

Elektronenmikroskopische Darstellung von Umsatzorten reduzierender Enzyme in Bakterien durch Methylenblau-Silber (*Argochrom*)*

DIETER F. HÜLSER**

Hygiene-Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. H. KNOTHE)

Eingegangen am 2. Juli 1968

Localization of Reductive Sites in Bacteria by Methyleneblue-Silver (Argochrome) with the Electron Microscope

Summary. The methylenblau-silver-compound *Argochrome* can be used for electron microscopical localisation of the reductive enzyme system in bacteria. When added to the culture medium, the bacteria reduce *Argochrome* to metallic silver grains, as demonstrated by electron diffraction. These Ag-grains can already be seen in preparations of whole bacteria. Ultrathin sections of gramnegative bacteria show the Ag-grains between cell wall and cytoplasmic membrane, indicating the location of the enzyme reaction. Grampositive bacteria often reduce *Argochrome* already in the culture medium, with less or no formation of intracellular grains. The respective bacteria-free filtrates do not reduce *Argochrome*. The varying size and frequency of the Ag-grains may be an expression of the enzyme activity, as is the time needed by a bacterial culture to discolour *Argochrome*. Various substrates affecting the reductive enzym system, also influence the formation of Ag-grains in bacteria.

Zusammenfassung. Die Methylenblau-Silberverbindung *Argochrom* eignet sich gut zum elektronenmikroskopischen Nachweis und zur Lokalisation reduzierender Enzyme in Bakterien. Wenn *Argochrom* dem flüssigen Kulturmedium beigegeben wird, dann wird es, wie Feinbereichselektronenbeugung anzeigt, zu Ag-Granula reduziert. Diese sind schon in einfachen Tupfpräparaten klar erkennbar und haben nach ca. 15 min die maximale Menge erreicht. Die Lokalisation der Ag-Granula im Bakterieninnern war durch Schnitte möglich, da die Granula die Einbettungsvorgänge überstehen, wenn nach den angegebenen Vorschriften fixiert und kontrastiert wird. Die Granula liegen bei gramnegativen Bakterien meist zwischen Zellwand und Cytoplasmamembran und zeigen die dort liegenden Umsatzorte reduzierender Enzyme an. Bei grampositiven Bakterien wurde *Argochrom* meist schon im Kulturmedium reduziert und es kam zu keiner oder nur geringer intrazellulärer Granulabildung. Im bakterienfreien Filtrat wurde es nicht reduziert. Die unterschiedliche Größe und Häufigkeit der Ag-Granula in den Bakterien ist wahrscheinlich ein Maß für die Aktivität der Enzyme, wie es auch die Geschwindigkeit ist, mit der die Bakterienkultur *Argochrom* entfärbt. Verschiedene Substrate, die die Aktivität bestimmter Enzyme, insbesondere der Atmungskette, beeinflussen, wirkten sich entsprechend auf die Bildung der Granula aus.

* Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. B. RAJEWSKY, zum 75. Geburtstag gewidmet.

** Jetzige Adresse: Abteilung für physikalische Biologie, Max-Planck-Institut für Virusforschung, 7400 Tübingen.

Einleitung

Mit den Fortschritten der Elektronenmikroskopie in der Darstellung zellulärer und subzellulärer Strukturen verstärkte sich auch die Suche nach selektiv wirkenden Substanzen, die es ermöglichen, in Zellen die Umsatzorte strukturgebundener Enzyme zu lokalisieren. Der Nachweis enzymatischer Reaktionen sollte zweckmäßigerweise an lebenden Zellen vorgenommen werden, da dann die Enzymaktivität am größten sein wird. Dies bedingt Nachweissubstanzen, die elektronendichte Ablagerungen liefern, die nicht durch Einbettungsvorgänge wieder gelöst oder umkristallisiert werden können [28]. Durch Variation lichtmikroskopischer Techniken gelang auch die elektronenmikroskopische Lokalisierung und Darstellung von Umsatzorten reduzierender Enzyme. Als Nachweissubstanzen dienten hierzu Tetrazolium-Salze, die zu Formazan reduziert werden [15, 23, 24, 27, 33, 34, 41] und Kalium-Tellurit, das zu metallischen Tellurkristallen reduziert wird [17, 18, 26, 38, 39].

HERZBERG [41] hat über die Hemmwirkung der Methylenblau-Silber-Verbindung *Argochrom* auf Viren berichtet. Diese Inaktivierung geht — im Gegensatz zu der durch das photodynamisch wirkende Methylenblau allein — auch im Dunkeln vor sich. Bei ergänzenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Wirkung des *Argochroms* auf Bakterien konnten wir feststellen [16], daß unter bestimmten Bedingungen in den Bakterien zahlreiche *Granula* gebildet wurden, wie sie in Abb. 1 zu erkennen sind. Unbehandelte Kontrollen zeigten keine solchen *Granula*.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen berichtet, die zum Ziel hatten, die Entstehung dieser *Granula* zu klären. Es wurde gezeigt, daß es sich um eine spezifische Reaktion handelt, nämlich die Reduktion des *Argochroms* zu metallischem Silber durch reduzierende Enzyme. Diese Ag-*Granula* lokalisieren somit die Enzymumsatzorte in den Bakterien. Eigene Kontrollversuche mit Kalium-Tellurit sowie Vergleiche mit Literaturangaben über die Kalium-Tellurit- und die Tetrazoliumreduktion lassen den Schluß zu, daß *Argochrom* von den Enzymen der Atmungskette reduziert wird.

Material und Methoden

Argochrom ist eine Methylenblau-Silber-Verbindung (Merck), die z. Z. nicht mehr im Handel ist. Die benutzte Probe wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. HERZBERG für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Über die Strukturformel von *Argochrom* liegen keine näheren Angaben vor. Man nimmt an, daß jeweils zwei Methylenblau-Moleküle komplex über zwei Ag⁺-Ionen gebunden sind. Eine 0,1%ige wäßrige Stammlösung erwies sich als haltbar. Diese Stammlösung wurde den flüssigen Kulturen meist im Verhältnis 1:10 zugesetzt (Endkonzentration 10⁻⁴).

Kalium-Tellurit (K₂TeO₃) diente zu Kontrolluntersuchungen. Es wurde als 0,5%ige wäßrige Stammlösung aufbewahrt. Den flüssigen Kulturen wurde diese Stammlösung ebenfalls im Verhältnis 1:10 zugegeben, so daß eine Kalium-Tellurit-Endkonzentration von 1:5000 erreicht wurde.

Nährlösungen. Die Bakterien wurden in Fleischwasserbouillon, bestehend aus 0,3% Fleischextrakt und 0,5 — 1% Pepton gezüchtet (der pH-Wert wurde auf

7,2 — 7,4 mit HCl bzw. NaOH eingestellt). Mit Zusatz von 1% Glucose ergab diese Nährlösung die *Traubenzuckerbouillon* und mit 0,1% Na-Thioglycolat die *Thioglycolatbouillon*.

Bakterien. Alle Versuche zur Klärung des Einflusses chemischer und physikalischer Variationen auf die Reduktion von *Argochrom* zu Silber in Bakterien wurden mit *E. coli* B. in Fleischwasserbouillon durchgeführt. Von den gramnegativen Bakterien wurden daneben noch *Aerobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris* und *Pseudomonas pyocyanea* untersucht. Die grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus* und *albus*, *Sarcina lutea*, *Corynebacterium pseudodiphthericum*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus mycoides* wurden ebenfalls mit *Argochrom* behandelt. Von 24stündigen Fleischwasserbouillonkulturen der entsprechenden Bakterien wurden jeweils 0,01 ml in 5 ml Fleischwasserbouillon überimpft und über Nacht (ca. 16 Std) bei 37 °C bebrütet. Neben solchen Übernachtskulturen sind aber auch belüftete Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen untersucht worden. Diese Kulturen wurden im 37 °C Wasserbad gezüchtet und mit Luft durchperlt, die in 1 n HCl und 20%iger KOH gereinigt worden war. Die Wachstumskurven der Bakterien wurden durch Extinktionsmessungen im Photometer Zeiss Elko II erhalten.

