Über Farbstoffbildung bei Bakterien.

Vortrag, gehalten in der botanischen Sektion des Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark am 30. Mai 1906

von

Dr. Franz Fuhrmann,

Privatdozent an der Technischen Hochschule zu Graz.

Die Reinkulturen einer großen Anzahl von Bakterien sind durch eine mehr oder weniger intensive Färbung ausgezeichnet. Dabei kann entweder nur der Bakterienrasen gefärbt sein oder es durchdringt der gebildete Farbstoff das ganze Nährsubstrat. Diese Pigmentbildung kann nun bis zu einem gewissen Grade als charakteristisches Merkmal für eine bestimmte Bakterienart gelten. Es bildet nämlich eine Bakterienpezies dann, wenn es zur Farbstoffbildung kommt, zumeist die gleichen Pigmente, wenn deren Farbe auch mannigfachen Variationen unterliegt, die ihre Ursache wohl hauptsächlich in der Reaktion und Zusammensetzung des betreffenden Nährmittels haben. Durch zahlreiche uns noch recht wenig bekannte Bedingungen kann die Farbstoffbildung abgeschwächt oder gänzlich unterdrückt werden oder das ungefärbte Chromogen findet keine Gelegenheit, in die gefärbte Verbindung überzugehen.

Bei den meisten Bakterienarten ist in den Zellen selbst unter dem Mikroskop keine Spur des Farbstoffes zu beobachten. Sie sind völlig farblos und ihre Inhaltsbestandteile unterscheiden sich nur durch stärkere oder geringere Differenzen im Lichtbrechungsvermögen. Wohl aber können wir den gebildeten Farbstoff, sofern er in Wasser nicht löslich ist, bei der Untersuchung im hängenden Tropfen als größere und kleinere Krümmeln und Bröckeln nachweisen, die zwischen den Zellen liegen. Da wir weiter wissen, daß auch beim Mangel einer Pigmentbildung farbstoffproduzierender Mikroben

alle anderen Funktionen des Lebens ungestört ablaufen, wie die Bildung von Toxinen, Fermenten, die Ernährung und Fortpflanzung, so ist die Annahme gerechtfertigt, daß die Farbstoffe in den meisten Fällen als unwichtige oder überflüssige Exkretionsstoffe nach außen entleert werden und keine weitere Bedeutung für das Leben der Zelle besitzen. Unter geeigneten Bedingungen können diese an sich ungefärbt ausgeschiedenen Stoffe außen in gefärbte umgewandelt werden und uns als Bakterienpigmente entgegentreten. Hier könnte man allerdings mit Recht einwenden, daß diese ungefärbten Vorstufen der Bakterienfarbstoffe doch für die Zelle von Wichtigkeit seien und nur als ausgeschiedene färbige Verbindung ihren Wert verloren hätten. Vorderhand vermögen wir dieser Auslegung experimentell nichts entgegen zu halten, weshalb entsprechende Untersuchungen sehr wünschenswert wären.

Nach dem Wert des gebildeten Farbstoffes für die Zelle teilte Beyerinck die chromogenen Bakterien in drei Gruppen ein, für deren Vertreter er die Namen „chromophore“, „chromopare“ und „parachromophore“ Bakterien einführte.

Die Gruppe der chromophoren Mikroben umfaßt alle chromogenen Bakterien, deren Farbstoff eine wesentliche Rolle im Leben der Zelle spielt, also als ein integrierender Zellbestandteil mit dem Protoplasma ungefähr so vereint ist „wie der Chlorophyllfarbstoff mit den Chromatophoren der höheren Pflanzen oder das Haemoglobin mit dem Blutkörperchen“, wie Beyerinck in seiner Abhandlung „Die Lebensgeschichte einer Pigmentbakterie“ schreibt. Hieher gehören die von Ray Lankester, Warming, Cohn, Engelmann und Winogradsky genauer studierten schwefelführenden Purpurbakterien, deren roter Farbstoff, Bakteriopurpurin genannt, diffus den Zelleib durchsetzt. Folgender, von Engelmann mitgeteilter Versuch spricht allerdings sehr für die assimilatorische Tätigkeit des Bakteriopurpurins. Der genannte Autor brachte in einen hängenden Tropfen eine obligat aërobe, gutbewegliche Bakterienart, wie beispielsweise das *Spirillum undula* und dazu noch Purpurbakterien. Im gutgedichteten hängenden Tropfen war der Sauerstoff von den aërophilen Mikroben in

kurzer Zeit verbraucht und sie stellten ihre Bewegung alsbald ein, sobald der Tropfen dunkel gehalten wurde. Ins Licht gebracht, begannen sich die aëroben Bakterien in Kürze zu bewegen und strebten den Zoogloën der Purpurbakterien zu. Es scheint also wirklich im Lichte von letzteren Sauerstoff abgegeben zu werden.

In diese erste Gruppe Beyerincks gehören auch die von Engelmann, van Tieghem und Ewart näher beobachteten grünen Bakterien, deren grüner Farbstoff dem Chlorophyll der höheren Pflanzen nahestehen und auch die Funktion des Bakteriopurpurins ausführen soll. Von einigen Seiten wird die Existenz dieser „grünen Bakterien“ allerdings angezweifelt mit der Motivierung, daß vielleicht nur eine Verwechslung mit Stichococcus vorliegen könnte.

