

## Zur Kenntnis und kataphoretischen Bestimmung des isoelektrischen Punktes einiger Bakterien

VON HERMANN KÖLBEL\*

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen und Technischen Hochschule Hannover  
(Z. Naturforschg. 4b, 145—150 [1949]; eingegangen am 9. Juni 1948)

Durch die experimentell gefundene Möglichkeit, die störende Grenzflächenladung der Zellmembran durch Anfärbung mit geeigneten basischen Farbstoffen abzusättigen, gelingt es, den IEP von einzelligen Mikroorganismen ohne Schädigung direkt kataphoretisch zu bestimmen. Durch Verwendung des Fluorochroms Acridinorange ist gleichzeitig die Möglichkeit einer Vitalitätskontrolle<sup>5</sup> gegeben. Es hat sich herausgestellt, daß der IEP lebender Bakterien wesentlich über den bisher mitgeteilten Werten liegt. Der Grund hierfür ergibt sich aus den seither angewandten Bestimmungsmethoden, die in den meisten Fällen zu einer letalen Schädigung des Protoplasten führen. Die damit verbundene Änderung des submikroskopischen Plasmagefüges kommt in einer veränderten Lage des IEP zum Ausdruck. Meine Befunde an der Hefe<sup>3</sup>, die eine Verschiebung des IEP zu niedrigeren Werten beim Zelltod ergaben, konnten auch an Bakterien bestätigt werden. Unterschiedliche Tötungsarten machen sich in der Lage des IEP bemerkbar.

Die Lage des isoelektrischen Punktes (IEP) eines Protoplasten in bezug auf das umgebende  $p_{H}$ -Milieu ist für diesen von außerordentlich großer physiologischer Bedeutung. Eine überschüssige positive bzw. negative Aufladung des Plasmas muß die Zelle zu ganz bestimmten physiologischen Vorgängen führen, andere wiederum ausschließen. Zur weiteren Erforschung dieser Vorgänge erscheint deswegen die genaue Kenntnis der Lage des IEP unerlässlich. So liegt denn auch über die Bestimmung dieses Punktes bereits eine umfangreiche Literatur vor; eine Übersicht hierüber findet sich bei *Yama* und *Ishii*<sup>1</sup>. Die Aufzählung der wichtigsten physikalisch-chemischen und — damit parallel gehend — physiologischen Besonderheiten, durch die der IEP ausgezeichnet ist, und die in Form einer Maximum- und Minimum-Spalte in Tab. 1 wiedergegeben werden, gibt gleichzeitig eine Zusammenstellung der Bestimmungsmethoden (vgl. *Pfeiffer*<sup>2</sup>).

Die so erfolgte experimentelle Bestimmung des IEP stellt großenteils ohne Zweifel einen erheblichen Eingriff dar, welcher eine Schädigung des

Protoplasten, wenn nicht seinen Tod, zur unausbleiblichen Folge hat. Da aber der Tod der Ausdruck einer Destruktion des ursprünglich lebenden Plasmas ist, muß hierdurch zwangsläufig auch eine Änderung in der Lage des IEP erfolgen, da dieser an einen ganz bestimmten strukturellen Zustand des Eiweißkomplexes gebunden ist. Diese Tatsache ist aber bisher wenig oder überhaupt nicht beachtet worden. Bei den Bakterien kamen in erster Linie die Methoden zur Bestimmung des Flockungsmaximums bzw. Dispersitätsminimums und des Adsorptionsminimums sowie die Kataphorese zur Anwendung. Die erstgenannte Methode führt zu einer irreversiblen Schädigung, die zweite gibt nur dann richtige

Im IEP besteht ein:	
Maximum für:	Minimum für:
Oberflächenspannung	Wanderung im elektr. Feld (Kataphorese)
Brechung	Adsorption
Flockung	Viskosität
	Dispersität
	Permeabilität
	Osmotischer Druck
	Wachstum und Keimung
	Pufferwirkung. (Robbins-Effekt)
	Quellung

Tab 1. Physikalisch-chemische Besonderheiten im IEP des Protoplasten.

