



Title	ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER BAKTERIENATMUNG DURCH NITROPHENOL, THYMOL, NAPHTHOL UND EINIGE VERWANDTEN VERBINDUNGEN
Author(s)	USAMI, Shoichiro
Citation	Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series 5, Botany, 7(1), 1-78
Issue Date	1948
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26300
Type	bulletin (article)
File Information	7(1)_P1-78.pdf



[Instructions for use](#)

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER BAKTERIEN- ATMUNG DURCH NITROPHENOL, THYMOL, NAPHTHOL UND EINIGE VERWANDTEN VERBINDUNGEN

Von

Shoichiro USAMI

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Methodisches	4
V Versuchsergebnisse	
A. Hemmung der Atmung	
1. Nitrophenole	5
2. Dinitrophenole	13
3. Trinitrophenol	18
4. Dinitronaphthol	23
5. Phenol	24
6. Salicylsäure	25
7. Thymol	27
8. Naphthol	33
B. Wirkungsweise des Nitrophenols	
1. Reversibilität der Hemmung	38
2. Einfluss des p-Nitrophenols auf die Oxydationsweise von Glu- cose und auf RQ	46
3. Zusammenwirkung des p-Nitrophenols und des Kaliumcyanids auf Bakterienatmung	54
4. Einfluss auf Bakterienwachstum	58
Schlussbetrachtungen	61
Zusammenfassung	72
Versuchsprotokolle	75

EINLEITUNG

Es ist wohl bekannt, dass der Hemmungsversuch in der At-
mungsphysiologie eine grosse Rolle spielt. Spezifisches Atmungsgift

hemmt spezifische Teilreaktion der Zellatmung. Unsere Kenntnisse über die komplizierten Mechanismen der Zellatmung haben durch die Aufklärung der Wirkungsweisen der Atmungsgifte eine merkwürdige Förderung erfahren. So z.B. ist die Blausäure bekanntlich ein typisches Atmungsgift. Blausäure hemmt die Hämkatalyse im Vorgang der Zellatmung. Dagegen bleiben unsere Kenntnisse über die spezifischen Hemmungsstoffe einer anderen Teilreaktion der Atmung, d.h. des Dehydrasesystems lückenhaft. Die Versuche über die Dehydrasegifte finden sich in den Berichten früherer Autoren nur zerstreut. Eine vollständigere und systematische Untersuchung über die Wirkungen von Giftsubstanzen auf die Oxydationen verschiedener Substratarten unter möglichst vergleichbaren Versuchsbedingungen wäre deshalb zweifellos von Interesse.

Ich habe in der früheren Mitteilung¹⁾ über die Wirkung von oberflächenaktiven Substanzen wie Toluol und Xylol auf die Sauerstoffaufnahme und Methylenblaureduktion der Bakterien in Anwesenheit verschiedener Atmungssubstrate berichtet. Toluol und Xylol hemmen die Alkohol-, Glycerinphosphorsäure-, Äpfelsäure-, Citronensäuredehydrase usw., dagegen bleiben die Bernsteinsäure-, Milchsäure- und Ameisensäuredehydrase gegen genannte oberflächenaktive Substanzen resistent.

Im vorliegenden Versuche habe ich mich mit den verschiedenen Nitrophenolen und anderen Phenolderivaten beschäftigt. Im ersten Teil dieser Arbeit wird versucht festzustellen, inwieweit die bakteriellen Veratmungen verschiedener Substratarten sich gegenüber den genannten Hemmungsstoffen einheitlich verhalten oder ob Abweichungen von der Art der Substrate, wie sie bei der Toluolhemmung beobachtet wurden, auftreten. Die folgenden Phenolkörper wurden auf ihre Fähigkeit, die Bakterienatmung zu beeinflussen, geprüft:

p-, m-Nitrophenol,
 α -, β -, γ -Dinitrophenol,
Trinitrophenol,

1) S. USAMI: Acta Phytochim., 12 (1941), 9.

Dinitronaphthol,
Dinitronaphtholsulfonsäure,
Phenol,
Thymol, und
 α -Naphthol.