Beyerinck vereint in der ersten Gruppe noch alle jene Gelatine nicht peptonisierenden Bakterien, die einen roten, grünen, gelben oder braunen Farbstoff bilden. Nach Migula geht aber Beyerinck hier zu weit, denn es scheint bei den letztgenannten Bakterienarten dem Farbstoff keine lebenswichtige Rolle zuzukommen.

Dementsprechend gehören diese Formen zur zweiten Gruppe Beyerincks, den „chromoparen Bakterien“, deren Farbstoff für das Leben der Zelle unwesentlich ist und außerhalb derselben als Exkretionsprodukt abgelagert wird und, wenn im Nährmittel löslich, dieses färben kann. Hierher gehören weitaus die meisten Pigmentbakterien, deren Farbstoffe alle Farben des Spektrums und auch schwarz aufweisen und in Bezug auf ihre Löslichkeit in Wasser und fettlösenden Substanzen große Unterschiede zeigen.

Die „parachromophoren Bakterien“ Beyerincks endlich geben ihren Farbstoff teilweise nach außen ab, teilweise deponieren sie ihn in der Zellwand oder lagern ihn dieser an.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß eine scharfe Trennung der chromoparen und parachromophoren Bakterien nicht möglich ist. Die Gruppierung Beyerincks fand auch aus diesem Grunde keinen allzu großen Anhang und Migula hat eine andere Einteilung vorgeschlagen, die auf der Lös-

lichkeit der Bakterienfarbstoffe in Alkohol oder Wasser und der Unlöslichkeit derselben in den genannten Medien fußt.

Nach Migula unterscheiden wir also in Wasser unlösliche Bakterienfarbstoffe, in Wasser lösliche und in Wasser und Alkohol unlösliche Bakterienpigmente.

Zu den in Wasser unlöslichen, wohl aber in Alkohol und fettlösenden Substanzen löslichen Pigmenten gehören die meisten Bakterienfarbstoffe, die wieder in einzelne Untergruppen zerfallen. Eine der interessantesten derselben sind die Lipochrome, deren Nachweis mit der von Zopf angegebenen Lipocyandinreaktion nicht allzu schwer ist. Diese Reaktion besteht darin, daß konzentrierte Schwefelsäure den im Bakterienrasen ausgeschiedenen, festen, roten und gelben Farbstoff in blaue Körnchen umwandelt. Zu den Lipochromen gehören die meisten roten und gelben Farbstoffe zahlreicher Coccaceen und Bacillaceen. Sie sind in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff löslich, ohne daß sie selbst Fette sind, vielmehr nur an Fettstoffe gebunden vorkommen, aus denen sie auch durch Verseifen gewonnen werden können. Zu den Lipochromen scheint auch das Bakteriopurpurin der schwefelführenden Purpurbakterien zu gehören, welches ja eine wesentliche Rolle im Leben dieser Mikroorganismen spielen dürfte. Auch der dem Chlorophyll nahestehende grüne Farbstoff der eingangs genannten grünen Bakterien ist hier einzuordnen.

Das Prodigiosin des Wunderblutbazillus, *Bacillus prodigiosus*, gehört zwar nicht zu den Lipochromen, wohl aber zu den in Wasser unlöslichen Farbstoffen. Der *Bacillus prodigiosus* ist bei uns weit verbreitet und in der wärmeren Jahreszeit sozusagen überall zu finden. Er bevorzugt ganz besonders stärkehaltige Nährsubstrate und auf frei an der Luft aufgestelltem Stärkekleister zeigen sich alsbald seine intensiv fuchsinfarbigen Kolonien. Auch auf den meisten Laboratoriumsnährböden wächst er mit fuchsinrotgefärbten Auflagerungen, die nach längerer Zeit einen metallischen Glanz annehmen. Das Rot der einzelnen Prodigiosus-Stämme ist verschieden,