\* Anshr. d. Verf.: Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel (Bad Oldesloe).

<sup>1</sup> G. *Yama* u. T. *Ishii*, *Protoplasma* 19, 194 [1933].

<sup>2</sup> H. *Pfeiffer* in E. *Abderhalden*, *Handb. biol. Arbeitsmethoden*, Abt. V, Teil 2, S. 1563 [1929].

		Umladungspunkt der ungefärbten Bakterien ( $p_H$ )		Umladungspunkt (IEP) der gefärbten Bakterien			Bisher mitgeteilte Werte für den IEP
		Art der Vorbehandlung					
		I Keine Vorbehandlung	II 10Min. 100°C	III Keine Vorbehandlung	IV 10Min. 100°C	V In isotonisch. Lösung	VI Verschiedene Vorbehandlung
Lebenszustand (fluoreszenzmikroskopisch) . . . .		tot	tot	tot	tot	lebend	ohne Kontrolle
Gram-negativ	<i>Saccharomyces cerev.</i>	2,6	2,9	3,3	5,0	6,0	3,0 — 3,5; 3,1 — 3,3; 4,65; 4,6 — 4,8; 4,7 — 4,9
	<i>Bact. pullorum</i>	3,4	3,6	5,2	5,5	6,3	—
	<i>Bact. pyocyaneum</i>	2,2	2,5	3,2	3,4	5,2	—
	<i>Bact. coli</i>	2,3	2,6	2,7	3,4	4,7	2,2 — 2,6; 5,0; 13,6 — 13,8 (!)
	<i>Bact. fluorescens</i>	3,4	3,6	4,1	5,4	starke Eigenbewegung	1,8
Gram-positiv	<i>Staphylococc. aureus</i>	3,0	3,0	4,0 — 6,5	keine Umladg.	nicht beobachtbar	2,8; 3,5
	<i>Bac. mesentericus</i>	3,5	3,5	5,4	6,6	"	—
	<i>Bac. subtilis</i>	3,2	3,4	3,4	5,3	"	1,9

Tab. 2. Werte für den Umladungs- bzw. isoelektrischen Punkt von einigen grampositiven und -negativen Bakterien sowie von Hefe als Vergleichsobjekt.

Resultate, wenn sie quantitativ und mit weitgehend ungiftigem Adsorptiv ausgeführt wird; die Kataphorese schließlich, welche die Bakterien am ehesten ohne Schädigung ertragen, ergibt durch die störende negative Aufladung der Membran völlig falsche Werte. Zudem können allein durch die Vorbehandlung lediglich abgestorbene Bakterien zur Untersuchung gelangen, wenn nicht eine exakte Kontrolle des Lebenszustandes erfolgt. Die tabellarische Zusammenstellung der bisher auf diese Weise gefundenen Werte für den IEP der Bakterien, die Yamaha und Ishii<sup>1</sup> geben, spiegelt denn auch deutlich die große Unsicherheit wieder, die durch methodische Mängel und die Nichtbeachtung der dargelegten Verhältnisse hervorgerufen wird. Besonders eindringlich wird diese Unsicherheit bei den Werten für das *Bacterium coli* vor Augen geführt, die numerisch fast die gesamte  $p_H$ -Skala ausmachen (s. Tab. 2, Spalte VI)!