Zum Abbau der Zellwand wurden die Bakterien mit Lysozym (Fluka) behandelt. Eine 0,05%ige Lösung von Lysozym in 0,15 m Ammonium-Acetat wurde mit HCl auf pH 6 eingestellt. Die auf Präparatblenden getupften Bakterien wurden in diese Lösung 30 min bei 37 °C eingelegt.

Zur Lokalisierung und Identifizierung der in den Bakterien gebildeten *Granula* wurde u. a. mit einer Verstärkerlösung gearbeitet (= physikalischer Entwickler): 1 g Metol + 5 g Citronensäure löst man in 50 ml aqua dest., kurz vor Gebrauch gibt man 0,5 ml einer 0,1%igen AgNO₃-Lösung zu [1]. Die mit den Bakterien getupften Präparatblenden wurden 10 min in diese Lösung eingelegt.

Kompetitive Hemmung der Succinatdehydrogenase wurde durch Zusatz von Malonsäure (Endkonzentration 0,08 m) zur Bakterienkultur 15 min vor *Argochrom*zugabe erreicht. Einzelne Stufen der Atmungskette wurden zu verstärkter Aktivität veranlaßt durch Zusatz von Na-Succinat, Na-Lactat, Na-Fumarat oder Na-Citrat (Endkonzentration jeweils 0,08 m) zur Bakterienkultur 15 min vor *Argochrom*zugabe. Der pH-Wert ist immer wieder auf pH 7,2 bis 7,4 eingestellt worden.

Inaktivierungsverfahren. Viele der bekannten Verfahren zur Inaktivierung von Bakterien beruhen auf unterschiedlichen Mechanismen. Durch parallele Anwendung einiger dieser Verfahren konnte man daher eine Einengung der für die Reduktion des *Argochroms* verantwortlichen Enzyme erhoffen. Daher wurden die Bakterien sowohl photodynamisch inaktiviert durch Zugabe von 1:50000 Thiopyronin-ZnCl₂-Doppelsalz (Merck) [10, 13, 35, 42] und anschließende 5minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Photolita-Lampe PF 218, 500 W, Abstand 50 cm) als auch durch UV-Bestrahlung (Sterisol, Original Hanau, $\lambda = 254$ nm, Abstand 15 cm, 5 ml Bakterienkultur mit ca. 10⁸ Zellen/ml in flacher Petrischale). Weiterhin wurden die Bakterien inaktiviert durch Erhitzen auf 56 °C für 30 min, durch 10% Formalin, 0,4% H₂O₂ oder 0,01 m KCN jeweils 15 min vor *Argochrom*zugabe. Die so behandelten Kulturen wurden — falls nötig — mit HCl oder NaOH wieder auf pH 7,2 bis 7,4 eingestellt. Zur Kontrolle der Inaktivierung wurde eine Platinöse mit inaktiviertem Material auf Endo-Agar-Nährböden aus-

gestrichen. Waren nach 24stündigem Bebrüten bei 37 °C keine Kolonien gewachsen, wurde angenommen, daß die Kultur soweit inaktiviert worden war, daß die elektronenmikroskopische Auswertung des Versuchs nicht durch überlebende Bakterien beeinflußt werden konnte.

Tupfpräparate. Die 0,1%ige Stammlösung des *Argochroms* und die 0,5%ige Stammlösung des Kalium-Tellurits wurden zur Herstellung von Standardpräparaten den Bakterienbouillonkulturen im Verhältnis 1:10 zugesetzt, so daß *Argochrom*-konzentrationen von 1:10000 und Kalium-Telluritkonzentrationen von 1:5000 erreicht wurden. Nach 15 bis 30 min Einwirkungszeit wurden die Bakterien abzentrifugiert (5 min; Christ Labor Zentrifuge 4 bis 5000 UpM). Das Sediment einer 5 ml Kultur wurde gut homogenisiert und in 1 ml aqua dest. resuspendiert. Daraus wurde mit einer Platinöse ein Tropfen auf Pt-Au-Objektblenden getupft (7-Loch-Blenden 70 μm \varnothing). Nach kurzer Sedimentationszeit wurde die Blende mit Filtrierpapier trocken gesaugt. Ohne weitere Behandlung wurden solche Tupfpräparate im Elektronenmikroskop (Siemens Elmiskop I) bei 8- oder 20000facher Vergrößerung untersucht. Von solchen Tupfpräparaten wurden Feinbereichselektronenbeugungen der in den Bakterien abgelagerten und der freiliegenden *Granula* angefertigt. Diese Feinbereichselektronenbeugungen (Debye-Scherrer-Diagramm) wurden ebenfalls im Siemens Elmiskop I (Kondensor 1 und 2, Zwischenlinse und Projektiv) mit einer 20 μm Selektorblende ausgeführt.

Fixierte Tupfpräparate wurden angefertigt, um sicherzustellen, daß die zur Einbettung benötigten Lösungen und die Fixierungsmittel die eingelagerten *Granula* nicht lösen.

Schnittpräparate. Zur Anfertigung von Schnitten wurden die mit *Argochrom* behandelten und zentrifugierten Bakterien in 5% Glutaraldehyd 30 min fixiert und mit gesättigtem Uranylacetat eine Std kontrastiert. Sämtliche Lösungen und der 2%ige Agar wurden bei den Einbettungen mit nach RYTER et al. [30] modifiziertem Michaelispuffer hergestellt. Osmiumfixierung war bei *Argochrom*-behandelten Bakterien nicht möglich, da das Silber von OsO_4 oxydiert und gelöst wurde. Kalium-Tellurit-behandelte Bakterien wurden ebenfalls eingebettet, obwohl ein beträchtlicher Teil der Tellurkristalle sowohl von Glutaraldehyd als auch von 1%iger Osmiumsäure wieder gelöst wurde.

Die fixierten und kontrastierten Bakterien wurden in 2%igem Agar ausgegossen, davon wurden Streifen geschnitten, die in aufsteigender Acetonreihe entwässert und in Mikropal (Ferak, Berlin) eingebettet wurden. Nach 48stündiger Polymerisierung bei 60 °C wurden Schnitte mit einem LKB-Mikrotom angefertigt und meist bei 20000facher Vergrößerung im Siemens Elmiskop I untersucht.

Ergebnisse

Eigenschaften des Argochroms. BERNHARD [3] hatte schon 1921 auf freie Ag^+ -Ionen in der *Argochrom*-Lösung hingewiesen, so daß man nach Zugabe von *Argochrom* zur Nährlösung mit der Bildung unlöslicher Silbersalze — insbesondere AgCl — rechnen mußte. Makroskopisch fand sich zwar bei *Argochrom*-konzentrationen von 10^{-4} in Nährlösung kein AgCl , jedoch war es in elektronenmikroskopischen Präparaten in nachweisbaren Mengen vorhanden.

In der *Argochrom*-Lösung bestand ein Gleichgewicht zwischen freien Ag^+ -Ionen und *Argochrom*, das man für kurze Zeit zugunsten des *Argochroms* verändern

konnte, indem man z. B. Cl⁻-Ionen zufügte und das entstandene AgCl abzentrifugierte. Mit dem so *gereinigten Argochrom* ließen sich ebenfalls die Umsatzorte reduzierender Enzyme in den Bakterien darstellen. Wenn Ag-Granula in den Bakterien gebildet wurden, so lief die Reduktion des *Argochroms* immer quantitativ ab. Der blaue Farbstoff (Konzentration 10⁻⁴) wurde z. B. von einer *Coli*-Übernachtskultur in etwa einer Std in eine Leukoform überführt. Zentrifugierte man die Bakterien ab und nahm mit dem Überstand das Sediment einer zweiten *Coli*-Übernachtskultur auf, so ließen sich keine Ag-Granula mehr erzeugen, auch dann nicht, wenn die Leukoform mittels Luftdurchperlung reoxydiert wurde. Durch die Reduktion war *Argochrom* in Leukomethylenblauoleküle und Ag⁺-Ionen zerlegt worden. Diese Reaktion war irreversibel. Die Reoxydierung der Leukoform war nur noch an Methylenblauolekülen wirksam.