manchmal ganz licht, dann wieder sehr dunkel mit einem Stich ins Blaue. Bezüglich seiner Farbstoffbildung ist er sehr launisch und ohne wahrnehmbare äußere Ursache bildet er einmal gut Farbstoff, das anderemal sehr schlecht. Das rote Pigment, „Prodigiosin“ genannt, wird in kleinsten Körnchen zwischen den Zellen deponiert. Es ist in Wasser vollständig unlöslich. Schabt man vom roten Kulturrasen einer Agarkultur etwas ab und bringt es in Alkohol, Chloroform, Äther, Benzol oder Schwefelkohlenstoff, so löst sich das Prodigiosin mit schöner, fuchsinroter Farbe auf. Auf Zusatz von Spuren einer Säure zur alkoholischen Lösung wird dessen Farbe lebhafter. Besonders Schwefelsäurezusatz bewirkt einen violetten Ton der Farbe. Selbst in großer Menge zugesetztes Wasserstoffsperoxyd vermag den Farbstoff nicht zu zerstören, auch wenn verdünnte Natronlauge zugesetzt wird. Es tritt allerdings dann ein Farbenumschlag ins Rotgelb ein, sobald man aber neutralisiert oder ansäuert, ist die rote Farbe wieder da. Auch Salpetersäure zerstört nur in stärkerer Konzentration angewendet das Prodigiosin. Tränkt man mit alkoholischer Prodigiosinlösung ein Blatt Filtrierpapier und belichtet es teilweise im Sonnenlicht, so sind schon nach einstündiger Lichtwirkung die belichteten Teile ausgebleicht und erscheinen weiß oder, wenn der Farbstoff dick aufgetragen ist, gelb bis gelbbraun. Wir haben also einen sehr lichtunbeständigen Farbstoff vor uns, der sich aus diesem Grunde trotz seiner schönen Farbe für technische Zwecke nicht verwenden läßt. Das Prodigiosin findet nur in der botanischen Technik zur Färbung von verkorkten Zellwänden Anwendung, nachdem Rosenberg dessen starke Affinität gerade für solche Zellwände erkannt hatte. Die chemische Zusammensetzung des Prodigiosins ist noch keineswegs vollständig sichergestellt. Nach Griffiths kommt ihm die Formel $C_{38} H_{56} NO_5$ zu, woraus sich ein Stickstoffgehalt von 2·3 Prozent ergibt. Kraft fand einen solchen von 3·9 Prozent. Nach dem eben genannten Autor ergab die Aschenanalyse den Befund von Na, Fe, Cl und P. Schneider hat die alkoholische Lösung des Prodigiosins auch spektroskopisch geprüft und gelangte dabei zu folgenden Ergebnissen: Es findet sich ein Streifen vollständiger Absorption von 66—70 und von

da ab eine Verdunkelung, während blau und violett vollständig ausgelöscht werden.

Es ist zwar eine Reihe anderer Mikroorganismen bekannt geworden, die einen dem Prodigiosin ähnlichen, roten Farbstoff produzieren, doch den gleichen konnte man nirgends nachweisen.

So entdeckte Lustig den *Bacillus fuchsinus* Mig., dann beschrieb Breunig den *Bacillus kiliensis*, dessen roter Farbstoff ebenfalls von Schneider näher untersucht wurde. Nach dem genannten Autor findet eine Entfärbung statt, wenn die alkoholische Lösung des Farbstoffes mit Zinkstaub und Essigsäure versetzt wird. Nach Ausgießen der entfärbten Flüssigkeit auf ein Filtrierpapier tritt infolge der Einwirkung des Luftsauerstoffes die rote Farbe sehr bald wieder auf. Diese Erscheinung erinnert an das Verhalten einer Leukobase. Das Prodigiosin zeigt dieses Verhalten nicht und schon deshalb können beide sonst sehr ähnliche Farbstoffe nicht identifiziert werden. Auch das spektroskopische Verhalten des Pigmentes von *Bacillus kiliensis* ist anders als vom Prodigiosin. Der Absorptionsstreifen liegt allerdings zwischen 65 und 70, außerdem bemerkt man noch eine Verdunkelung im Grün von 63—65 und eine Auslöschung von 135 ab. Das übrige Spektrum ist unverändert.

In Wasser vollständig unlöslich ist auch der violette Farbstoff des *Bacillus violaceus*, dessen Kulturen von Matruchot zur Färbung lebendigen Protoplasmas verwendet wurden. Unter dem Mikroskop erkennt man in der Zellwand des *B. violaceus* und dieser anliegend die Farbstoffpartikelchen. Einen ähnlichen Farbstoff soll auch der *Bacillus janthinus* produzieren.

Von den in Wasser löslichen Bakterienfarbstoffen erwähne ich zuerst das von Lehmann als Bakteriofluorescein bezeichnete, gelbgrüne Pigment einer großen Anzahl von Fäulnisbakterien. Aus jedem Flußwasser und aus den meisten faulenden Substraten lassen sich mit Leichtigkeit Bakterien isolieren, die den genannten Farbstoff prächtig zeigen. Ich nenne die zahlreichen Varianten des *Bacillus fluorescens liquefaciens*, der, wie schon der Name aussagt, die Gelatine zu

verflüssigen vermag. Dann sind noch *Bacilli fluorescentes non liquefacientes* bekannt geworden. Sie alle gehören in die Gruppe *Pseudomonas Migula*, sind beweglich und tragen an einem Zellpol ein Büschel von 3—7 verschieden starken, meist nur wenig geschwungenen Geißeln. Außerdem wurden zwei die Gelatine nicht peptonisierende, fluoreszierende Wasservibrionen bekannt, deren Beschreibung in den Mitteilungen des naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark aus dem Jahre 1904 niedergelegt ist.