Bei früheren kataphoretischen Untersuchungen an Hefezellen<sup>3,4</sup> konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, die bei der Bestimmung des IEP störende elektronegative Ladung der Membran durch Anfärbung mit geeigneten basischen Farbstoffen (Acridinorange, Neutralrot) weitgehend zu neutralisieren, so daß die Aufladung des Plasmas die

Wanderung im elektrischen Feld bestimmt. Die gleichzeitige Absättigung der Ladung des Plasmas kann, wie gefunden wurde, auch oberhalb seines IEP — wohl aus sterischen Gründen — nicht vollständig erfolgen, so daß hier die negative Restladung die anodische Wanderung der Zellen verursacht. Daß es sich bei dem so gefundenen Umladungspunkt tatsächlich um den IEP des Protoplasten handelt, konnte an der Hefe durch Aufnahme der Speicherkurven von Acridinorange und Neutralrot bestätigt werden. Auf diese Weise war also ein Weg gefunden, den IEP des Protoplasten von individualisierten Zellen kataphoretisch zu bestimmen.

Die gleiche Methodik der Kataphorese im mit Acridinorange angefärbten Zustand kam nun auch bei verschiedenen Bakterien zur Anwendung. Die etwa 16 Stdn. alte Kultur in Hottinger-Nährlösung wurde abzentrifugiert; mit einer Impfnadel wurden aus dem Bodensatz 1—2 Ösen in ein kleines Färberöhrchen übertragen, in welchem sich etwa 0,5 cm<sup>3</sup> Pufferlösung bzw. gepufferte Farbstofflösung (Phosphatpuffer) befand. Die Konzentration der Farbstofflösung betrug  $c = 0,5 \cdot 10^{-3}$  Mol/l und die Verweildauer in der gepufferten Lösung jeweils 2—3 Min. Die toten Bakterien wurden erhalten, indem der Bodensatz der lebenden in dest. Wasser suspendiert, die Suspension 10 Min. im Wasserbad gekocht und neuerlich zentrifugiert wurde. Parallel mit jeder kataphoretischen Untersuchung wurden die gefärbten Bakterien der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle ihres Lebenszustandes unterzogen, die nach Strug-

<sup>3</sup> H. Köbel, Z. Naturforschg. **2b**, 382 [1947].

<sup>4</sup> H. Köbel, Z. Naturforschg. **3b**, 442 [1948].

ger<sup>5,6</sup> unter Beachtung der angegebenen Bedingungen in so einfacher und zuverlässiger Weise möglich ist.

Die Apparatur war dieselbe, wie sie bereits beschrieben wurde<sup>3</sup>, nur mit dem Unterschied, daß die Untersuchungen an Bakterien im Dunkelfeld (Zeißscher Kardioid-Dunkelfeldkondensor) vorgenommen wurden. Die Optik bestand weiterhin aus dem Okular K 20 und dem Leitz-Objektiv 30 X.

Um den Einfluß der Konzentration der Farbstofflösung auf die Höhe der Farbstoffspeicherung

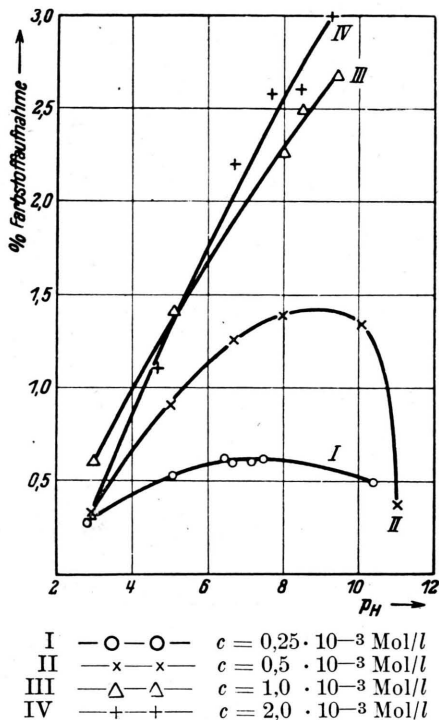


Abb. 1. Speicherung von Acridinorange in Cellulose bei verschiedener Konzentration der Farbstofflösung (0,2 g Verbandwatte in 25 cm<sup>3</sup> Farblösung).

