere Zahl von Phenoloxydases und Peroxydasen, von denen die nachstehende Reihe bis zu einem gewissen Grade Gesetzmäßigkeiten zeigt.

Naphtoloxydase, Naphtolperoxydase, Benzidinperoxydase, Indophenolblauoxydase, (Indophenolblauperoxydase).

In dieser Reihenfolge enthält meist die vorhergehende Oxydase auch das folgende Ferment und bei Zersetzung der Oxydase geht diese in der gleichen Folge vor sich, d. h. es verschwindet zunächst die vorhergehende oxydierende Substanz. Treten in sonst negativen Zellen Oxydasen auf, dann ist die Reihenfolge umgekehrt.

Daß dieser Reihenfolge eine Gesetzmäßigkeit zugrunde liegt, dafür spricht vor allem das Verhalten entsprechender Zellen z. B. das Verhalten gleichartiger Blutzellen. So gibt es Leukocyten, deren Granula immer negativ sind, solche die nur die Indophenolblaureaktion geben, Leukocyten mit positiver Benzidinreaktion, aber negativer Naphtolreaktion. Zellen mit positiver Naphtol-, Peroxydase-, aber negativer Oxydasereaktion und endlich granulierte Leukocyten, die alle Reaktionen geben.

Die Aufgabe der Blutzellen dürfte aber überall annähernd die gleiche sein. Man vergleiche die Peroxydaseblutbilder zweier so weit auseinanderstehender Geschöpfe wie Mensch und Salamander (Abb. 1 u. 2) und man erkennt das gleiche morphologische und chemische Grundgesetz in der Bildung der verschiedenen Formen. Auch das rote Blutkörperchen des Salamanders zeigt Auflösungserscheinungen des Kernes (tropfiger Zerfall des Chromatin). Der Lymphocyt enthält in beiden Blutarten keine Oxydase, die Leukocyten zeigen eine stark und eine schwächer granulierte Form.

Das legt den Gedanken nahe, daß in immer negativen Leukocyten und Lymphocyten nur deshalb die Oxydasen nicht nachweisbar sind, weil Substanzen fehlen, die ihre Zersetzung verhindern. Auch bei gleichartigen Epithelien, besonders von Mollusken findet man Zellen, die entweder immer positiv sind oder nur vorübergehend oder niemals positiv sind. Weiter läßt sich feststellen, daß manche Zellen dann ihre oxydierenden Stoffe verlieren, wenn sie andere Stoffe, z. B. Pigment, enthalten und daß Zellen, die gewöhnlich keine Oxydasen enthalten, unter pathologischen Bedingungen diese Substanzen bilden. Die Phenoloxydase ist aber im Versuch dann nicht mehr als solche nachweisbar, wenn sie ein zum Farbstoff oxydiertes Phenol oder durch Vermittlung der Phenolchromogene eine basische Verbindung gebunden

hat. Alles das spricht mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Bildung oxydierender Stoffe in allen Zellen möglich ist, daß sie aber nur unter gewissen Bedingungen nachweisbar werden.

Nun findet man weiter, daß Oxydasen, die ein Gemisch verschiedener oxydierender Fermente darstellen, meist noch andere Stoffe enthalten, nämlich Fermente, die zu Lösungs- und Fällungsvorgängen Beziehungen haben, und weiter farbstoffbildende Stoffe, und daß diese vielseitig zusammengesetzten Körper wahrscheinlich sehr innige Beziehung zu den Nucleolen besitzen und zwar besonders zu dem Anteil der Nucleolen, der