Unter diesen Substanzen sind die Dinitrophenole von mehreren Autoren von verschiedenen Standpunkten aus wiederholt behandelt worden. Betreffs des Verhaltens des Dinitrophenols gegenüber Zellatmung gibt es auch in der Literatur viele Arbeiten, welche sich hauptsächlich mit der Atmung von tierischen Materialien und von Hefen beschäftigen. Über den Einfluss genannter Substanz auf die Bakterienatmung liegen dagegen nur wenige Arbeiten vor. Fernerhin sind bisherige Versuche nur auf die Veratmung von Glucose beschränkt. Es erscheint uns nicht bedeutungslos, die Wirkungen derartiger Substanzen auf Bakterienveratmungen von den für die Bakterienatmung oft in Betracht kommenden verschiedenen Atmungssubstraten zu studieren. Bei meinen Versuchen dienten als Atmungssubstrat der Bakterien die folgenden Substanzen:

Ameisensäure,	Milchsäure,
Essigsäure,	Brenztraubensäure,
Bernsteinsäure,	Äpfelsäure,
Fumarsäure,	Citronensäure,
Äthylalkohol,	Glucose,
Acetaldehyd,	Alanin, und
Glycerin,	Glutaminsäure.
Glycerinphosphorsäure,	

Die Wirkungen anderer Nitroverbindungen des Phenols als Dinitrophenol auf die Bakterienatmung sind bis heute noch nicht erforscht worden. Ferner hinsichtlich des Einflusses von Thymol und Naphthol auf Zellatmung liegt, soweit mir bekannt, keine Angabe in der Literatur vor.

Im zweiten Teile dieser Arbeit wird die Wirkungsweise der

Phenolderivate, insbesondere die des Nitrophenols, auf die Bakterienatmung etwas eingehend untersucht. Dann habe ich auf Grund der erhaltenen experimentellen Resultate einige Diskussionen bezüglich der Wirkungsnaturen betreffender Phenolverbindungen und ferner in Zusammenhang damit bezüglich der Oxydationsmechanismen verschiedener Substrate beim Stoffwechsel der Zellen angestellt.

METHODISCHES

Als Versuchsorganismus habe ich hauptsächlich *Proteus vulgaris* verwendet, da *Proteus* einer Bakteriengruppe angehört, welche nach zwei- oder dreimaligem Auswaschen auf der Zentrifuge nur eine vernachlässigbar geringe Atmungsgrösse zeigt, eine Eigenschaft, welche für die Untersuchung der Atmung unter Zusatz verschiedener Substrate sehr geeignet ist. Als Kontrollversuch dienten einige anderen Bakterienarten, nämlich *Bacillus coli communis*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacterium prodigiosum*, *Bacillus fluorescens albus* und *Staphylococcus citreus*.

Die Bakterien wurden im allgemeinen auf Pepton-Bouillon-Agar bei 37° im Brutschrank etwa 20 Stunden lang kultiviert. Wie bei den früheren Versuchen, wurde die Bakterienmasse mit dem Spatel gesammelt, in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert, durch Zentrifuge dreimal gewaschen und schliesslich in derselben Kochsalzlösung suspendiert. Die Bakteriensuspension in diesem Zustande wurde in den Versuchen benutzt.

Die Messung der Atmung erfolgte manometrisch mittels des BARCROFTSchen Manometers. Versuchstemperatur war stets 30°. Die Gasräume von Manometergefässen wurden mit Luft gefüllt. Das Reaktionsmilieu in Gefässen war, wenn nicht anders bemerkt, folgendermassen zusammengesetzt:

0,5 ccm Bakteriensuspension,	}im Hauptraum,
0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/4, pH 7,2),	
0,5 ccm Substratlösung (m/6),	
0,5 ccm dest. Wasser,	

0,5 ccm Giftlösung oder dest. Wasser (im Kontrollgefäß),... in der Ansatzbirne,
0,5 ccm KOH-Lösung (10%)..... im Einsatz.

Jedes Kompensationsgefäß wurde mit demselben Lösungsgemisch wie im entsprechenden Versuchsgefäß, mit Ausnahme der Bakterien-suspension, beschickt. Die Ablesung der Manometeraus-schläge erfolgte in je 10-minütigem Abstand, und jeder Versuch dauerte im allgemeinen 60 bis 120 Minuten.