in der Cellulose als Modells substanz für die Zellwand näher zu studieren und damit die experimentell bereits an Stärkekörnchen bewiesene Möglichkeit der elektrischen Absättigung mit Acridinorange-Kationen<sup>3</sup> theoretisch zu unterbauen, wurden die quantitativen Speicherkurven von Acridinorange in Verbandwatte für verschiedene Farbstoffkonzentrationen kolorimetrisch (Leitz-Duboscq-Kolorimeter) vermessen. Abb. 1 zeigt diese Kurven für  $c = 0,25, 0,5, 1,0$  und  $2,0 \cdot 10^{-3}$  Mol/l. Es wurden jeweils 0,2 g Watte in 25 cm<sup>3</sup> gepuffer-

<sup>5</sup> S. Strugger, Jenaische Z. Naturwiss. 73, 97 [1940].

<sup>6</sup> S. Strugger u. P. Hilbrich, Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 121 [1942].

ter Farbstofflösung der angegebenen Konzentrationen 10 Min. lang eingefärbt. Hieraus ergibt sich, daß schon bei einer Konzentration von  $c = 1,0 \cdot 10^{-3}$  Mol/l eine gewisse Sättigung der Speichermöglichkeit eingetreten ist. Diese Kurven scheinen zunächst für die Konzentrationsabhängigkeit der Speichermöglichkeit zu sprechen. Hält man nun aber die gebotene Farbstoffmenge konstant bei ebenso unterschiedlicher Konzentration wie oben, so ergibt sich, wie Abb. 2 zeigt, der

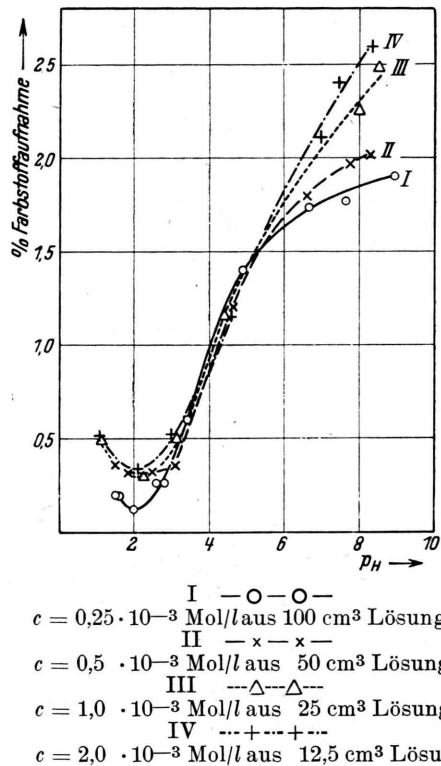


Abb. 2. Speicherung von Acridinorange in Cellulose (0,2 g Verbandwatte) bei konstanter Farbstoffmenge unterschiedlicher Konzentration.

annähernd gleiche Verlauf der Speicherkurven in dem hier interessierenden Bereich. Die Abweichungen voneinander im weiteren Verlauf der Kurven sprechen dafür, daß die Farbstoffmenge für das mit zunehmendem  $p_H$ -Wert gleichfalls steigende Speichervermögen der Cellulose nicht mehr zur Sättigung ausreicht. Überraschend erscheint der Verlauf der Kurven im extrem sauren Gebiet; doch soll dieser hier nur soweit interessieren, als er den Entladungspunkt der Cellulose bei etwa  $p_H 2,0-2,3$  wiedergibt. Durch diese Untersuchungen wird also gezeigt, daß die

Höhe der Farbstoffspeicherung in erster Linie durch das mengenmäßige Verhältnis von Adsorbens und Adsorptiv bestimmt wird und daß die Sättigung der Speichermöglichkeit, die auch gleichzeitig die elektrische Absättigung bedeuten muß, bei Farbstoffüberschuß möglich ist. Die in Abb. 3 dargestellten Kurven über die Abhängigkeit der Speicherung von der Konzentration, bei gleichbleibendem  $p_H$ -Wert, belegen diese Feststellungen. Das zur Sättigung im sauren Gebiet ausreichende mengenmäßige Verhältnis von Cellulose: Farbstoff beträgt etwa 1:0,05. Es läßt sich leicht errechnen, daß unter den oben angegebenen