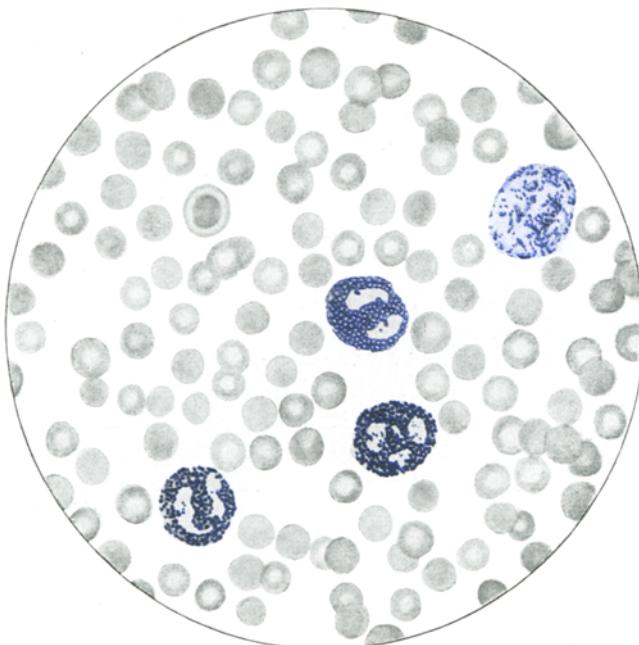


Abb. 1. Menschenblut. Kerne und rote Blutkörperchen im Original rot. Härtung des lufttrockenen Ausstriches mit 80 proz. Alkohol. Färbung: Naphtolgentianaviolett,  $\alpha$  Naphtollösung mit  $H_2O_2$ -Alkohol. Nachfärbung mit verdünntem Carbolfuchsin (Vichows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 261, S. 886, 1926). 1 Monocyt, 1 eosinophiler, 2 neutrophile Leukocyten und 1 Lymphocyt.

sich mit der sekundären Naphtolreaktion darstellen läßt. Gibt es bei Bakterien Nucleolarsubstanzen, die sich mit der sekundären Naphtolmethode darstellen lassen, so spricht das für die Möglichkeit, daß auch in Bakterien ähnlich Sammelkomplexe vorkommen wie in Zellen und dafür, daß Oxydasen von Bakterien, Tieren und Pflanzen von gemeinschaftlichen Gesichtspunkten zu betrachten sind. Die sekundäre Naphtolreaktion an Bakterien anzustellen, ist wegen der Empfindlichkeit primärer und sekundärer Naphtolxydasen nicht leicht. Die Nucleolen in Zellen geben meist eine sekundäre Naphtolreaktion erst dann, wenn man Organteile einige Zeit in Formol fixiert hat, andererseits wirkt

Formol auch zerstörend auf die Stoffe ein, so daß es bereits bei dünnen Gewebsschnitten oft sehr schwierig ist die richtige Mitte in der Länge der Fixierung und Beizung zu finden. Die sekundäre Naphtolreaktion von Hefen gelang einige Male, wenn die Hefe in Gelatine eingebettet und längere Zeit in Formol fixiert wurde. Bei den Versuchen wurde 15 proz. Gelatine genommen, wie man sie für Bakterienkulturen gebraucht. Gefrierschnitte davon wurden nach 8—14 Tagen angefertigt und diese bis 24 Stunden der Einwirkung eines Limaxextraktes ausge-

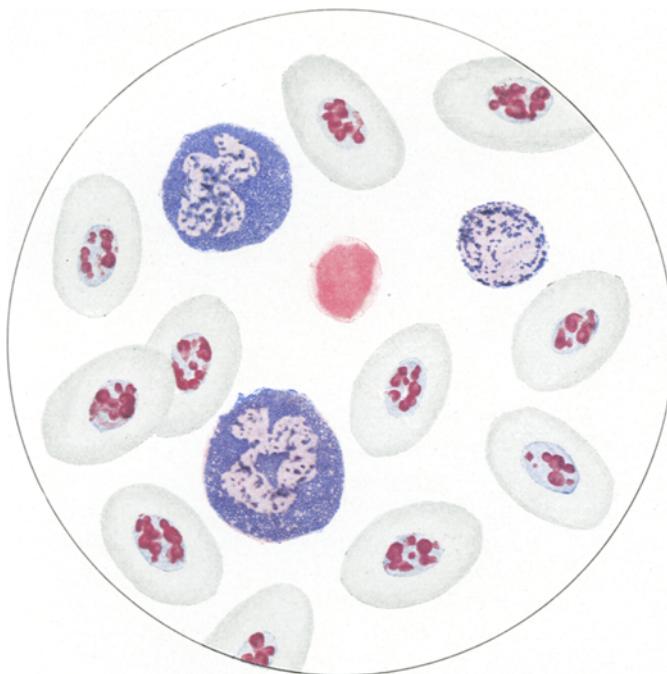


Abb. 2. Die gleiche Färbung, Blut von Salamander, gleiche Vergrößerung.  
1 Monocyt, 2 polymorphkernige Leukocyte, 1 Lymphocyt.