Die Intensität der Wirkung verschiedener Giftsubstanzen auf die Atmung, wenn irgendein Substrat zugegeben wird, lässt sich durch folgenden relativen Wert ausdrücken:

$$\frac{\text{Atmung in Anwesenheit von Giftsubstanz}}{\text{Atmung in Abwesenheit von Giftsubstanz}} \times 100.$$

Dieser Wert wird in den folgenden Tabellen als "Relative O₂-Aufnahme" bezeichnet.

Die Atmungsgrösse wurde wie üblich mit Q_{O₂} bezeichnet, d.h. die durch die Bakterien von 1 mg Trockengewicht in 1 Stunde aufgenommene Sauerstoffmenge in cmm.

Alle organischen Säuren wurden vor der Anwendung als Substrat stets neutralisiert.

VERSUCHSERGEBNISSE

A. HEMMUNG DER ATMUNG

1. Nitrophenole

Zunächst wurde p-Nitrophenol untersucht. p-Nitrophenol übt eine spezifische Wirkung auf die Atmung von Bakterien aus. Seine Wirkung ist je nach der Art der zugegebenen Atmungssubstrate ganz verschieden. Die Oxydation der Bernsteinsäure durch *Proteus vulgaris* erleidet durch p-Nitrophenol eine auffallend starke Hemmung. Die Sauerstoffaufnahme durch die Suspension von *Proteus vulgaris* bei Zugabe der Bernsteinsäure bei pH 7,2 wird durch p-Nitrophenol in 10⁻³ Molarer Konzentration beinahe vollständig abgestellt.

TABELLE I.

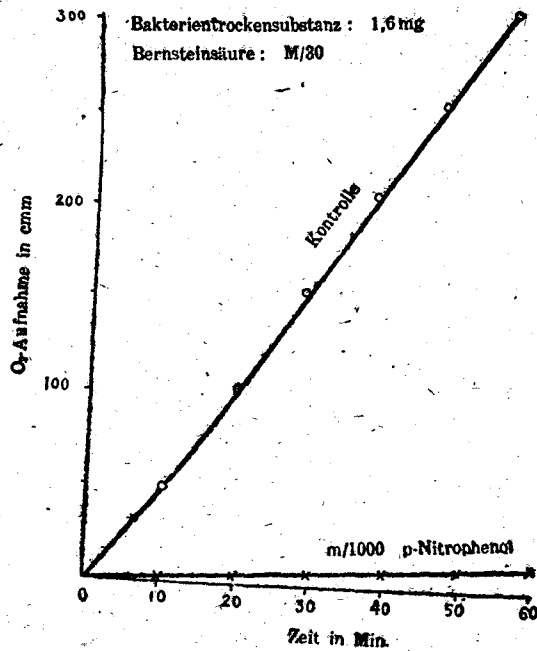
Einfluss des p-Nitrophenols auf die Bernsteinsäureoxydation
von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,6 mg. Bernsteinsäure: m/30
pH 7,2. 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm.	
	Ohne p-Nitrophenol	Mit m/1000 p-Nitrophenol
10	50,0	1,8
20	101,3	4,3
30	153,8	6,5
40	203,2	8,6
50	250,5	10,8
60	298,7	12,9
Q ₀₂	187	8
Hemmung		95,7 %

Fig. 1.

(vgl. Tabelle I)



Die Hemmung tritt sobald nach Zusatz des Nitrophenols auf, und keine Incubationszeit ist für das Auftreten der Hemmung erforderlich. Ferner, wie in der Tabelle I und Fig. 1 ersichtlich, bleibt die Hemmung der Bernsteinsäureveratmung durch p-Nitrophenol zeitlich unverändert, und folglich verläuft die Kurve der Sauerstoffaufnahme praktisch linear.

Während die Bernsteinsäureoxydation von *Proteus vulgaris* durch p-Nitrophenol in sehr niedriger Konzentration nahezu vollständig gehemmt wird, erfährt die Sauerstoffaufnahme bei Zugabe der Glucose unter denselben Bedingungen und durch sämtliche Konzentration des p-Nitrophenols keine Hemmung, sondern merkwürdigerweise während der ersten Stunden eher eine Beschleunigung. Die aufgenommene Sauerstoffmenge bei pH 7,2 unter Zugabe von m/1000 p-Nitrophenol beträgt um 84,7% mehr als diejenige des Kontrollversuchs mit unvergifteten Bakterienzellen. Zeitlicher Verlauf der Nitrophenolwirkung auf die Glucoseoxydation ist in der Tabelle II und Fig. 2 angegeben. Auch in diesem Falle war die erhaltene Atmungskurve nahezu eine gerade Linie.