Die bakterizide Wirkung des *Argochroms* wurde schon 1913 von EDELMANN und MÜLLER-DEHAM [6, 7] beschrieben. HERZBERG [11] fand eine *viruzide* Wirkung, die auch im Dunkeln abläuft. HERZBERG und REUSS [12] haben festgestellt, daß die Inaktivierung bei genügend langer Einwirkung (3 bis 4 Std) bei *Coli*-bakterien auch im Dunkeln erfolgt. Die jetzt ausgeführten bakteriologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß *Argochrom* nur dann eine bakterizide Wirkung hatte, wenn es von den Bakterien oder dem Kulturmedium nicht reduziert wurde. Junge belüftete Kulturen von *E. coli* B. (3 bis 6 Std alt) wurden durch eine *Argochrom*-Konzentration von 10⁻⁴ in 30 min bei unterschiedlichstem Tageslicht (trüb bis sonnig) ohne zusätzliche Bestrahlung inaktiviert. Diese Kulturen vermochten das *Argochrom* nicht zu reduzieren. Übernachtskulturen reduzierten unter den gleichen Bedingungen das *Argochrom* und wurden nicht inaktiviert.

Zur Aufklärung des zunächst unbekanntes Effektes — nämlich die Ag-Granulabildung in Bakterien von Übernachtskulturen nach *Argochrom*-zugabe und das Ausbleiben dieser Ag-Granula in ebenso behandelten belüfteten Kulturen — wurden anfangs nur Untersuchungen mit *Coli*-bakterien ausgeführt. Durch Variation der Versuchsbedingungen sollten chemische und physikalische Einflüsse auf die Ag-Granulabildung festgestellt werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob es sich bei dieser Ag-Granulabildung in Bakterien um eine spezifische Reaktion handelte, für die bestimmte Enzyme verantwortlich gemacht werden konnten, oder um unspezifische Silberabscheidungen an Bakterien.

Identifizierung und Lokalisierung der Granula. In mit *Argochrom* behandelten 16stündigen Fleischwasserbouillonkulturen von *E. coli* B. fanden sich in fast allen Zellen elektronendichte Granula, wie sie in Abb. 1 zu sehen sind. Diese Standardpräparation wurde im Zeitraum eines Jahres als Kontrolle immer wieder durchgeführt und zeigte stets dasselbe Ergebnis. Die Größe der Granula schwankte bei Standardpräparaten zwischen 200 und 600 Å Durchmesser, jedoch waren die Granula eines Bakteriums immer von gleicher Größenordnung. Anhand solcher Tupfpräparate konnte nichts über die genaue Lokalisation der Granula ausgesagt werden. Da die Vermutung nahelag, daß es sich hierbei um Ag-Granula handelt, wurde versucht, die Granula durch eine Verstärkerlösung, die sich vorzugsweise an metallischem Silber niederschlägt, zu vergrößern. Die benutzte Verstärkerlösung war ein physikalischer Entwickler, mit dem auf belichteten und dann fixierten Filmen oder Platten die submikroskopischen latenten Bildkeime (= Ag)

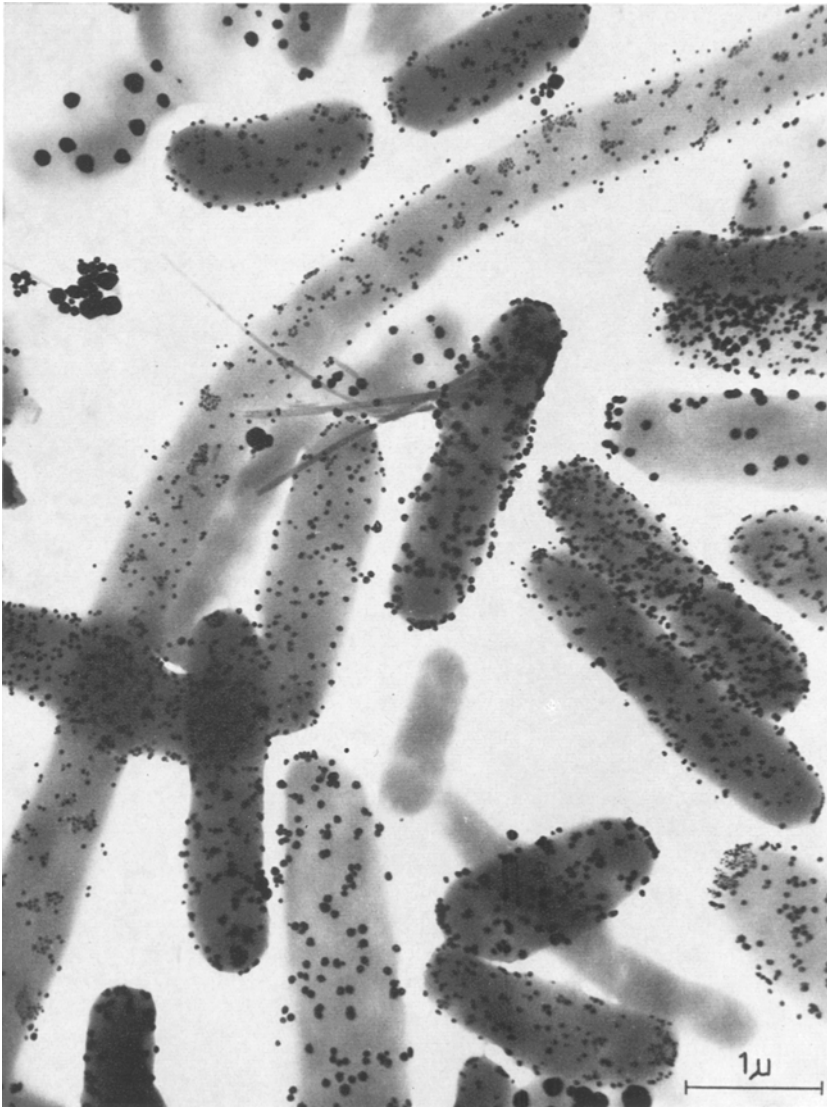


Abb. 1. 16stündige *E. coli* B.-Kultur, 15 min *Argochrome*einwirkung (Endkonzentration 10^{-4}). Tupfpräparat. Die *Granula* lokalisieren die Umsatzorte reduzierender Enzyme. Vergrößerung ca. 20000 \times

mit Ag^+ -Ionen so verstärkt werden, daß ein normales photographisches Bild entsteht. Die *Granula* in den Bakterien zeigten nach 10 min Einwirkung keine Größenzunahme. Wurde jedoch vor Behandlung mit dem Entwickler die Zellwand mit Lysozym abgebaut, so vergrößerten sich die *Granula*.

Schnittbilder zeigten eindeutig, daß diese *Ag-Granula* meist zwischen Cytoplasmamembran und Zellwand liegen (Abb. 2). Im Cytoplasma wurden nur ausnahmsweise *Granula* gefunden, außen an der Zellwand etwas häufiger. Ob es sich hierbei um metallisches Silber oder ein Silbersalz handelte, ließ sich im Einzelfalle



Abb. 2. Dünnschnitt durch eine 16stündige *E. coli* B.-Kultur, 15 min *Argochrome*einwirkung (Endkonzentration 10^{-4}). Vergrößerung ca. 50000 \times

nicht klären. An *Coli*bakterien waren keine bevorzugten Regionen der Cytoplasmamembran für die Ablagerung der *Ag-Granula* zu erkennen. Abb. 3 zeigt eine Schnittserie, die deutlich macht, daß entlang der Cytoplasmamembran die *Granula* über das ganze Bakterium verteilt sein können und keine Stelle der Cytoplasmamembran besonders viele oder besonders wenige *Granula* enthält, auch nicht die Pole der Zellen.