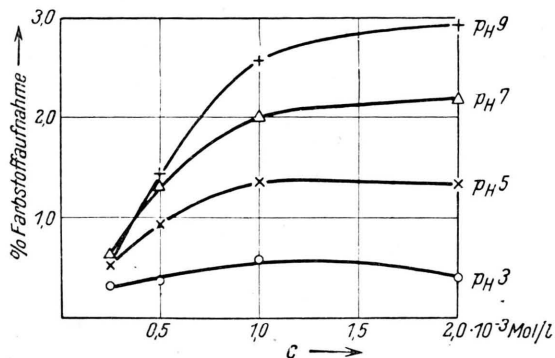


Abb. 3. Abhängigkeit der Acridinorange-Speicherung von der Farbstoffkonzentration (0,2 g Verbandwatte in 25 cm<sup>3</sup> Farblösung) bei gleichbleibendem  $p_H$ -Wert.

Bedingungen zur Einfärbung der Bakterien ein hoher Farbstoffüberschuß und damit die vollständige Sättigung der Membran zumindest im sauren bis neutralen Gebiet gewährleistet ist.

Die gefundenen Werte für den Umladungs- bzw. isoelektrischen Punkt einer Reihe von grampositiven und -negativen Bakterien sowie der Hefe als Vergleichsobjekt sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Fehlergrenze der  $p_H$ -Werte beträgt etwa  $\pm 0,1$  bis 0,2; dabei ist allerdings zu beachten, daß die Werte der Spalten III, IV und V um den gleichen Betrag zu hoch gefunden wurden, da die Umladung durch eine bereits stattgefundenen Farbstoffaufnahme bei höherem  $p_H$ -Wert erfolgt, als der wirklichen Lage des IEP entspricht.

Spalte I gibt die Umladungspunkte für die ungefärbten und nicht vorbehandelten Bakterien wieder, während Spalte II diejenigen verzeichnet, die an hitzgetöteten Bakterien erhalten wurden. Die Spalten III und IV geben die entsprechenden

<sup>7</sup> S. Strugger, Z. Fleisch- u. Milchhyg. 54, 161 [1943/44].

Werte für die gefärbten Bakterien an. Da nach der fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätskontrolle auch die nicht vorbehandelten Bakterien sich als abgestorben (Rotfluoreszenz!) herausstellten, wurden die zunächst mit einfach destilliertem Wasser angesetzten Lösungen mit bidestilliertem hergestellt, um evtl. oligodynamische Wirkungen auszuschließen; aber auch hierin starben die Bakterien, bis sie zur Untersuchung gelangten, ab. Erst nachdem sämtliche Pufferlösungen mit NaCl isotonisch (0,85%) gemacht worden waren, gelang es, die Bakterien, wie ebenfalls die Hefe, längere Zeit am Leben zu erhalten; die Lebensdauer war dabei stark vom  $p_H$ -Wert der Suspension abhängig. Durch den Kochsalz-Zusatz wurde jedoch die Beobachtung der kataphoretischen Wanderung außerordentlich erschwert, da durch Erhöhung der Leitfähigkeit der gepufferten physiologischen NaCl-Farbstofflösung die Bakterien selbst bei Verdoppelung der Stromstärke (10 mA) nur äußerst träge reagierten. Spalte V enthält — soweit beobachtbar — die so gefundenen Werte. Die Vitalitätskontrolle wurde nur bei den gramnegativen Formen vorgenommen, da nach Strugger<sup>7</sup> die stark ausgebildete Membran bei den untersuchten grampositiven eine Unterscheidungsfluorochromierung ohne Gegenfärbung<sup>8</sup> nicht ohne weiteres zuläßt. Spalte IV schließlich verzeichnet die von Yamaha und Ishii<sup>4</sup> zusammengefaßten, von verschiedenen Autoren angegebenen Werte.