Übrige Oxydationssysteme von *Proteus vulgaris* sind je nach den Substratarten für p-Nitrophenol verschieden empfindlich. Die Atmungen in Gegenwart von verschiedenen Substraten wurden auf ihre Verhalten gegen p-Nitrophenol untersucht. Die experimentellen Resultate über die Hemmungsgrade bei verschiedenen Substraten sind in Tabelle III zusammengestellt. Wie beim Fall von Bernsteinsäureoxydation wurden die Oxydationen von Fumarsäure, Citronensäure, Essigsäure, Alanin und Glutaminsäure in den Versuchsbedingungen in hohem Grade geschädigt. p-Nitrophenol wirkt ferner hemmend auf die Oxydationssysteme von Brenztraubensäure, Glycerinphosphorsäure, Äthylalkohol und Glycerin. Allerdings stehen die Empfindlichkeiten dieser Oxydationssysteme gegen p-Nitrophenol erheblich hinter der des Systems von Bernsteinsäureoxydation zurück. Dagegen ist die Milchsäureoxydation gegen Einwirkung des p-Nitrophenols ganz unempfindlich, und vielmehr wird die Sauerstoffaufnahme unter Zugabe von Ameisensäure durch p-Nitrophenol in demselben

TABELLE II.

Einfluss des p-Nitrophenol auf die Glucoseoxydation
von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,2mg Glucose: m/30 pH 7,2. 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm.	
	Ohne p-Nitrophenol	Mit m/1000 p-Nitrophenol
10	18,0	24,5
20	25,4	49,6
30	38,4	74,7
40	51,7	99,2
50	66,8	123,4
60	79,2	146,3
Q ₀₂	66	122
Beschleunigung	—	84,7 %

Fig. 2.

(vgl. Tabelle II)

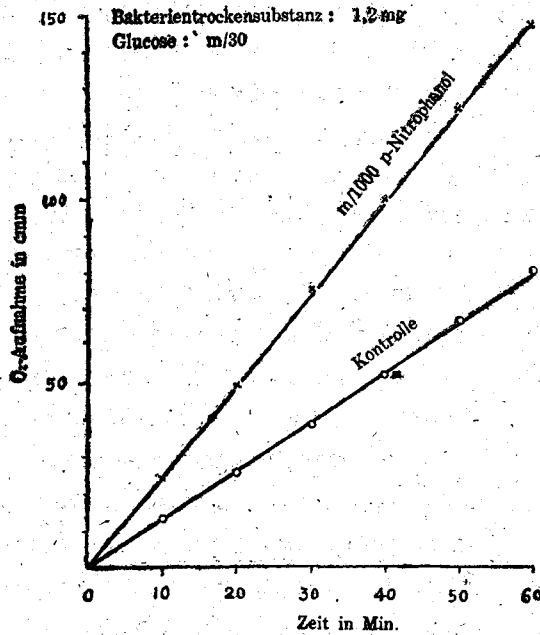


TABELLE III.

Wirkung des m/1000 p-Nitrophenols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substratkonzentration: m/30. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten, wie im methodischen Abschnitt dieser Mitteilung beschrieben, die aufgenommenen prozentualen O₂-Mengen gegen giftlose Atmung.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	pH 6,4	pH 7,2	pH 7,6
Bernsteinsäure	3,8	4,3	6,1
Fumarsäure		1,5	
Citronensäure	2,2		
Alanin	2,8	11,2	28,8
Glutaminsäure	2,0		7,0
Milchsäure	94,6	109,8	115,0
Ameisensäure	124,2	185,7	157,6
Glucose	59,9	184,7	248,2
Brenztraubensäure	12,1	32,8	
Glycerinphosphorsäure	15,6	45,6	
Äthylalkohol	7,4		
Glycerin	6,8	47,5	
Essigsäure	7,4	16,9	
Acetaldehyd	27,3		
Ohne Substrat		36,0	111,8

Grad wie diejenige der Glucose deutlich befördert. Die Atmung in Abwesenheit des zugegebenen Substrats wird ebenfalls geschädigt.