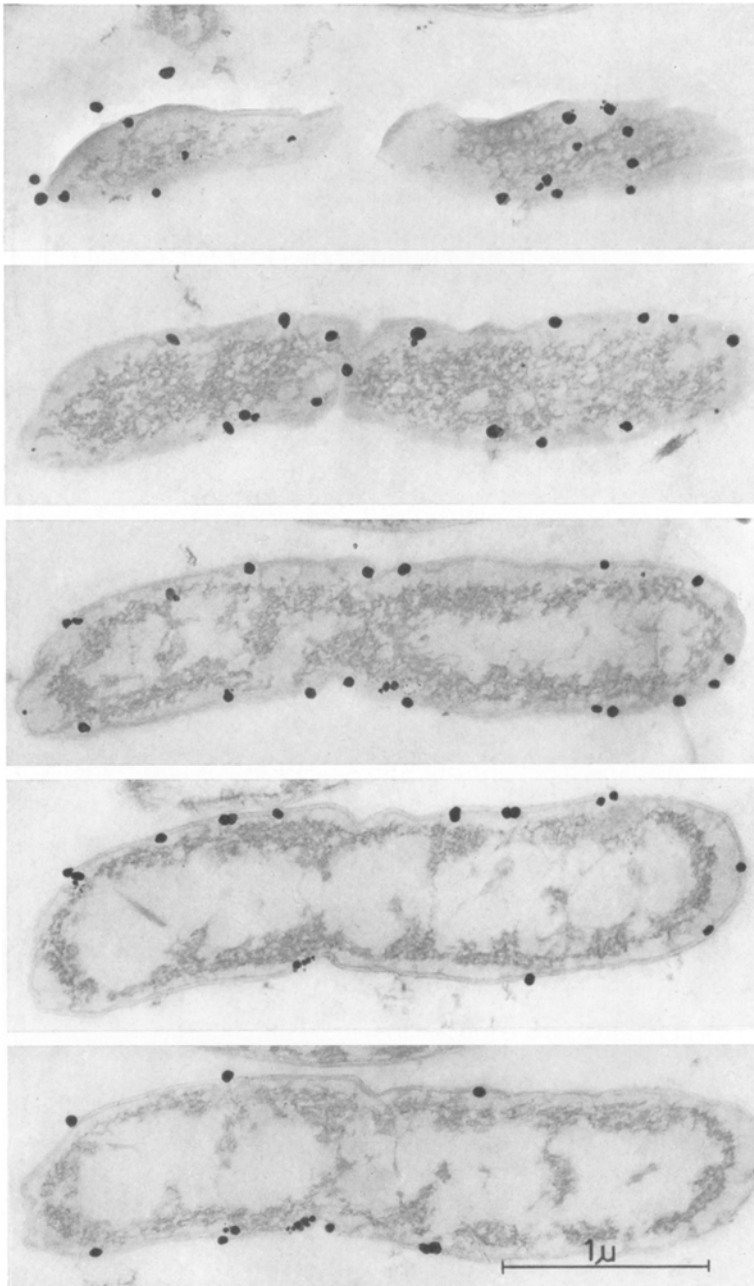


Abb. 3. Schnittserie durch ein sich teilendes *Coli-Bacterium* aus einer 16stündigen Kultur. 15 min *Argochrome*einwirkung (Endkonzentration 10^{-4}). Vergrößerung ca. 30000 \times

Löslichkeitsversuche zur Identifizierung der *Granula* an mit Lysozym behandelten *Colibakterien* ließen keine eindeutigen Schlüsse auf die Natur der *Granula* zu, da in diesen Größenordnungen die herkömmlichen Kriterien zur Unterscheidung

zwischen löslich und unlöslich nicht mehr exakt wirksam sind. Bei Kontrollversuchen wurden Ag-Aufdampfschichten nicht nur von solchen Lösungsmitteln elektronenmikroskopisch sichtbar teilweise gelöst, die auch makroskopisch einen Effekt zeigen (HNO_3), sondern auch von anderen, die normalerweise nicht als Lösungsmittel für Silber gelten (NH_4OH). Dennoch wurden diese Versuche mit allen Lösungs- und Fixierungsmitteln durchgeführt, die zum Einbetten der Bakterien benötigt wurden. Die *Granula* in den Bakterien wurden von 2%iger OsO_4 -Lösung oxydiert und gelöst. Durch 0,15 m Ammonium-Acetatlösung wurden die freiliegenden Körnchen — wie sie bei Standardpräparaten immer als kleine Inselchen im freien Gesichtsfeld zu finden waren — gelöst. Da hiervon die intrazellulären *Granula* nicht gelöst wurden, konnte Ammonium-Acetat benutzt werden, um Präparate mit einem sauberen *granulafreien* Untergrund herzustellen. Hierzu wurde das mit *Argochrom* behandelte Bakteriensediment in 0,15 m Ammonium-Acetat statt in aqua dest. resuspendiert. 5%ige Glutaraldehydlösung veränderte weder die eingelagerten noch die freiliegenden *Granula*. Daher wurden die Schnittpräparate mit Glutaraldehyd fixiert. Die zum Kontrastieren benutzte Uranylacetatlösung beeinflusste ebensowenig die eingelagerten *Granula* wie die zum Entwässern benutzten Aceton-Wassergemische.

Feinbereichselektronenbeugungen von Bakterien mit *Granula* ergaben, daß die eingelagerten *Granula* metallisches Silber sind. In Abb. 4 ist einem solchen Feinbereichselektronenbeugungsdiagramm ein Debye-Scherrer-Diagramm einer dünnen aufgedampften Silberschicht gegenübergestellt, das unter denselben Bedingungen aufgenommen wurde. Die Übereinstimmung der einzelnen Beugungsringe ist deutlich zu erkennen, obgleich sich ein ganzes Bakterium sehr schlecht zu Beugungsaufnahmen eignet und die Bakterien als Schatten etwas die Aufnahmen stören.

Die im freien Gesichtsfeld liegenden Körnchen sind dagegen AgCl , wie Beugungsdiagramme bewiesen. Dieses AgCl war durch die Reaktion der freien Ag^+ -Ionen des *Argochroms* mit den Cl^- -Ionen der Nährbouillon entstanden. Manche in Autolyse befindlichen Bakterien reduzierten *Argochrom* noch zu *Ag-Granula*. Waren sie jedoch schon in einem stärkeren Zerfallstadium, dann verloren sie diese Eigenschaften, adsorbierten aber dafür AgCl -Körnchen, so daß im elektronenoptischen Durchstrahlungsbild kein Unterschied zu erkennen war. Feinbereichsbeugung machte jedoch deutlich, daß es sich um verschiedene Effekte handelte.

Variation der Argochromzugabebedingungen. Die *Granula* wurden in den *Coli*-bakterien gut erzeugt im Bereich von pH 6 bis pH 8. Außerhalb dieses pH-Bereiches wurden keine *Granula* in den Bakterien gebildet. Licht oder Dunkelheit beeinflussten die Bildung der *Ag-Granula* nicht merklich. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Anzahl und Größe der dargestellten *Ag-Granula* von der *Argochrome*einwirkungsdauer wurden die Kulturen erst zentrifugiert und das Sediment dann in einer *Argochrom*konzentration von 1:10000 in Fleischwasserbouillon resuspendiert. So gelang es, Tuffpräparate von Bakterien herzustellen, die nur 30 sec mit *Argochrom* behandelt worden waren. Nach dieser Zeit fanden sich in einigen Bakterien bereits *Ag-Granula*, die jedoch erst 50 bis 100 Å groß waren. Die maximale Anzahl der *Ag-Granula* in den Bakterien und ihre endgültige Größe von 200 bis 600 Å war nach etwa 15 min erreicht, längere Einwirkung von *Argochrom*

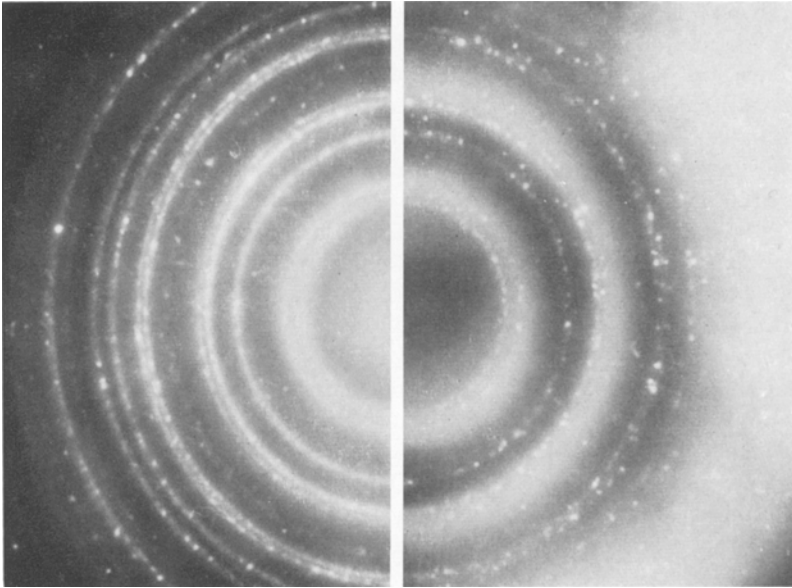


Abb. 4. Debye-Scherrer-Diagramm (Feinbereichselektronenbeugung) einer aufgedampften Ag-Schicht (links) und eines mit *Argochrom* behandelten *Coli-Bacteriums* (rechts)

vergrößerte sie nicht mehr. Die Reduktion war dann offenbar quantitativ abgelaufen, d. h. alle Ag^+ -Ionen der *Argochrom*-Lösung waren reduziert. Durch Erhöhung der *Argochrom*-Konzentration wurden die *Ag-Granula* zwar größer, jedoch nicht zahlreicher.