Vorerst will ich mich mit dem fluoreszierenden Farbstoff jener Bakterien befassen, die nur diesen allein bilden. Auch bei ihnen tritt die Fluoreszenz nicht gleich prächtig auf, was einerseits auf Verschiedenheiten in der Menge des gebildeten Farbstoffes zurückzuführen ist, anderseits gewiß auch auf Differenzen in der Produktion von Alkali, resp. Säure beim Wachstum, wie die Untersuchungen von Thumm u. and. ergaben. Aus den Ausführungen des genannten Forschers geht weiter hervor, daß der fluoreszierende Farbstoff bei allen Spezies der gleiche sein dürfte. Er ist eine gelbe, in Wasser lösliche Masse, die in fettlösenden Mitteln, wie Schwefelkohlenstoff, Benzol, Äther, Chloroform und Alkohol vollständig unlöslich ist. Mit der Konzentration der Lösung ändert sich ein wenig der Farbenton derselben, denn verdünnte Lösungen erscheinen im durchfallenden Licht hellgelb, während sehr konzentrierte Lösungen orangegelb sind. Die Fluoreszenz der neutralen wässrigen Lösungen ist tiefblau. Sobald man spurweise Säuren zusetzt, erlischt diese sofort und kehrt nach Neutralisation der Lösung in derselben Farbe zurück. Nach Zugabe von geringen Mengen Alkali fluoresziert die Lösung in blattgrüner Farbe und nimmt nach weiterem Alkalizusatz eine moosgrüne Farbe an. Diese Erscheinungen treten bei der Zucht der betreffenden Bakterienpezies in verschieden saurer, neutraler und alkalischer Nährgelatine sehr schön zutage. Solche Versuche, mit *Pseudomonas myxogenes*, einer Fäulnisbakterie aus Flaschenbier angestellt, ergeben nun, daß zum Auftreten der schönsten Fluoreszenz die Anwesenheit einer bestimmten Alkalimenge nötig ist. Nach viertägigem Aufenthalt der Stichkulturen der genannten Bakterienart bei 22° C. zeigte sich in den Röhren

mit 1 Prozent Normal-Essigsäure bis 5 Prozent Normal-Natronlauge sehr gutes Wachstum, dessen Optimum in der Kultur mit 1 Prozent Normal-Natronlauge war. Die ersten Erscheinungen von Fluoreszenz traten aber nur in den Röhren mit mindestens 1 Prozent Normal-Alkali auf, während die Kulturen auf saurer und neutraler Nährgelatine farblos blieben. Das Maximum der Fluoreszenz war bei einem Gehalt von 3 Prozent Normal-Alkali zu verzeichnen.

Es liegt nun nahe, anzunehmen, daß infolge des Mangels an freiem Alkali in den anderen Kulturen die Farbstoffbildung unterblieb. Dem ist jedoch nicht so. Es wurde auch in dem sauren Nährboden der Farbstoff gebildet, nahm aber infolge der Reaktion nicht die ihm in alkalischer Lösung zukommende Farbe an, denn die Alkalisierung der ungefärbten sauren oder neutralen Kulturen ließ augenblicklich schönste Fluoreszenz auftreten.

Den Übergang von der blauen in die grüne Fluoreszenz kann man in Gelatinekulturen wegen der gelben Eigenfarbe dieses Nährsubstrates nicht beobachten. Dazu eignen sich nur ungefärbte Nährmittel, wie Lösungen von Asparagin in anorganischen Salzlösungen, die die für das Wachstum der Bakterien nötigen Elemente in entsprechenden Verbindungen enthalten und denen, wenn nötig, noch ein Kohlenhydrat als besondere Kohlenstoffquelle zugesetzt ist. Darauf gedeihen die fluoreszierenden Fäulnisbakterien, wie *Pseudomonas myxogenes*, ausgezeichnet.

Die anorganische Nährlösung von Artur Mayer, mit Asparagin und Rohrzucker versetzt, reagiert schwach sauer. Diese Reaktion verhindert das Wachstum der letztgenannten Bakterienart nicht, sondern verlangsamt es etwas. Dabei zeigt sich nun sehr schön, daß zuerst eine blaue Fluoreszenz auftritt, die in den oberen, der Luft zugekehrten Partien der Nährflüssigkeit allmählich in grün übergeht, entsprechend der Menge des von der Bakterienart gebildeten Alkalis. Das Auftreten der blauen Fluoreszenz fällt mit der genauen Neutralisation der Nährlösung durch den Mikroben zusammen. Säuert man ältere Kulturen vorsichtig an, kann man die Abnahme der grünen Fluoreszenz und den allmählichen Über-

gang in die blaue und schließlich das Erlöschen derselben beobachten.

Die chemische Natur des Bakteriofluoresceins ist noch keineswegs genau ermittelt. Es enthält C, H, O und N und soll den Eiweißkörpern nahestehen (Hoffa).

Es wurden auch Bakterien bekannt, die neben dem Bakteriofluorescein einen zweiten, manchmal auch einen dritten Farbstoff zu bilden vermögen. Beim *Bacterium syncyaneum* (*Pseudomonas syncyanea* Mig., *Bacillus cyanogenes* Flügge), welches der Erreger der Blaufärbung der Milch ist und für den Menschen keine pathogenen Eigenschaften besitzt, können wir neben dem Bakteriofluorescein noch einen blauen Farbstoff, des Syncyanin, beobachten. Nach den Untersuchungen von Thumm ist dieser prächtig blaue wasserlösliche Farbstoff sehr unbeständig. Stärkere Säuren lassen ihn stahlblau erscheinen, während er in schwachsaurer Lösung schwarzblau, in neutraler schwarz und in alkalischer braunschwarz ist. Wie Lehmann und Neumann hervorheben, dürfte das von Zangenmeister aus blauer Milch isolierte *Bacterium cyaneofluorescens* mit *Pseudomonas syncyanea* identisch sein und sich nur dadurch von ihm unterscheiden, daß auf festen Nährsubstraten die Fluoreszenz besonders in den Vordergrund tritt und wenig Syncyanin gebildet wird.