Die Wirkung des p-Nitrophenols auf die Bakterienatmung ist von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums abhängig. Die Hemmung ist im allgemeinen weit ausgeprägter in saurer Lösung als in alkalischer. In Tabelle III sind die Hemmungsgrade bei drei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen, nämlich pH 6,4, 7,2 und 7,6 angegeben. Die Glucoseveratmung, welche durch m/1000 p-Nitrophenol bei pH 7,2 um 84,7% gesteigert wird, erleidet bei pH 6,4 eine 40,1%ige Hemmung, während bei pH 7,6 die Beschleunigung sich verstärkt und etwa 148,2% beträgt.

Nächstem wurde die Wirkung des p-Nitrophenols in verschiedenen Konzentrationen, d.h. von m/100 bis m/10000, geprüft.

Der Hemmungsgrad der Atmung durch p-Nitrophenol wächst allerdings mit steigender Giftkonzentration, und zwar nicht proportional den zugesetzten Nitrophenolmengen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt. Wie in dieser Tabelle ersichtlich,

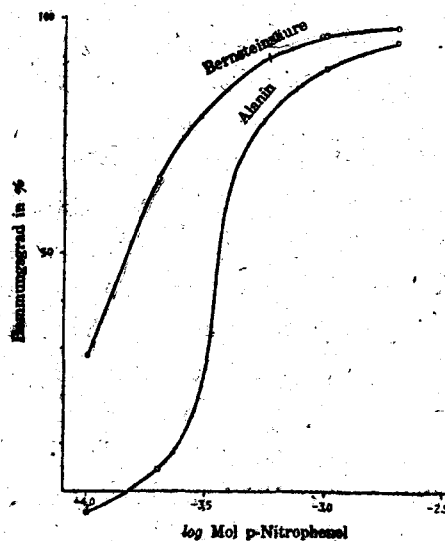
TABELLE IV.

Wirkung des p-Nitrophenols in verschiedenen Konzentrationen auf die Atmung von *Proteus vulgaris*.

Substratkonzentration : m/30. Die Zahlen in der Tabelle bedeuten die prozentualen O₂-Mengen gegen giftlose Atmung.

Substrat	Konzentration des p-Nitrophenols						
	m/100	m/500	m/750	m/1000	m/2500	m/5000	m/10000
Glucose, pH 7,6	11,1	38,8	8,51	248,2	195,7	162,6	
Glucose, pH 7,2	17,3	77,8		184,7		209,3	136,2
Milchsäure, pH 7,2	7,0			113,5			
Ameisensäure, pH 7,2		175,3		185,7		127,8	
Bernsteinsäure, pH 7,2		2,7		4,3		34,8	71,5
Glutaminsäure, pH 7,6				7,0			91,5
Alanin, pH 7,2		5,3		11,2		95,5	104,3
Alanin, pH 7,6				28,8			97,2

Fig. 3.
(vgl. Tabelle IV)



ist die Wirkung des p-Nitrophenols schon in der Konzentration von $m/10000$ bemerkbar. Die Beschleunigung der Glucoseveratmung bei pH 7,2 ist bei $m/5000$ Konzentration des p-Nitrophenols am stärksten, während bei pH 7,6 $m/1000$ Konzentration betreffender Substanz am stärksten beschleunigend wirkt. In höheren Konzentrationen wirkt p-Nitrophenol stets hemmend auf alle Oxydationssysteme von *Proteus vulgaris*, ausgenommen das System der Ameisensäure, welches durch $m/500$ p-Nitrophenol noch um 75,3% befördert wird. Beim Fall von Glucoseoxydation bei pH 7,6 liegt die Konzentration des p-Nitrophenols zwischen $m/750$ und $m/1000$, bei welcher die Beschleunigung in Hemmung übergeht. Die durch $m/1000$ p-Nitrophenol um 148,2% beschleunigte Glucoseoxydation wird durch $m/750$ von derselben Substanz um 14,9% gehemmt. Das System wird bei pH 7,2 durch $m/500$ p-Nitrophenol um 22,2%, und durch $m/100$ betreffender Substanz um 82,7% erniedrigt. Milchsäuresystem, welches durch $m/1000$ p-Nitrophenol keine Hemmung erfährt, wird durch $m/100$ derselben Substanz stark herabgesetzt; die Hemmung beträgt 93%. Versuchsergebnisse an Bernsteinsäure- und Alaninoxidation sind ferner in Fig. 3 graphisch dargestellt. Die Kurven in Fig. 3 tragen an Ordinaten Hemmungsgrade in Prozenten und an Abszissen die Logarithmen der Konzentration des p-Nitrophenols.