setzt, der in Vergleichsschnitten Zellnucleolen wirksam anbeizte. Die Schwarzfärbung einzelner Strukturen in Hefen trat in alkalischer  $\alpha$ -Naphtollösung nach 6—24 Stunden ein und entsprach den Bildern, wie sie für die primären Hefeoxydasen beschrieben sind. Dieser Befund spricht mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß die sekundären Oxydasen bei Hefen sich nicht viel anders verhalten wie die primären Oxydasen bei Tier und Pflanze, die auch eine gewisse Verwandtschaft zu den sekundären Oxydasen haben, insofern, als bei ihrer Zersetzung sekundäre Oxydasen entstehen, als auch dafür, daß bei Hefen ebenfalls Nucleolarsubstanzen vorhanden sind, die den Nucleolarsubstanzen von Tier und Pflanze entsprechen.

Nun ist allerdings bei Bakterien nur die Indophenoloxidase nachweisbar und Naphtoloxidase, die noch mit anderen Stoffen verbunden sind, fehlen. Das spricht aber nicht gegen die Möglichkeit, daß nicht auch bei Bakterien der gleiche Sammelkomplex vorhanden ist, der sich aus oxydierenden, lytischen und pigmentbildenden Stoffen aufbaut. Bei tierischen und pflanzlichen Zellen sind die Kerne gewöhnlich frei von Oxydasen und doch ist es sehr wahrscheinlich, daß diese auch in der Nucleolarsubstanz des Kernes eingebaut sind. Da Bakterien hauptsächlich aus Kernsubstanzen bestehen, so überwiegt bei ihnen die Kerntätigkeit und die Folge davon muß sein, daß gewisse Stoffe nicht auftreten können, weil die Bedingungen zu ihrer Erhaltung fehlen.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die bakteriellen Oxydasen eine ähnliche Zusammensetzung und Bedeutung haben wie die zelligen wird jedenfalls durch die Ergebnisse der sekundären Naphtolreaktion bei Hefen unterstützt. Es gibt noch einen Befund, der hier herangezogen werden kann. *Dietrich* und *Liebermeister* hatten gefunden, daß die sauerstoffübertragenden Körnchen der Milzbrandbacillus u. a. Bakterien in einer wässrigen Hämatoxylinlösung sich violett färbten. Diese Reaktion ist zwar von *Eisenberg* nicht bestätigt worden, indessen ist das kein Grund an der Richtigkeit der Beobachtung zu zweifeln. Nun kann man an tierischen wie pflanzlichen Oxydasen die Beobachtung machen, daß sowohl die Granula, die die Oxydase tragen, wie Strukturen, an denen zersetzte Oxydase sich mit Vorliebe niederschlagen, wie die Kernkörperchen (besonders bei Pflanzen) manchmal das Hämatoxylin als violetten Farbstoff binden, als ob sie Eisen oder eine andere Base enthielten. Vielleicht beruht diese Färbung tatsächlich auf dem Eisengehalt der Granula der Schwankungen unterworfen ist, so daß einmal die Reaktion positiv, einmal negativ ausfällt.

Jedenfalls vermag diese Erscheinung den Verdacht der Ähnlichkeit bakterieller und zelliger Oxydasen zu stärken.