Auch vom Erreger des blauen Eiters, der *Pseudomonas aeruginosa* Mig. oder dem *Bacillus pyocyaneus* werden zumindest zwei Farbstoffe gebildet. Einmal das besprochene Bakteriofluorescein und dann noch das von Fordos aus blauem Eiter zuerst dargestellte Pyocyanin, das Gessard auch aus Reinkulturen der *Pseudomonas aeruginosa* gewann. Ernst unterscheidet zwei Varietäten des *Bacillus pyocyaneus*; die eine Abart gibt einen aus Chloroformauszügen azurblau kristallisierenden Farbstoff, während der blaue Farbstoff der α -Varietät aus Chloroform mit grünlich schimmernden Kristallen auskristallisiert. Gessard will übrigens drei Farbstoffe gefunden haben, einmal den fluoreszierenden, dann den blauen und endlich das Oxydationsprodukt des letzteren, das Pyoxanthin, ein braun-

rotes Pigment. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch Kunz. Babes gewann aus Kulturen des *Bacillus pyocyaneus* ebenfalls drei Farbstoffe, das Pyocyanin, dann einen in Wasser und Alkohol löslichen Farbstoff, dessen Lösungen im auffallenden Lichte blaugrün, im durchfallenden blau erschienen und endlich einen nur wasserlöslichen, der dem Bakteriofluorescein sehr nahe steht und wahrscheinlich damit identisch ist.

Die chemische Konstitution des Pyocyanins ist ebenfalls noch nicht sichergestellt. Ledderhose isolierte dasselbe aus Kulturen durch Ausschütteln mit Chloroform und stellte das pikrinsaure Salz desselben dar. Daraus bestimmte er als empirische Formel für diesen Farbstoff $C_{14} H_{14} N_2 O$, während Fordos noch Schwefel darin nachwies. Der Schwefel kann aber in diesem Falle auch aus dem Eiter stammen, aus dem der genannte Autor sein Pyocyanin gewann.

Allen diesen Befunden entgegen erhielt Thumm bei verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* nur den fluoreszierenden Farbstoff und überhaupt kein Pyocyanin. Die Einheitlichkeit in den Befunden Thumms spricht wohl dafür, daß für das Ausbleiben der übrigen Farbstoffe zumindest des Pyocyanins die verwendeten Nährböden verantwortlich zu machen sind. Aus diesem Grunde erscheint es auch gerechtfertigt, die *Pyocyaneus*-Arten nicht allzu rigoros von den übrigen, die Gelatine verflüssigenden fluoreszierenden Bakterienarten zu sondern, denn es ist gar nicht ausgemacht, daß unter geeigneten Zuchtbedingungen die letzteren nicht auch Pyocyanin zu bilden vermögen. Übrigens wären vergleichende Untersuchungen über die chemischen Leistungen der bekannten *Fluorescentes liquefacientes* sehr wünschenswert, die dann verläßliche Daten für die Unterscheidung abgeben könnten.

Es wurde noch eine Reihe von Bakterien bekannt, die andere wasserlösliche Farbstoffe bilden. So entwickelt beispielsweise das *Bacterium erythrogenes* (*Bacillus lactis erythrogenes*) neben einem in Wasser unlöslichen Farbstoff ein wasserlösliches, rotes Pigment, das in den Nährboden diffundiert und diesen weinrot färbt.

Die von Weibel isolierte *Microspira nigricans*

(*Vibrio nigricans*), eine aus Wasser gezüchtete Bakterienart, bildet ein schwarzes Pigment, das den Nährboden dunkel färbt.

Das *Bacterium brunneum* (Eisenberg) Mig. bildet einen braunen Farbstoff, der von dem fakultativ anaëroben Mikroben in die nicht verflüssigte Gelatine abgegeben wird. Auch die im Impfstich der Gelatinestichkultur wachsenden Bakterienmassen produzieren diesen Farbstoff. Nach Thorpe kommt ihm die Formel $C_{18} H_{14} O_3$ zu. Er soll nach den Angaben von Pfeffer die Fähigkeit besitzen, den Luftsauerstoff zu speichern.

Die oben angeführten Bakterienarten, die mindestens einen in Wasser löslichen Farbstoff zu bilden vermögen, repräsentieren keineswegs alle Vertreter dieser Gruppe von Mikroben. Es gibt ihrer noch eine bedeutende Zahl, deren einzelne Spezies mehr oder weniger genau studiert sind und auf die in der kurzen Zeit eines Vortrages nicht eingegangen werden kann.