Bei Durchsicht der Tabellenwerte für die Hefe finden wir im wesentlichen die früher angegebenen bestätigt<sup>3,4</sup>. Neu hinzu kommen allerdings die Werte der Spalten I, II, III. Die Umladungspunkte in I und II stellen auch für die Bakterien aber sicherlich nicht den IEP des Protoplasten dar. Die Werte dieser beiden Spalten kommen dadurch zustande, daß in diesem  $p_H$ -Bereich die Zellmembran sich ihrem Entladungspunkte nähert und so die hier vorhandene — bis dahin abgeschirmte — positive Aufladung des Plasmas die scheinbare Umladung verursacht. Es handelt sich hier tatsächlich nicht um eine Umladung, sondern lediglich um die nunmehr in Erscheinung tretende Ladung des Plasmas. Auffällig ist, daß sich eine unterschiedliche Vorbehandlung fast durchweg auch auf die Lage dieses „kataphoretischen Umkehrpunktes“ auswirkt. Die Erklärung ist wohl

<sup>8</sup> S. Strugger, Fluoreszenzmikroskopie und Biologie, Verlag Schaper, Hannover 1948.

darin zu suchen, daß die Zellmembran in gewisser Weise vom Plasma durchsetzt ist — wie es neuerdings auch von Höber<sup>9</sup> gefordert wird — und daß der durch verschiedene Vorbehandlung verursachte, unterschiedliche Zustand des Plasmas sich in der Lage des Umkehrpunktes bemerkbar macht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich bei *Staphylococcus aureus* und *Bac. mesentericus* diese Unterschiede wohl wegen der dicken Membran nicht ergeben. In gleicher Weise wie bei Spalte I und II sind nun die Werte in III und IV vergleichbar. Hier handelt es sich jedoch um wirkliche Umladungspunkte, die dem IEP des Protoplasten gleichzusetzen sind. Verschiedene Vorbehandlung führt zu teilweise erheblich voneinander abweichenden Werten, obgleich die Organismen in beiden Fällen „tot“ sind. Das Verhalten von *Staphylococcus aureus* weicht in den Spalten III und IV völlig von dem der übrigen ab, was möglicherweise auch mit dem Membraneffekt in Verbindung gebracht werden könnte. Spalte V, welche die Werte des IEP der lebenden Protoplasten enthält, war bei den grampositiven Bakterien nicht weiterzuführen. Da sie in der physiologischen NaCl-Lösung außerordentlich träge auf das elektrische Feld ansprachen, war keine Entscheidung über die Lage ihres IEP zu treffen. *Bact. fluorescens* war zudem in diesem Falle kein geeignetes Objekt, da die starke Eigenbewegung (in anfänglichem, grünfluoreszierendem Zustand!) die kataphoretische Wanderung überlagerte; merkwürdigerweise zeigte sich bei diesen Bakterien eine bevorzugte Eigenbewegung zur Kathode (Galvanotaxis). Von wesentlicher Bedeutung ist endlich der Umstand, daß der IEP des lebenden Protoplasten in jedem Falle erheblich über demjenigen des toten liegt. Hierdurch wird die schon früher ausgesprochene Vermutung bestätigt, daß die Verschiebung des IEP zum sauren Gebiet eine allgemeine Erscheinung beim Zelltod darstellt<sup>3</sup>. Diese Verschiebung war zunächst durch das unterschiedliche Speicherungsvermögen von lebenden und toten Zellen wahrscheinlich gemacht, da zwischen Speicherung und Aufladung des Protoplasten eine ganz gesetzmäßige Abhängigkeit besteht. Ändert sich die Speicherfähigkeit bei gleichbleibendem  $p_{\text{H}}$ -Wert des ge-

pufferten Außenmediums, so ist das die Folgeerscheinung der veränderten Aufladung, die gleichbedeutend mit der Änderung des IEP ist. Das Speicherungsvermögen erfährt in erster Linie deswegen eine Erhöhung für basische Farbstoffe in abgestorbenen Zellen, weil die Verschiebung des IEP zum sauren Gebiet erfolgt.