Es ist dann wahrscheinlich, daß auch bei Bakterien Strukturbildung, Verschleimung, Pigmentbildung und färberisches Verhalten den gleichen Gesetzen unterworfen sind, wie in tierischen und pflanzlichen Zellen. Dann ist auch bei Bakterien nicht das Wesentliche die Zerlegung in morphologische Strukturen, sondern der Aufbau aus quantenmäßig bestimmten ultramikroskopischen Mengen von Chromatin (Erbmasse), Nucleolarsubstanz (Erbferment), Centrosom (Fermentregulator) und Plasma (Nährboden). Die Bildung der mikroskopischen Strukturen wird durch die Gesetze der Kolloidchemie bestimmt, so daß ohne Nachteile für das „Leben“ die mikroskopisch erkennbaren Einzelheiten voneinander wesentlich verschieden sein können; ebenso muß die Möglichkeit vorhanden sein, daß Bakterien im Bau den Gewebszellen außerordentlich ähnlich sind.

Wie es Zellen gibt, die physiologischerweise Schleim bilden, so verschleimen auch manche Bakterien fast auf jedem Nährboden. Manche Zellen wieder, die normalerweise keinen Schleim bilden, verschleimen unter anderen Bedingungen z. B. Epithelien, Bindegewebszelle (Gallertcarcinome). So zeigen auch manche Bakterienkolonien wie *Bacterium coli* nur gelegentlich Schleimwälle oder bilden einen fadenziehenden Überzug wie auf glykokollhaltigem Agar. Besonders neigen die Geißeln der Bakterien zur Verschleimung und gleichen hierin den Flimmerepithelien, deren Geißeln leicht verschleimen. Manchmal werden die Geißeln der Bakterien auffallend starr (*F. Neumann*), wie es auch bei Zellen starre Wimperhaare gibt. Wenn sich am hinteren Ende von Vortizellen Geißeln bilden sind manchmal Verschleimungserscheinungen sehr deutlich. Die Geißeln des vorderen Körperendes lösen sich vorher durch einen Verschleimungsprozeß auf und der Körper schließt sich. Werden die Vortizellen wieder seßhaft, dann lösen sich die Geißeln des hinteren Endes, das in der Zwischenzeit zum vorderen verschlossenen Ende wurde, und die Wimpern bilden sich wieder am Vorderende. Diese bei Schädigung der Vortizellen leicht zu beobachtenden Vorgänge gehen in wenigen Minuten vor sich und zeigen wie schnell sich Geißeln bilden können, wenn eine Anlage vorhanden ist.

Geißeltragende Bakterien sind meist nicht nach der *Gramschen* Methode färbbar, halten sie aber den Farbstoff nach der Jodbehandlung fest, dann haben sie ein ausgesprochenes Ektoplasma.

Wie die Schleimbildung, so ist auch die Pigmentbildung bei Bakterien keine beständige Eigenschaft, sondern die Farbstoffbildung ist außerordentlich schwankend, ohne daß man einen Grund für das verschiedene Verhalten finden kann, bei *bacterium prodigiosum* geht die Farbstoffbildung oft der Schleimbildung parallel, ganz unabhängig voneinander sind diese Vorgänge wahrscheinlich nicht.

Was die Färbung von Bakterien anlangt, war schon darauf hingewiesen, daß nach der *Gramschen* Methode nicht färbbare Kokken Oxydasereaktion geben. Der Zusammenhang könnte darin bestehen, daß die Oxydasen bei den nach der *Gramschen* Methode färbbaren Kokken in die färbbare Substanz eingebaut sind. Bei Bakterien ist der Nachweis, daß Zusammenhänge bestehen zwischen oxydierenden Substanzen, Morphologie, Schleim- und Pigmentbildung viel schwieriger als bei Zellen, wo infolge besserer Differenzierung es in einigen Zellen möglich ist den Zusammenhang nachzuweisen. Da aber Bakterien wie pflanzliche und tierische Zellen Nucleolarsubstanzen abspalten, die ähnliche Eigenschaften besitzen, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch bei ihnen der Nucleolarkomplex in drei Teile zerfällt, in einen farbstoffbildenden, einen oxydaseperoxydasehaltigen Anteil und in einen Teil, der lösende und aufbauende Katalysatoren enthält.