Die dritte Gruppe Migulas endlich umfaßt die Farbstoffe jener Bakterien, die verschieden gefärbte Pigmente bilden, die weder in Wasser noch in Alkohol löslich sind. Es wurden nur wenige hieher gehörige Bakterienfarbstoffe bekannt, so beispielsweise der Farbstoff des *Micrococcus cereus* (Passet) Mig. (*Staphylococcus cereus flavus*). Er ist von Schneider genauer untersucht und ist weder in Wasser noch in Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol und Chloroform löslich. Nur in 10prozentiger Kalilauge löst er sich mit zitrongelber Farbe auf. Die erhaltene Lösung ist jedoch sehr wenig haltbar. Näheres über diesen interessanten Farbstoff ist nicht bekannt.

In diese Gruppe gehört auch das Pigment von *Pseudomonas berolinensis* (Clausen) Mig., die einen schönen indigoblauen Farbstoff bildet und aus Wasser isoliert wurde. Dieses Pigment ist nur in Salzsäure löslich. Die Lösung ist äußerst unbeständig.

An mehreren Stellen wurde schon erwähnt, daß nicht immer und unter teilweise noch recht unbekanntem Bedingungen die Farbstoffbildung unterbleiben und spontan wieder auftreten kann. Es haben nun zahlreiche Forscher alle jene Bedingungen zu erforschen getrachtet, die die Farbstoffproduktion

zu fördern oder ungünstig zu beeinflussen imstande sind. Trotz zahlreicher mühevoller Untersuchungen auf diesen Gebieten sind unsere Kenntnisse davon noch sehr mangelhaft, denn wir wissen die Grundbedingungen für das Zustandekommen der Farbstoffbildung noch keineswegs in allen Details.

Aus dem früheren ist zu entnehmen, daß die chemische Reaktion des Nährsubstrates für das Auftreten der Farbe jedenfalls von Bedeutung ist. Wir haben gesehen, daß Fluoreszenzerscheinungen an eine streng neutrale oder alkalische Reaktion gebunden sind und daß sie bei einer auch nur minimalen Azidität des Nährbodens oder Farblösungsmittels sofort verschwinden, resp. nicht zustande kommen. Wir haben weiter beobachtet, daß durch Ansäuern der Lösung die Fluoreszenz zum Verschwinden gebracht wird und daß die Wiederherstellung der ursprünglichen Reaktion vom Wiederauftreten der Fluoreszenz begleitet ist. Diese Umstände deuten darauf hin, daß für die Produktion des betreffenden Farbstoffes die Reaktion des Nährbodens keine einschneidende Bedeutung besitzt, sofern nur Wachstum dabei statthaben kann. *Pseudomonas myxogenes* bildet ihren fluoreszierenden Farbstoff auch auf schwach essigsauerm Nährsubstrat, z. B. Gelatine, denn Alkalisierung derartiger Kulturen bedingt fast augenblickliches Auftreten der Fluoreszenz: es wird der Farbstoff sozusagen aktiviert. Es liegt der Gedanke nahe, den Alfred Fischer anregte, daß es sich beim Bakteriofluorescein um eine an und für sich nicht fluoreszierende Farbsäure handeln kann, deren Salze nur fluoreszieren. Daß auch bei anderen Bakterienfarbstoffen ähnliche Verhältnisse bestehen können, läßt sich nicht ohne weiters von der Hand weisen.

Aus den wenigen Analysen von Farbstoffen der Bakterien geht hervor, daß eine große Anzahl derselben zumindest aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff besteht, während einige außerdem noch Stickstoff enthalten. Unsere üblichen Laboratoriums Nährböden für die Mikroben enthalten die genannten Elemente in mehr oder weniger hoch zusammengesetzten Verbindungen. Eine große Anzahl von Bakterien, wie alle paratropen Bakterien, Pepton- und

Amidobakterien im Sinne A. Fischers gedeihen nur auf Nährsubstraten, in denen als Stickstoffquelle ein Eiweißkörper oder mindestens noch ein hoch zusammengesetztes Spaltungsprodukt von Eiweißkörpern dargereicht ist. Unter ihnen gibt es einige Farbstoffbildner, die ihr Pigment darauf prächtig bilden. Sofern es sich bei ihnen um N-hältige Farbstoffe handelt, entnehmen sie auch zum Aufbau ihres Pigmentes den Stickstoff diesen hochzusammengesetzten Verbindungen. In allen diesen Fällen bedarf es zur Farbstoffproduktion auch keiner besonderen Kohlenstoffquelle, denn dazu dient ebenfalls die Eiweißverbindung oder ihr Spaltungsprodukt.

Besondere Kohlenstoffquellen sind also für die Farbstoffbildung nicht notwendig, doch vermehren sie im allgemeinen die Pigmentproduktion. Aus diesem Grunde scheint auch die Kartoffel die Farbstoffbildung ganz besonders günstig zu beeinflussen. Die meisten Pigmentbakterien bilden auf ihr besonders prächtig ihren Farbstoff, wenn auch sonst das Wachstum darauf nicht gerade ausgezeichnet ist. Immerhin dürften aber die in diesem Nährsubstrat enthaltenen Salze dafür von nicht zu unterschätzender Bedeutung sein.