Bei intrazellulären Kataphorese-Versuchen stellte schon Hardy<sup>10</sup> fest, daß die zunächst kathodische Wanderung nach längerer Einwirkung des elektrischen Feldes in eine anodische umschlug. Nimmt man an, daß diese Einwirkung schließlich zum Plasmatod führt, so ist im dargelegten Sinn mit einer Ladungsverschiebung zu rechnen und so die Umkehr der kataphoretischen Wanderungsrichtung zu erklären. Auch Versuche von v. Heilbrunn<sup>11</sup> legen die Annahme einer Verschiebung des IEP zu saureren Werten beim Absterben nahe. Doch wurde erst später die grundsätzliche Möglichkeit einer Verschiebung des IEP bei der Abtötung des Plasmas „infolge Denaturation der Eiweißkörper“ ausgesprochen<sup>2,12</sup>. Wenn nun auch bei der Denaturation der Eiweißkörper Änderungen in der Lage des IEP nur um wenige Zehntel des  $p_{\text{H}}$ -Wertes zu beobachten sind, so darf doch nicht außer acht gelassen werden, daß es sich beim lebenden Protoplasma um ein hochkomplex geordnetes Stoffsystem von Eiweißkörpern und den verschiedenartigsten Substanzen handelt; insofern sind also die auftretenden  $p_{\text{H}}$ -Verschiebungen gar nicht vergleichbar. Die Ursache einer derartigen Verschiebung ist jedenfalls im Zerfall des komplexen Systems Protoplasma gegeben, und es ist auch leicht einzusehen, warum verschiedene Tötungsarten zu ganz verschiedenen Werten für den IEP führen müssen. Die durch unterschiedliche Ursachen ebenfalls unterschiedlich geänderte chemische Struktur des verbleibenden desorganisierten Plasmas findet in der verschiedenen Lage des IEP ihren Ausdruck. So haben denn auch Zeiger<sup>13,14</sup> und später Yamaha und Ishii<sup>1</sup> feststellen können, daß sich verschiedenartige Fixierungsmittel auf die Lage des IEP merklich auswirken; am Plasma der Wurzelspitzenzellen von *Vicia Faba* beobachteten die beiden letzteren Autoren bei Fixation mit Chrom-

<sup>12</sup> D. L. Rubinstein u. V. Uspenskaja, *Protoplasma* **21**, 191 [1934].

<sup>13</sup> K. Zeiger, *Z. Zellforsch. mikroskop. Anat.* **10**, 481 [1930].

<sup>14</sup> K. Zeiger, *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn.* **47**, 273 [1930].

<sup>9</sup> R. Höber, *Naturwiss.* **34**, 144 [1947].

<sup>10</sup> W. B. Hardy, *J. Physiology* **47**, 108 [1913].

<sup>11</sup> L. v. Heilbrunn, *The colloid chemistry of Protoplasm*, Gebr. Bornträger, Berlin 1928.



essigsäure einen IEP von 4.7, mit Alkohol einen solchen von 4.2. In diesem Sinne sollen nun auch die Unterschiede der Spalten III und IV bzw. I und II verstanden werden. Die Hitze-fixierung hinterläßt strukturell ein ganz anderes Plasma als der Hypotonie-Tod. Der Hitzetod ist insofern gegenüber anderen Tötungsarten abzugrenzen, als die Einwirkung hoher Temperaturen zu einer momentanen Zerreißen des submikroskopischen Plasmagefüges führt; eine teilweise Wiederherstellung nach dieser Einwirkung durch Wiederverknüpfung von Bindungen, wenn auch meistens nicht zwischen denselben Partnern, ist wahrscheinlich<sup>15</sup>. Der IEP des so veränderten Plasmas kommt deswegen auch dem des lebenden am nächsten. Diese Vorstellung findet noch dadurch eine Erhärtung, daß die Farbstoffspeicherung an Hefezellen, die durch Hitze getötet worden waren, gegenüber denjenigen, die durch verschiedene Gifte zum Absterben kamen, den niedrigsten Wert aufweist<sup>3</sup>.