Die *Granulabildung* erwies sich als temperaturabhängig: nach 5 min *Argochrome*-Einwirkung bei 0°C waren die *Ag-Granula* so groß wie nach 30 sec Einwirkung bei 20°C . Bei einer Endkonzentration von 10^{-6} *Argochrom* erschienen vereinzelt *Ag-Granula*, jedoch waren sie im Tupfpräparat nur sehr schwach sichtbar und nur ca. 50 \AA groß.

Die *Ag-Granula* entstanden auch, wenn man die Bakteriensedimente mit physiologisch unterschiedlichen Lösungen wieder aufnahm. So wurden unbehandelte Bakteriensedimente aufgenommen in aqua dest., Fleischwasserbouillon, Traubenzuckerbouillon, Kochsalz- und Rohrzuckerlösungen und Ammonium-Acetat. Die so resuspendierten Bakterien wurden weiter wie Standardpräparate mit *Argochrom* behandelt und aufgearbeitet. Die direkte Zugabe von *Argochrom* zur Fleischwasserbouillonkultur brachte jedoch immer die höchste Ausbeute an *Granula* in den Bakterien.

Einfluß verschiedener physikalischer und biochemischer Eingriffe. Wurden die Bakterien durch UV-Bestrahlung oder durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht nach Thiopyroninzugabe inaktiviert und dann nach ca. 5 min *Argochrom* zugeetzt, so entstanden erheblich weniger und kleinere *Ag-Granula* in den Bakterien. Erhitzen der Kultur für 30 min auf 56°C zeigte denselben Effekt. Nach Abtöten mit Formalin oder H_2O_2 fand man keine *Ag-Granula* in den Bakterien.

Bei Standardpräparaten wurde das *Argochrom* in etwa einer Std entfärbt. Ließ man vor *Argochrom*-Zugabe Na-Citrat, Na-Fumarat oder Na-Succinat 15 min

auf die *Colikulturen* einwirken, um die entsprechenden Enzyme zu verstärkter Aktivität anzuregen, so entfärbte sich das *Argochrom* schneller und man fand weniger *Ag-Granula* in den Bakterien, dafür aber überwiegend *Ag-Granula* im freien Gesichtsfeld. Hier war offenbar das *Argochrom* schon im Kulturmedium reduziert worden.

Nach kompetitiver Hemmung der Succinatdehydrogenase durch Malonsäure wurde die *Ag-Granulabildung* in den Bakterien geringer. Hier fanden sich ebenfalls viele *Ag-Granula* außerhalb der Bakterien. Wurde die Atmungskette der Bakterien mit KCN blockiert, so entstanden keine intrazellulären *Ag-Granula*. Zweimaliges Waschen dieser Kulturen veranlaßte wieder die Bildung einiger solcher *Ag-Granula*, jedoch wurden dann auch viele freie *Ag-Granula* gefunden. Bei Zugabe von Na-Succinat, Na-Fumarat, Na-Citrat oder Na-Lactat nach KCN-Abtötung erschienen keine *Ag-Granula*.

Einfluß des Sauerstoffangebotes. Unbelüftete *E. coli* B.-Kulturen erreichten in Fleischwasserbouillon ohne eine ausgeprägte log-Phase die stationäre Wachstumsphase, während belüftete Kulturen eine charakteristische log-Phase durchliefen. Die Keimzahl unbelüfteter Kulturen in der stationären Phase (etwa 10^8 /ml) war nur ein Bruchteil der Zahl in belüfteten Kulturen derselben Phase (etwa 10^{11} /ml). Nach verschiedenen Bebrütungszeiten wurde *Argochrom* zu den Kulturen gegeben und wie bei den Standardpräparaten präpariert. Die *Ag-Granulabildung* war deutlich vom Sauerstoffangebot abhängig, da sie bei unbelüfteten Kulturen viel stärker war als bei belüfteten. Zellen gegen Ende der lag-Phase sowohl belüfteter wie unbelüfteter Kulturen, enthielten zahlreiche *Ag-Granula*, und zwar auch solche Bakterien, die sich gerade in Teilung befanden. In der frühen log-Phase (etwa nach 2 Std) nahm die Zahl der *Ag-Granula* pro Bakterium schnell ab, dafür wurden die einzelnen *Ag-Granula* größer. Von der Mitte der log-Phase (ab etwa 3 bis 4 Std Bebrütungsdauer) bis in die stationäre Phase hinein wurde von belüfteten Kulturen kein *Argochrom* mehr reduziert. Die Bakterien solcher dichter Kulturen zeigten im elektronenmikroskopischen Bild (Tupfpräparat) Verdichtungen und aufgelockerte Stellen. Unterbrach man die Belüftung in der log-Phase für wenigstens 30 min, dann wurde wieder *Argochrom* reduziert und man fand wieder *Ag-Granula* in den Bakterien (Abb. 5). Dieser Effekt wurde beschleunigt, wenn man statt Luft ebenso gereinigten Stickstoff durchperlte und damit den Sauerstoff zusätzlich austrieb.

Bei unbelüfteten Kulturen war diese Abhängigkeit der *Argochromreduktion* von den Wachstumsphasen nicht so ausgeprägt, aber auch noch deutlich vorhanden. In der log-Phase unbelüfteter Kulturen, d. h. nach 2 bis 6 Std, fand man meist nur ein oder zwei große *Ag-Granula* pro Bakterium. Mit fortschreitender stationärer Wachstumsphase wurden wieder zahlreichere und kleinere *Ag-Granula* in den Bakterien gefunden.

Einfluß anderer Nährlösungen. Wuchsen die *Colibakterien* über Nacht in Traubenzuckerbouillon und war also ihr Stoffwechsel auf die Vergärung des Zuckers eingestellt, so wurden sie dicker (etwa $3\ \mu\text{m}$ lang und $2\ \mu\text{m}$ breit) und hatten eine mehr elliptische Gestalt als die in Fleischwasserbouillon gewachsenen. Nur einige wenige Bakterien hatten die normale Größe (etwa $3\ \mu\text{m}$ lang und $1\ \mu\text{m}$ breit) und Form der in Fleischwasserbouillon gewachsenen Bakterien. Durch die Vergärung des Zuckers änderten die Kulturen ihr pH von 7 auf etwa 4,5. In diesem

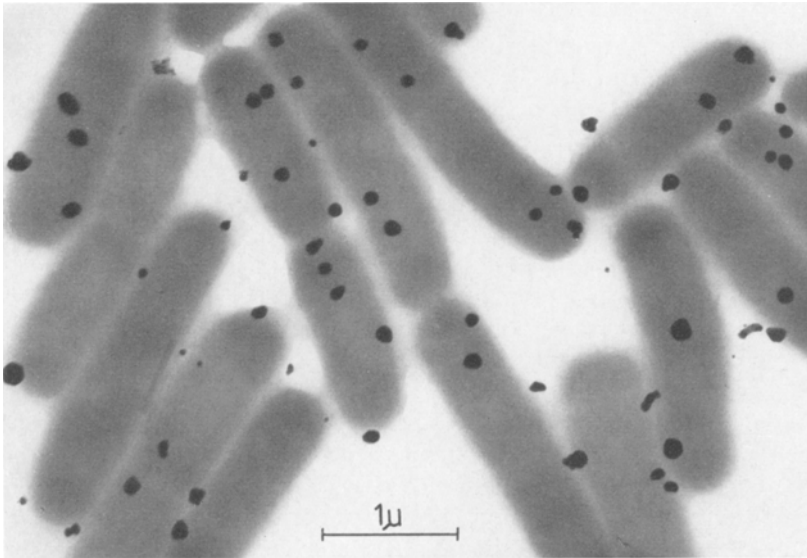


Abb. 5. 4stündige belüftete *E. coli* B.-Kultur. 1 Std unbelüftet, 15 min *Argochrom*einwirkung. (Endkonzentration 10^{-4}). Tupfpräparat. Vergrößerung ca. 20000 \times

pH-Bereich reduzierte jedoch auch eine Standardkultur das *Argochrom* nicht mehr. Stellte man die Kulturen mit NaOH auf pH 7 ein und gab dann *Argochrom* dazu, so lagerten nur die wenigen *normalgroßen* Bakterien Ag-Granula ein.