Ferner wurde die Wirkung des p-Nitrophenols mit variierten Substratkonzentrationen beim Fall von der Glucose untersucht. Wie aus der Tabelle V hervorgeht, ist Nitrophenolwirkung im grossen Umfang von der Glucosekonzentration unabhängig. Keine nennenswerte Verschiebung betreffs des Grads von Nitrophenolwirkung zwischen den Glucosekonzentrationen von $m/30$ und $m/150$ konnte festgestellt werden. Erst in sehr verdünnter Glucosekonzentration ($m/750$) war die Wirkung des $m/1000$ p-Nitrophenols merkwürdig schwach. Hinsichtlich der Atmungsintensität selbst in Abwesenheit des p-Nitrophenols, kann man aus der ersten Spalte der Tabelle V ersehen, dass zwischen den Q_{O_2} -Werten von *Proteus vulgaris* bei Zugabe von $m/150$ bis $m/750$ Glucose fast kein merklicher Unterschied gefunden wird.

TABELLE V.

Wirkung des p-Nitrophenols auf die Oxydation der Glucose
in verschiedenen Konzentrationen. *Proteus vulgaris*.

p-Nitrophenol: m/1000 pH 7,2.

Konz. der Glucose	Q ₀₂	Q ₀₂ bei Zugabe von p-Nitrophenol	Wirkung des p-Nitrophenols in Proz. der Kontr.
m/15	71	137	193,0
m/30	66	122	184,8
m/150	63	115	182,5
m/750	68	82	120,6

Es fragt sich nun, ob das Isomer des Nitrophenols sich gegen die Bakterienatmung identisch verhält oder nicht. Ein Versuch mit m-Nitrophenol beweist, dass das Isomer analoge Wirkung auf die bakteriellen Oxydationen verschiedener Substrate ausübt. Aber seine Wirkung ist beträchtlich schwächer im Vergleich mit derjenigen der p-Verbindung. Wenn man die Tabellen VI und III vergleicht, so geht hervor, dass der Hemmungsgrad des m-Nitrophenols in zweimal grösserer Konzentration gegenüber Bernsteinsäureveratmung von *Proteus vulgaris* noch niedriger ist als derjenige des p-Nitrophenols. In m/1000 Konzentration wirkt m-Nitrophenol gegen Bernsteinsäureoxydation nur äusserst schwach hemmend, und dabei bleiben Milchsäure- und Glucoseoxydationen unvergiftet. Im Gegensatz zu

TABELLE VI.

Wirkung des m-Nitrophenols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

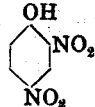
Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	Konzentration des m-Nitrophenols		
	m/500	m/1000	m/2000
Bernsteinsäure	7,7	88,7	108,3
Milchsäure		103,7	
Glucose		107,7	

der Unempfindlichkeit des Bernsteinsäuresystems gegen m-Nitrophenol in m/2000 Konzentration, wirkt p-Isomer in m/5000 Konzentration gegen Bernsteinsäureoxydation um 65,2% hemmend.

Die Glucoseatmung der Hefe wird nach FIELD, MARTIN und FIELD¹⁾, in Übereinstimmung mit meinen Resultaten an Bakterien, durch p-Nitrophenol in niedriger Konzentration stark beschleunigt. Diese Autoren beschäftigten sich nur mit der Glucoseoxydation und verglichen die Wirkungsstärken verschiedener Nitrophenolverbindungen. Auch beim Fall der Hefe wirkt, nach ihren Angaben, m-Nitrophenol im Vergleich mit dem p-Isomer viel schwächer.

2. Dinitrophenole.

In der Literatur liegt eine grosse Anzahl von Arbeiten vor, welche sich mit der Wirkung der Dinitrophenole, insbesondere des

α (1, 2, 4)-Dinitrophenols  auf tierische sowie pflanzliche Or-

ganismen beschäftigen. Unter den Wirkungen dieser Substanzen wurde seit langem eine merkwürdige Steigerung der Atmung von vielen Forschern sowohl an verschiedenen intakten Tieren²⁾, isolierten tierischen Geweben³⁾ und Zellen⁴⁾, als auch an pflanzlichen Materialien⁵⁾ untersucht.