In einer Arbeit von Nordmeyer<sup>16</sup> wird das Umschlagsgebiet der mit Acridinorange angefärbten, fixierten Bakterien von der Grün- zur Rotfluoreszenz mit ihrem IEP identifiziert. Wegen der Breite dieses Gebietes erscheint diese Methode wenig zu einer genauen Bestimmung geeignet. Außerdem kann sie auch nur bei fixierten gram-

negativen Bakterien zur Anwendung gelangen, da die sekundäre Rotfluoreszenz grampositiver Formen mit stark ausgebildeter Membran den Färbungsumschlag des toten Plasmas nicht erkennen läßt. Es konnte bestätigt werden, daß das  $p_{\text{H}}$ -Gebiet, in welchem eine gleißend kupferrote Färbung auftrat, immer oberhalb des IEP lag. Bei den hitzegetöteten Bakterien trat, in Übereinstimmung mit den obigen Ausführungen, in dem untersuchten Bereich bis  $p_{\text{H}}$  10.0 die intensiv leuchtend rote Fluoreszenzfärbung meistens nicht auf. In der Intensität und Farbnuance (gelbrot) ähnelten diese daher mehr nekrobiotischen Formen, doch lag bei Kenntnis der Vorbehandlung kein Grund zur Verwechslung vor, wie denn auch die Kulturversuche negativ verliefen. Es soll bei dieser Gelegenheit aber darauf hingewiesen werden, daß die bereits vielfach angewandte Struggersche Methode zur Unterscheidungsfluorochromierung lebender und toter Zellen nur demjenigen Forscher zuverlässige Resultate liefert, der sich der physikalisch-chemischen Grundlagen, welche das Zustandekommen des Farbe-Effektes bedingen, ständig bewußt ist (vgl. hierzu auch Krebs<sup>17</sup>).

<sup>15</sup> P. Jordan, Naturwiss. 28, 69 [1940].

<sup>16</sup> N. Nordmeyer, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 152, 54 [1947].

<sup>17</sup> A. Krebs, Naturwiss. 34, 59 [1947].

## Untersuchungen über bakterielle Infektionen bei Kleiderläusen (*Pediculus vestimentis*)

Von FRIEDRICH ALVERDES und RICHARD BIELING

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Marburg (Lahn)  
und der Virusabteilung der Behringwerke, Marburg (Lahn)

(Z. Naturforschg. 4b, 150–157 [1949]; eingegangen am 4. Februar 1949)

Eine Reihe von Bakterien, und zwar auch solche, welche eine ausgesprochene Pathogenität für Menschen oder Säugetiere besitzen, werden dann, wenn sie in den Darm der Laus mit der Nahrung hineingelangen oder direkt eingebracht werden, ohne weiteres wieder ausgeschieden, wobei sie z. Tl. absterben.

Andere Arten von Keimen, wie die im vorliegenden besonders untersuchten „Läusekokken“, sind befähigt, sich einige Zeit im Darmlumen zu halten und sich dort auch zu vermehren. Es fehlt ihnen jedoch die Invasionsfähigkeit; sie dringen nicht in die Darmwandzellen ein und führen lediglich zu einer Lumeninfektion.

Eine weitere Gruppe von Bakterien, und zwar vor allem Coli-, Paratyphus- und Typhusbazillen, haben die Fähigkeit, in die Darmwandzellen der Läuse einzudringen und sich in denselben zu vermehren. Die geschwollenen Zellen werden abgestoßen und weite Strecken der Darmwand dadurch vom Epithel entblößt. Daran gehen die Läuse zugrunde.