Die *Coli*bakterien wuchsen auch in anaerobem Milieu, das durch Na-Thioglycolatbouillon hergestellt wurde, sehr gut, jedoch reduzierten sie dann *Argochrom* nicht. Nahm man das Sediment einer Standard-Übernachtskultur mit 0,1% Na-Thioglycolatbouillon wieder auf und gab dann *Argochrom* dazu, so fand man auch keine intrazellulären Ag-Granula. Unbeimpfte Na-Thioglycolatbouillon reduzierte *Argochrom* in der Versuchszeit nicht.

Bei Versuchen mit einem synthetischen Nährboden [22] wurde nach einem von HAROLD [9] angegebenen Verfahren die Polyphosphatsynthese variiert. Dabei war kein Zusammenhang dieser Synthese mit der *Granulabildung* zu beobachten.

Untersuchungen an anderen Bakterien. Von den untersuchten gramnegativen Bakterien unterschied sich *Aerobacter aerogenes* im Aussehen, dem Wachstumsverhalten in den obigen Nährböden und in der Fähigkeit, *Argochrom* zu Ag-Granula zu reduzieren, nicht von *E. coli* B. Dagegen wurden bei *Proteus vulgaris* und *Pseudomonas pyocyanea* in Übernachtskulturen sehr viel weniger Ag-Granula und diese bei einem geringeren Anteil der Bakterien gefunden. Hier wirkte das Kulturmedium schon reduzierend, denn es fanden sich viele Ag-Granula außerhalb der Bakterien, wie Beugungsaufnahmen ergaben.

Von den untersuchten grampositiven Bakterien wurden nur bei Übernachtskulturen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus mycoides* in einem geringen Teil der Zellen Ag-Granula gefunden. Bei den wenigen hergestellten Schnitten dieser Bakterien wurde keine auffällige Zuordnung der Ag-Granula zu Substrukturen der Zellmembran, wie etwa den Mesosomen, gefunden. Alle untersuchten grampositiven Bakterien entfärbten *Argochrom* besonders rasch. So entfärbte z. B. eine be-

lüftete dicht bewachsene 6 Std alte Kultur von *Bac. subtilis* eine *Argochrom*-konzentration von 1:10000 innerhalb von 2 min, aber auch unbelüftete Übernachtskulturen mit wesentlich weniger Zellen benötigten dazu nur etwa 15 min. Außerhalb der Zellen lagen viele *Ag-Granula*, dafür waren keine im Zellinnern. Das *Argochrom* war also auch hier im Kulturmedium reduziert worden. Auch Übernachtskulturen von *Staphylococcus aureus* reduzierten *Argochrom* schneller (ca. 20 min) als die von *E. coli* B. Das Filtrat einer solchen *St. aureus*-Kultur war aber nicht imstande, *Argochrom* zu reduzieren. Kochte man das Filtrat 5 min und nahm nach Abkühlung ein *Kokkensediment* damit auf, so wurde *Argochrom* wieder reduziert. Nahm man ein Sediment einer *St. aureus*-Übernachtskultur in frischer Fleischwasserbouillon auf, so wurde wesentlich weniger *Argochrom* von der Flüssigkeit reduziert, die *Staphylokokken* hatten dann aber vereinzelt *Ag-Granula* eingelagert. Inaktivieren der *Staphylokokken* durch Erhitzen auf 100 °C oder durch Belichtung nach Thiopyroninzugabe verhinderte die Reduktion. Nur in Anwesenheit lebender Bakterien fand also die Reduktion des *Argochroms* statt.

Nachweis reduzierender Enzyme durch Kalium-Tellurit. Übernachtskulturen von *E. coli* B. reduzierten Kalium-Tellurit zu nadelförmigen Tellurkristallen. War die Reduktion nicht ganz vollständig, so fand man *granuläre* Telluroxide. Diese Telluroxide konnten durch nachträgliche Einwirkung oxidierender Substanzen aus den nadelförmigen Tellurkristallen gebildet worden sein. Eine Lokalisation der Tellurkristalle ließ sich auch auf Schnitten schwer exakt angeben, da schon während der Fixierung mit Glutaraldehyd oder Osmiumsäure die meisten Tellurkristalle wieder gelöst oder oxidiert wurden. Dies geschah offenbar schon so früh und so schnell, daß die dadurch entstandenen Löcher noch vor der endgültigen Fixierung wieder geschlossen wurden. Die wenigen verbliebenen Tellurkristalle oder die etwas häufiger entstandenen *granulären* Telluroxide ließen keine bevorzugten Ablagerungsorte erkennen.

Belüftete Kulturen von *E. coli* B. reduzierten ebenfalls Kalium-Tellurit. Die Telluritreduktion hing nicht deutlich von der Wachstumsphase ab, wie dies für die *Argochrom*reduktion gefunden wurde. Ebenso reduzierten auch pH-korrigierte Traubenzuckerbouillonkulturen Kalium-Tellurit. Nach KCN-Hemmung fanden sich jedoch nur vereinzelt Tellurkristalle in den Bakterien.

Gab man zu einer Übernachtskultur von *E. coli* B. ein Gemisch von *Argochrom* und Kalium-Tellurit, so kamen *Ag-Granula* und Tellurkristalle gemeinsam in den Bakterien vor. Ließ man dagegen 30 min nach *Argochrom*zugabe noch Kalium-Tellurit einwirken, so wurden zwar viele *Ag-Granula*, aber kaum noch Tellurkristalle in den Bakterien gefunden. Entsprechend ergab der umgekehrte Versuch zahlreiche Tellurkristalle, aber kaum *Ag-Granula*, wenn man Kalium-Tellurit 30 min vor dem *Argochrom* zusetzte. Durch vorherige Methylenblauzugabe war die *Argochrom*- bzw. Kalium-Telluritreduktion nicht zu beeinflussen.

Von den Übernachtskulturen der untersuchten grampositiven Bakterien wurde Kalium-Tellurit nur in Zellen von *Bac. subtilis* reduziert. In Übernachtskulturen von *St. aureus* und *albus* sowie *Sarcina lutea* wurde kein Kalium-Tellurit intrazellulär reduziert, dafür fanden sich Tellurkristalle im freien Gesichtsfeld, genauso wie es für die *Ag-Granula* bei *Argochrom*-behandelten Kulturen beschrieben wurde.

Diskussion

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß unter bestimmten Bedingungen durch *Argochrom Granula* in Bakterien erzeugt wurden. Zu ihrer Identifizierung dienten Feinbereichselektronenbeugungen. Sie ergaben eindeutig die Debye-Scherrer-Diagramme des metallischen Silbers, die deutlich von den Beugungsdiagrammen unbehandelter Bakterien bzw. Bakterienwänden abwichen (vgl. [4, 31]). Aber auch die Tatsache, daß die *Granula* in den Bakterien nach Lockerung der Zellwand durch Lysozym mit photographischem (*physikalischem*) Entwickler bevorzugt verstärkt wurden, spricht für metallisches Silber.