Thumm konnte nun an *Pseudomonas syncyanea* zeigen, daß sowohl für das von dieser Spezies gebildete Bakteriofluorescein als auch den blauen Farbstoff, das Syncyanin, besondere Stickstoff- und Kohlenstoffquellen nötig sind. Nach dem genannten Autor entstehen beide Farbstoffe bei der Zucht in milchsauren Ammon-Lösungen, während auf zitronsauren Ammon-Lösungen nur Syncyanin und in Asparaginslösungen nur Bakteriofluorescein gebildet wird.

Wie aus zahlreichen Untersuchungen zu entnehmen ist, scheinen gerade die Magnesiumsalze (an erster Stelle $MgSO_4 + 7H_2O$) für die Farbstoffbildung von ganz besonderer Bedeutung zu sein.

Den Einfluß von alkalischen Erden auf die Pigmentbildung von Bakterien hat zunächst Gessard genauer an *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) Mig. (*Bacillus pyocyaneus*) untersucht, indem er die genannte Bakterienart unter Darreichung von bernsteinsäurem Ammon als kombinierte

Kohlen- und Stickstoffquelle züchtete, nachdem er der Nährlösung Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Chlorcalcium in bestimmten wechselnden Mengen zugesetzt hatte. Dabei hat es sich herausgestellt, daß für das Auftreten des fluoreszierenden Farbstoffes in erster und einziger Linie das Phosphat eine Rolle spielt, sodaß mit dessen Abnahme auch die Bildung des Bakteriofluorescein herabgesetzt, mit dessen Zunahme aber gesteigert wird. Beim Vorhandensein von nur sehr geringen Mengen des Kaliumphosphates hört die Bildung von Fluorescein gänzlich auf. Dafür tritt aber gerade jetzt die Produktion des Pyrocyanins in den Vordergrund, das vornehmlich bei geringem Phosphatgehalt entsteht. Nach Gessard soll bis zu einem Gehalt von 0·00625 Prozent Phosphat in der oben angegebenen Nährlösung nur Pyrocyanin gebildet werden, von da ab beide Farbstoffe und endlich von 0·13 Prozent Phosphatgehalt aufwärts nur mehr Bakteriofluorescein. Der vermehrte oder verminderte Calciumgehalt der Nährlösung soll dagegen ohne jeden wesentlichen Einfluß auf die Farbstoffbildung sein.

Thumm, der sich mit den gleichen Untersuchungen eingehend beschäftigte, gelangte zur Anschauung, daß bei Anwesenheit von Magnesiumverbindungen, insonderheit Magnesiumsulfat das Calcium vollständig entbehrlich ist und durch ersteres ersetzt werden kann. Das Produzieren von Pigmenten ganz besonders fördernde Verbindungen des Magnesiums und Phosphors sind $Mg SO_4 + 7 H_2 O$ und $KH_2 PO_4$, wobei aber das K ebenfalls von Wichtigkeit ist und nicht etwa ohne weiteres durch Na ersetzt werden kann. Beide Verbindungen sind in unseren üblichen Laboratoriumsnährböden meistens enthalten. Eine Ausnahme macht das Peptonwasser, welches die in Rede stehenden Verbindungen zumeist in zu geringer Quantität enthält. Deshalb fluoreszieren die auf anderen Nährböden sonst ausgezeichnet Bakteriofluorescein bildenden Mikroben auf diesem Kulturmedium gewöhnlich nicht.

Magnesium soll auch für die Bildung des Prodigiosins von bestimmendem Einfluß sein, wie Thumm, Samkow, Nösske, Knotze u. A. angeben. Der *Bacillus prodigiosus* soll bei Anwesenheit von Spuren Magnesium eben

noch rot wachsen, die Tiefe der Farbe bei größerem Magnesiumsulfatgehalt des Nährsubstrates zunehmen und bei der Gegenwart von großen Mengen dieses Salzes wieder abnehmen. Fehlt das Magnesium im Nährboden gänzlich, findet zwar gutes Wachstum des Wunderblutbazillus statt, jede Farbstoffbildung bleibt aber aus. Die zur Pigmentproduktion eben nötige Quantität von Magnesiumsulfat soll 0·001 Prozent betragen.

Diesen ziemlich einheitlichen Befunden steht die Angabe von Luckhardt gegenüber, daß es weiße Rassen des *Bacillus prodigiosus* gäbe, die niemals durch Magnesiumsulfat im Nährboden zur Farbstoffbildung angeregt werden konnten, gelegentlich aber ohne irgend welches Zutun plötzlich den roten Farbstoff bildeten.

Eigenartig ist auch die Angabe Beyerincks bezüglich der Pigmentbildung für *Bacillus violaceus*. Nach dem genannten Autor soll dieser Bazillus dann am schönsten seinen violetten Farbstoff bilden, wenn ihm nur wenig Phosphate und ausschließlich Proteine als Nährstoff dargereicht werden. Dem gegenüber bemerkt Migula, daß seine einen violetten Farbstoff bildenden Mikroben diesen dann am besten produzierten, wenn ihnen kohlenhydratreiche Nährmedien gegeben wurden. Um schlechte Farbstoffbildner dieser Spezies zur Pigmentproduktion anzuregen, empfiehlt Migula geradezu die Kartoffel, also einen an Stärke besonders reichen Nährboden.