1) J. FIELD, 2ND, A. W. MARTIN und S. M. FIELD: J. Pharm. and Exper. Therap., 53 (1935), 314.

2) H. MAGNE, A. MAYER und L. PLANTEFOL: Ann. Physiol. et Physicochim. biol., 7 (1931), 269; 8 (1932), 1, 51, 157; V. E. HALL, J. FIELD, 2ND., M. SAHYNN, W. C. CUTTING und M. L. TAINTER: Amer. Journ. Physiol., 106 (1933), 432; U. LOMBROSO und G. SARZANA: Biochem. Zeitschr., 276 (1935), 442; G. SCHEFF und F. RABATI: Biochem. Zeitschr., 298 (1938), 104.

3) E. C. DODDS und G. D. GREVILLE: Nature, 132 (1933), 966; Lancet, (1934) i, 398; G. D. GREVILLE: Nature 148 (1941), 320; E. EHRENFEST und E. RONZONI: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 31 (1933), 318; J. H. BODINE und E. J. BOELL: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 11 (1933), 41.

4) H. A. CLOWES und M. E. K. KRAHL: Journ. Gen. Physiol., 20 (1936), 145; E. L. ELLIS: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 4 (1934), 127; R. SUTO: Jap. Journ. Zool., 8 (1940), 459.

5) L. PLANTEFOL: Ann. Physiol. et Physicochim. biol., 8 (1932), 127.

Die Einflüsse dieser Substanzen auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen wurden hauptsächlich an Hefen studiert. Schon 1932 berichteten GENEVOIS und SARIC¹⁾ über die Wirkung des Dinitrophenols auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Bäckerhefe. Dann wurde von EHRENFEST und RONZONI²⁾ festgestellt, dass die Atmung der Hefe nur in Gegenwart von Glucose durch Dinitrophenol gesteigert wurde. Nach FIED, MARTIN und FIELD³⁾ wirkt α -Dinitrophenol in etwa m/500 Konzentration auf die Sauerstoffaufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* bei pH 6,8 in Gegenwart von 4% Glucose um etwa zweimal steigernd. Diese atmungserhöhende Wirkung des α -Dinitrophenols, welche sowohl bei anderen isomeren Dinitrophenolen⁴⁾ als auch bei Dinitro-*o*-kresol⁵⁾ beobachtet wurde, war nach diesen Autoren von pH abhängig und sie haben aus den Versuchen geschlossen, dass die freie Säureform des Dinitrophenols für die Erhöhung der Atmung wirksam sei. Dagegen konnten DE MEIO und BARRON⁶⁾ die FIELDSche Meinung nicht bestätigen, dass nur die undissoziierte Form des Dinitrophenols für das Zustandekommen der atmungserhöhenden Wirkung auf die Bäckerhefe verantwortlich sei. Bei Bakterien haben dieselben Autoren gezeigt, dass α -Dinitrophenol im Gegensatz zum Fall bei der Hefe auf die Oxydation von Glucose durch *Gonococcus* keine Aktivierung ausübte. Nach DE MEIO und BARRON ist Milchsäureoxydation auch gegen Dinitrophenol unempfindlich, dagegen wird Brenztraubensäureoxydation um etwa 30% gehemmt. Nach SHOUP und KIMLER⁷⁾ wird die Glucoseatmung von Leuchtbakterien wie beim Fall von Hefen durch Dinitrophenol in

1) L. GENEVOIS und R. SARIC: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 111 (1932), 131.

2) E. EHRENFEST und E. RONZONI: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 31 (1933), 318.

3) J. FIELD, 2ND, A. W. MARTIN und S. M. FIELD: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 31 (1933), 56; *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 4 (1934), 405; L. PLANTERFOL: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 113 (1933), 147.

4) J. FIELD, 2ND, A. W. MARTIN und S. M. FIELD: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 31 (1934), 996; *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 53 (1935), 314.

5) J. FIELD, 2ND: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 32 (1935), 1342.

6) R. H. DE MEIO und E. S. G. BARRON: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 32 (1934), 36.

7) C. S. SHOUP und A. KIMLER: *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 5 (1934), 269.

neutralen bzw. schwach alkalischen pH-Bereichen bedeutend gesteigert. Die Intensität des bakteriellen Leuchtens wird nach SCHOEFFLE¹⁾ durch 20 mg Dinitrophenol pro Liter stark erniedrigt.