Die Versuche mit dem Entwickler zeigten zugleich die Lokalisation der *Ag-Granula* an: Da die *Ag-Granula* nur nach Abbau der Zellwand verstärkt wurden, mußten sie innerhalb der Zellwand liegen. Auf den Schnittbildern (Abb. 2 u. 3) ist eindeutig zu erkennen, daß die *Ag-Granula* meist zwischen Zellwand und Cytoplasmamembran abgelagert sind. Damit war zunächst nur eine Übereinstimmung in der Lokalisation der *Ag-Granula* mit den durch Kalium-Tellurit [17, 18, 38, 39] und durch Tetrazoliumsalzen [23, 24, 27, 33, 34] markierten Umsatzorten reduzierender Enzyme in Bakterien gegeben (vgl. [25]). Die weiteren Versuche sollten daher klären, ob die Reduktion des *Argochroms* zu Silber durch die Enzyme der Atmungskette verursacht wird. Diese Enzyme sind zu einem Multi-Enzymkomplex verbunden, dessen einzelne Enzyme untereinander in einem Fließgleichgewicht stehen [20, 32]. Schaltet man ein Enzym aus, so ist die Aktivität des gesamten Multi-Enzymkomplexes gestört [5, 19]. Es ist bekannt [2], daß man mit dem Austritt von Enzymen aus der Zelle rechnen muß, wenn durch Reize, wie Substratmangel, Zellgifte oder Steigerung spezifischer Zelleistungen, der normale Zellstoffwechsel beeinflußt wird. Es ist daher verständlich, wenn ein reduzierendes Enzym — nicht unbedingt das z. B. durch Malonsäure oder Na-Succinat beeinflusste — in das Kulturmedium abgegeben wird und dadurch die zugegebenen Substanzen, wie *Argochrom* oder Kalium-Tellurit, schon in der Kulturflüssigkeit reduziert werden. Da diese Tatsache nicht immer berücksichtigt wurde, sind in der Literatur unterschiedliche Enzyme für die Reduktion derselben Stoffe (Kalium-Tellurit oder Tetrazoliumsalze) verantwortlich gemacht worden [15, 17, 18, 23, 24, 33, 34, 38, 39, 41].

Mit den hier geschilderten Versuchen ist es nicht gelungen, die Reduktion des *Argochroms* zu Silber auf ein einzelnes Enzym der Atmungskette zurückzuführen. Die Sauerstoffabhängigkeit (s. u.) spricht für eine Beteiligung der Cytochromoxidasen an der Reduktion des *Argochroms*, jedoch ließ sich durch Beeinflussung der Succinatdehydrogenase die *Granulabildung* ebenfalls variieren. Aus den oben genannten Gründen ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch noch andere reduzierende Enzyme beteiligt sind. Von den Cytochromoxidasen ist bekannt, daß sie durch KCN in der oxidierten Phase stabilisiert werden [29, 40]. Aber auch für die Succinatdehydrogenase ist eine Inaktivierung durch KCN beschrieben worden [36]. Man konnte also von KCN keine selektive Enzyminaktivierung erwarten, jedoch eignete es sich zur Einengung des in Frage kommenden Enzymsystems. Da sowohl die *Argochromreduktion* als auch die Kalium-Telluritreduktion in Bakterien von KCN unterbunden wird, läßt sich schließen, daß dasselbe Enzym-system für die Reduktion dieser Substanzen verantwortlich ist. Das Ausbleiben

der *Granula* bei belüfteten Kulturen, bzw. die Verringerung der Anzahl der *Granula* während der log-Phase bei unbelüfteten Kulturen könnte auf eine Beteiligung der Cytochromoxidasen hinweisen, denn bei einem konkurrierenden Angebot von Sauerstoff und *Argochrom* werden die Bakterien die Substanz wählen, die sie leichter reduzieren können. Dies ist der Sauerstoff, wenn sie auf aerobes Wachstum eingestellt sind [21, 37].

E. coli B. gehört zu den fakultativen Anaerobiern, d. h. die Zellen geben je nach dem Bedarf des Stoffwechsels ihre Elektronen entweder über die Cytochromoxidasen an O_2 oder über die Flavin-Enzyme an andere Elektronenakzeptoren ab [19]. Es ist daher zu verstehen, daß *Coli*bakterien, die unter anaeroben Bedingungen gewachsen waren, wie sie z. B. in Na-Thioglycolatbouillon vorliegen, kein *Argochrom* reduzieren. Dies spricht wiederum für eine Beteiligung der Cytochromoxidasen an der *Argochrom*reduktion. Es ist beschrieben worden [8, 14], daß die Atmung der fakultativen Anaerobier sehr rasch umgestellt werden kann. Damit wäre erklärbar, warum eine Übernachtkultur von *E. coli B.* keine *Granula* mehr bildete, wenn man ihr Sediment mit Na-Thioglycolat aufnahm und dann erst *Argochrom* zugab. Dies wird immer dann möglich sein, wenn die Atmung innerhalb weniger min von aerob auf anaerob umgeschlagen war. Es ist bekannt, daß auch Glucosezugabe die Aktivität der Atmungsenzyme hemmt [8, 43]. Die in Traubenzuckerbouillon gewachsenen *Coli*bakterien haben ihren Stoffwechsel auf Vergärung eingestellt und haben damit auch die Fähigkeit verloren, *Argochrom* zu reduzieren. Eine Zwischenstellung bei der Erzeugung anaerober Zustände nahm der Stickstoff ein. Er beeinflusste nicht so stark die Umstellung von aerober auf anaerobe Atmung, sondern beschleunigte nur die Wirkung, die bei Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr aufgetreten wäre.

Wurden die Bakterien ohne direkte Beeinflussung der Atmungskette inaktiviert (z. B. durch UV oder Thiopyronin plus Licht), so konnte immer noch etwas *Argochrom* reduziert werden. Wurde die Zellwand oder das Cytoplasma so verändert, daß ein Eindringen des *Argochroms* nicht mehr möglich war, so wurden keine *Granula* in den Bakterien gefunden, z. B. bei Abtötung durch Formalin. Die Abhängigkeit der Darstellung reduzierender Enzyme durch *Argochrom* von dem Zellwandaufbau (grampositiv bzw. gramnegativ) der Bakterien zeigte sich an den Bakterien, die als gramlabil bekannt sind, wie *Bac. mycoides* und *Bac. subtilis*: nur dann waren Ag-*Granula* eingelagert, wenn die Bakterien eine dünne Zellwand hatten. Da bei den untersuchten grampositiven Bakterien das *Argochrom* schon in der Kulturflüssigkeit reduziert worden war, ist es auch denkbar, daß hier ein hitzeresistenter Teil der Enzyme freigesetzt wurde, der jedoch nur bei Anwesenheit anderer, noch an die lebenden Bakterien gebundener Substanzen reduzierend wirkt.

Argochrom besitzt offenbar genau die Eigenschaften, die Substanzen zur Darstellung der Umsatzorte reduzierender Enzyme im Elektronenmikroskop haben sollten [28], nämlich Reaktion mit lebenden Zellen im Kulturmedium und elektronendichte Ablagerungen, die auch durch Einbettungsvorgänge nicht verändert werden. *Argochrom* zeigte keinen elektronenmikroskopisch erkennbaren Einfluß auf die Struktur der Bakterien, weder bei jungen belüfteten Kulturen noch bei Übernachtkulturen. Mit der gewählten *Argochrom*konzentration von 10^{-4} ließen

sich solch typische *Granula* erzeugen, daß man auch in Tupfpräparaten feststellen konnte, ob eine Reduktion des *Argochroms* in den Bakterien stattgefunden hatte oder nicht. Mit der Reduktion von *Argochrom* zu Silber und der makroskopisch erkennbaren Entfärbung des Farbstoffes war es möglich, Zeitunterschiede in der Reduktion festzustellen und anhand von Beugungsaufnahmen auch eindeutig nachzuweisen, wo die Reduktion stattgefunden hatte: außerhalb der Bakterien oder an bestimmten Strukturen innerhalb der Bakterien. Die unterschiedliche Häufigkeit und die unterschiedliche Größe der in den Bakterien entstandenen *Granula* könnten Anzeichen unterschiedlicher Aktivität der Enzymsatzorte sein. Durch die gewonnenen Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß für die Reduktion des *Argochroms* die reduzierenden Enzyme der Atmungskette verantwortlich sind. Wegen des geschilderten Verhaltens eines Multi-Enzymkomplexes erscheint es jedoch fraglich, ob mit histochemischen Methoden eine Einengung auf ein einzelnes Enzym möglich sein wird.