Zur Zeit läßt sich über die Beziehungen und Verhältnisse, die zwischen Farbstoffbildung einerseits und dargebotene Nahrung andererseits sicherlich bestehen, kein endgiltiges Urteil fällen und es sind diesbezügliche eingehende Untersuchungen nötig, die dann Klarheit in diese Frage bringen können.

Ein anderer, wesentlicher Faktor für die Entstehung der Bakterienfarbstoffe ist die Anwesenheit von Sauerstoff. Nur sehr wenige Bakterienarten sind sicher darauf untersucht, daß sie auch bei fehlendem Luftsauerstoff ihr Pigment zu bilden vermögen. So beispielsweise das *Spirillum rubrum* Esmarch, welches nur im Impfstich den roten Farbstoff bildet, an der Oberfläche in der Luft aber weiß wächst. Wie Migula meint, kann es sich hier um einen

sehr leicht oxidierbaren Farbstoff handeln, „welcher zwar auch bei Luftzutritt gebildet wird, aber bei der Berührung mit Sauerstoff sofort zerfällt“.

Außerdem gehört hierher der *Diplococcus pyogene Pasquale*, welcher ebenfalls nur bei Luftabschluß seinen orangefarbenen Farbstoff bildet.

Auch der obligat anaërob wachsende *Bacillus rubellus Ogato* bildet einen schwach weinroten Farbstoff.

Bei der weitaus größten Anzahl von Pigmentbakterien tritt die Farbstoffbildung nur bei der Anwesenheit des Sauerstoffes der Luft ein. Nun erhebt sich die Frage, wird bei Sauerstoffmangel der Farbstoff überhaupt nicht gebildet oder wird eine Leukoverbindung erzeugt, die durch Oxydation in der Luft erst in die gefärbte Verbindung übergeführt wird. Wir können wohl beide Möglichkeiten annehmen und es ist sicher, daß eine große Anzahl von gebildeten Farbstoffen als ungefärbte Verbindung den Bakterienleib verlassen. Schmidt und Weis sprechen die Vermutung aus, daß vielleicht bei dieser Überführung der Leukoverbindungen in gefärbte Verbindungen „Oxydasen“, also Enzyme, tätig seien.

Das Licht wirkt nicht direkt hemmend auf die Farbstoffproduktion, soferne dadurch nicht das Wachstum überhaupt gehemmt oder unterdrückt wird. Die Lösungen der Bakterienpigmente sind gegen Insolation ziemlich empfindlich und bleichen in kurzer Zeit aus. Unter Lichtabschluß gehalten sind sie beständig. Einige könnten wegen ihrer Schönheit und Affinität zur Faser in der Färberei Verwendung finden, wenn sie eben lichtbeständiger wären. Vorderhand finden sie keine technische Verwendung.

Bezüglich des Einflusses von Temperaturen auf die Farbstoffbildung kann ganz allgemein gesagt werden, daß gewöhnlich bei der Zucht der betreffenden Pigmentbakterien beim Wachstumsoptimum auch optimale Produktion des Farbstoffes statt hat. *Pseudomonas aeruginosa* gedeiht am besten bei 35—37° C. und bildet bei dieser Temperatur auch am schönsten und schnellsten seine Farbstoffe. Der *Bacillus prodigiosus* wächst sowohl bei Zimmer- als auch bei Brüttemperatur ausgezeichnet. Am intensivsten bildet er seinen

Farbstoff bei Zimmertemperatur und wächst bei 37° C. fast farblos oder nur rosa gefärbt.

Züchtet man farbstoffbildende Bakterien durch sehr lange Zeit unter Bedingungen, die für die Pigmentproduktion ungünstig sind, so entstehen mehr oder weniger leicht farblose Rassen, die sich mitunter nur sehr schwierig wieder zur Farbstoffbildung anregen lassen. Nach Migula sollen nun alle Bakterien, die sich durch künstlich geschaffene ungünstige Bedingungen sehr leicht in farblose Generationen umzüchten lassen, wieder leicht in die gefärbte ursprüngliche Form zurückzuführen sein, wenn man sie in günstige Verhältnisse zurückbringt. Umgekehrt sollen aber alle Bakterienarten, die nur durch lange fortgesetzte Zucht unter sehr ungünstigen Bedingungen in eine farblose Rasse überzuführen sind, wieder nur unter großen Schwierigkeiten zur Pigmentbildung anzuregen sein.

Ob es überhaupt gelingt, aus farbstoffbildenden Bakterien farblose Rassen durch Zucht dauernd hervorzubringen, ist zumindest zweifelhaft und noch nicht mit Sicherheit geglückt, denn eine Beobachtungsdauer von wenigen Jahrzehnten genügt zur Entscheidung dieser Frage nicht.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen des naturwissenschaftlichen Vereins für Steiermark](#)

Jahr/Year: 1907

Band/Volume: [43](#)

Autor(en)/Author(s): Fuhrmann Franz

Artikel/Article: [Über Farbstoffbildung bei Bakterien. 22-38](#)