Herrn Prof. Dr. K. HERZBERG, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. B. RAJEWSKY und Herrn Prof. Dr. R. W. KAPLAN danke ich für Anregungen und Diskussionen. Frau C. PLESCHER danke ich für ihre Mitarbeit bei den technischen Arbeiten.

Literatur

1. ANGERER, E. v., u. G. JOOS: Wissenschaftliche Photographie. Leipzig: Akad. Verlagsges. 1954.
2. BERGMAYER, H. U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH 1962.
3. BERNHARD, H.: Untersuchungen über die desinfizierende Wirkung einiger neuer Silberpräparate. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **85**, 46 (1921).
4. CARITO, S. L., S. L. BAZIL, and G. DI GIACOMO: X-ray diffraction studies on selected bacterial cell walls. J. Bact. **93**, 122 (1967).
5. DOLIN, M. I.: Survey of microbial electron transport mechanisms. In: The bacteria, Vol. II Metabolism, p. 319. Eds. GUNSALUS, I. C., and R. Y. STANIER. New York, London: Acad. Press 1961.
6. EDELMANN, A., u. A. v. MÜLLER-DEHAM: Neue therapeutische Versuche bei allgemeinen und lokalen Infektionen. Dtsch. med. Wschr. **39**, 2292 (1913).
7. — — Zur Behandlung septischer Allgemeininfektionen mit Methylenblau-Silber (*Argochrom*). Dtsch. med. Wschr. **43**, 715 (1917).
8. GRAY, C. T., J. W. T. WIMPENNY, and M. R. MOSSMANN: Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effect of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *E. coli*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **117**, 33 (1966).
9. HAROLD, F. M.: Inorganic polyphosphates in biology: Structure, metabolism, and function. Bact. Rev. **30**, 772 (1966).
10. HERZBERG, K.: Weitere Untersuchungen über die Zerstörbarkeit des *Variola-Vakzinevirus* durch Lichtenergie und Farbstoffe. Z. Immun.-Forsch. **80**, 507 (1933).
11. — Hemmwirkung von Farbstoff-Metallsalz-Verbindungen auf *Vaccinevirus in vitro* und *in vivo*. Naturwissenschaften **51**, 22 (1964).
12. —, u. K. REUSS: Pers. Mitteilung (1964).
13. — — und R. DAHN: Photodynamische Wirkung und Virusinaktivierung durch Methylenblau und Thiopyronin. Naturwissenschaften **50**, 376 (1963).
14. HOLLMANN, S., u. E. THOFERN: Über den Einfluß des Sauerstoffes auf die endogene Atmung gramnegativer Darmbakterien. Naturwissenschaften **42**, 586 (1955).
15. HORWITZ, C. A., L. BENITZ, and M. BRAY: The effect of coenzyme Q on the histochemical succinic tetrazolium reductase reaction: A histochemical study. J. Histochem. Cytochem. **15**, 216 (1967).

16. HÜLSER, D. F.: Darstellung von Reduktionsorten in Bakterien durch *Argochrom*. Vortrag auf der 13. Tagung für Elektronenmikroskopie vom 17. bis 21. Sept. 1967 in Marburg.
17. VAN ITERSON, W., and W. LEENE: A cytochemical localisation of reductive sites in an grampositive bacterium. *J. cell. Biol.* **20**, 361 (1964).
18. — — A cytochemical localisation of reductive sites in a gramnegative bacterium. *J. cell. Biol.* **20**, 377 (1964).
19. JACHERTS, D., u. B. JACHERTS: Elemente der Bakterienphysiologie. Frankfurt am Main: Akad. Verlagsges. 1964.
20. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 5. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme 1966.
21. KELLENBERGER, E., and A. RYTER: Selected applications of the electron microscope, Chapter 7 in bacteriology. In: Modern developments in electron microscopy, p. 335. Ed. B. M. SIEGEL. New York, London: Acad. Press 1964.
22. KENNEL, D., A. KOTULAS, and S. L. MARCHESI: Magnesium starvation of *Aerobacter aerogenes*, I—IV. *J. Bact.* **93**, 334 (1967).
23. LEENE, W., and W. VAN ITERSON: Tetranitro-blue tetrazolium reduction in *Bacillus Subtilis*. *J. cell Biol.* **27**, 237 (1965).
24. — — Tetranitro-blue tetrazolium reduction in *Proteus Vulgaris*. *J. cell. Biol.* **27**, 241 (1965).
25. MARR, A. G.: Localisation of enzymes in bacteria. In: The bacteria, Vol. I. Structure, p. 443. Eds. GUNSALUS, I. C., and R. Y. STANIER. New York, London: Acad. Press 1960.
26. MORTON, H. R., and T. F. ANDERSON: Electron microscopic studies of biological reactions. I. Reduction of potassium tellurite by *Corynebacterium Diphtheriae*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **46**, 272 (1941).
27. NIKLOWITZ, W.: Mitochondrienäquivalente bei *E. coli*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **173**, 12 (1958).
28. PEARSE, A. G. E.: Some aspects of the localisation of enzyme activity with the electron microscope. *J. roy. micr. Soc.* **81**, 107 (1963).
29. RAUEN, H. M. (Hrsg.): Biochemisches Taschenbuch, Erster Teil. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
30. RYTER, A., E. KELLENBERGER, A. BIRCH-ANDERSEN, et O. MAALØE: Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. *Z. Naturforsch.* **13b**, 597 (1958).
31. SALTON, M. R. J.: The bacterial cell wall. Amsterdam, London, New York: Elsevier P.C. 1964.
32. SCHWEIZER, E.: Übereinheiten bei Enzymen (Multienzymkomplexe). In: Molekular-Biologie, p. 109. Hrsg. WIELAND, T., u. G. PFLEIDERER. Frankfurt am Main: Umschau Verlag 1967.
33. SEDAR, A. W., and R. M. BURDE: Localisation of the succinic dehydrogenase system in *Escherichia Coli* using combined techniques of cytochemistry and electron microscopy. *J. cell Biol.* **24**, 285 (1965).
34. — — The demonstration of the succinic dehydrogenase system in *Bacillus Subtilis* using tetranitro-blue tetrazolium combined with techniques of electron microscopy. *J. cell Biol.* **27**, 53 (1965).
35. SIMON, M. L., and H. VAN VUNAKIS: The photodynamic reaction of methylenblue with deoxyribonucleic acid. *J. molec. Biol.* **4**, 488 (1962).
36. SINGER, TH. P., and E. B. KEARNEY: Succinate dehydrogenase. In: The enzymes, 2nd ed., Vol. 7, p. 383. Eds. BOYER, P. D., H. LARDY, and K. MYRBÄCK. New York, London: Acad. Press 1963.
37. SMITH, L.: Cytochrome systems in aerobic electron transport. In: The bacteria, Vol. II. Metabolism, p. 365. Eds. GUNSALUS, I. C., and R. Y. STANIER. New York, London: Acad. Press 1961.
38. TCHAN, Y. T., and A. J. WEBBER: Fine structure and tellurite reduction in *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Mikrobiol.* **54**, 215 (1966).
39. TERAI, T., T. KAMAHORA, and Y. YAMAMURA: Tellurite reductase from *Mycobacterium avium*. *J. Bact.* **75**, 535 (1958).

40. THIMAN, K. v.: Das Leben der Bakterien, Wachstum, Stoffwechsel und Verwandtschaftsbeziehungen. Deutsche Ausgabe nach einem Manuskript zur 2. erweiterten und verbesserten Auflage (1963). Jena: VEB Gustav Fischer 1964.
41. VANDERWINKEL, E., et R. G. E. MURRAY: Organelles intracytoplasmiques bactériens et site d'activité oxydo-reductrice. *J. Ultrastruct. Res.* **7**, 185 (1962).
42. WACKER, A., G. TÜRCK und A. GERSTENBERGER: Zum Wirkungsmechanismus photodynamischer Farbstoffe. *Naturwissenschaften* **50**, 377 (1963).
43. WHITE, D. C.: Effect of glucose on the formation of the membrane-bound electron transport system in *haemophilus parainfluenzae*. *J. Bact.* **93**, 567 (1967).

Dr. D. F. HÜLSER
Abt. für physikalische Biologie
Max-Planck-Institut für Virusforschung
7400 Tübingen, Spemannstraße 35