Es erscheint uns wünschenswert, das Verhalten der Bakterienatmung gegen Dinitrophenole in Gegenwart verschiedenartiger Substrate zu prüfen. Aus meinen Untersuchungen geht hervor, dass Dinitrophenole auf die Atmung der Bakterien in ähnlicher Weise wie schon beschriebene Nitrophenole wirken. In erster Linie wurden die Versuche mit α -Dinitrophenol in m/2000 Konzentration an *Proteus vulgaris* bei vier verschiedenen pH ausgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefasst worden. Bei pH 7,2 werden die Oxydationen von Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Citronensäure um etwa 80–90% gehemmt, dagegen wird die Sauerstoffaufnahme bei Glucose beinahe verdoppelt. Im Vergleich mit m/1000 p-Nitrophenol wird Ameisensäureoxydation durch m/2000 α -Dinitrophenol nur in sehr geringem Masse beschleunigt. Alaninoxydation wird schwächer gehemmt, und im Gegensatz dazu wird Milchsäureoxydation stärker vergiftet; die Hem-

TABELLE VII.

Wirkung des α -Dinitrophenols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

α -Dinitrophenol: m/2000

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme			
	pH 6,0	pH 6,4	pH 7,2	pH 7,6
Bernsteinsäure	3,8	2,2	11,8	27,8
Fumarsäure			14,9	41,2
Äpfelsäure	5,1			
Citronensäure			11,5	
Alanin		26,9	44,9	69,8
Milchsäure	28,3	33,2	77,3	105,1
Ameisensäure	117,2		111,8	100,4
Glucose	29,2		199,9	215,2

1) G. M. SCHOEFFLE: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 17 (1941), 106.

mung beträgt 22,7%. Wie beim Fall der Nitrophenole sind die Hemmungen in sauren Medien stärker als in alkalischen. Die Milchsäureatmung, die bei pH 7,2 um 22,7% gehemmt wird, erleidet bei pH 7,6 keine Hemmung durch m/2000 α -Dinitrophenol. Die Glucoseatmung wird bei pH 7,6 etwas stärker als bei pH 7,2 beschleunigt, und bei pH 6,0 erfährt sie schon keine Beschleunigung, sondern eine 70,8%-ige Hemmung.

Andere Bakterien, wie *Bacillus coli*, verhalten sich gegen das Dinitrophenol in ganz analoger Weise wie *Proteus vulgaris*. Hierzu siehe Tabelle VIII. Die Bernsteinsäureoxydation wird auch in diesem Falle durch m/1000 α -Dinitrophenol beinahe vollständig gehemmt. Wenn man die Tabellen VII und VIII vergleicht, so ist es bemerkbar, dass die Hemmung der Atmung durch α -Dinitrophenol bei *Bacillus coli* bei allen geprüften Substratarten etwas schwächer ist als bei *Proteus vulgaris*. Auch die beschleunigende Wirkung auf Glucoseoxydation ist bei *Bacillus coli* schwächer; der Beschleunigungsgrad beträgt bei pH 7,6 nur 26,5%. Beim Fall von *Proteus vulgaris* wirkt α -Dinitrophenol in derselben Konzentration bei demselben pH auf die Glucoseatmung um 115,2% beschleunigend.

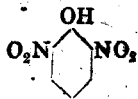
TABELLE VIII.

Wirkung des α -Dinitrophenols auf die Atmung
von *Bacillus coli*.

α -Dinitrophenol: m/2000

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme	
	pH 6,0	pH 7,6
Bernsteinsäure	6,0	68,5
Milchsäure	42,4	
Ameisensäure	112,1	
Glucose	96,6	126,5

Ähnliche Wirkungen werden von den Isomeren des Dinitrophenols beobachtet. Die Versuchsergebnisse mit β (1, 2, 6)-Dinitrophenol



werden in Tabelle IX wiedergegeben. Die Hemmungswirkungen des β -Dinitrophenols sind beträchtlich schwächer im Vergleich mit denjenigen des α -Isomers. Bei pH 7,2 wird die Bernsteinsäureoxydation durch m/1000 β -Dinitrophenol nur um 15% und erst durch m/500 Konzentration rund 80% herab-

TABELLE IX.

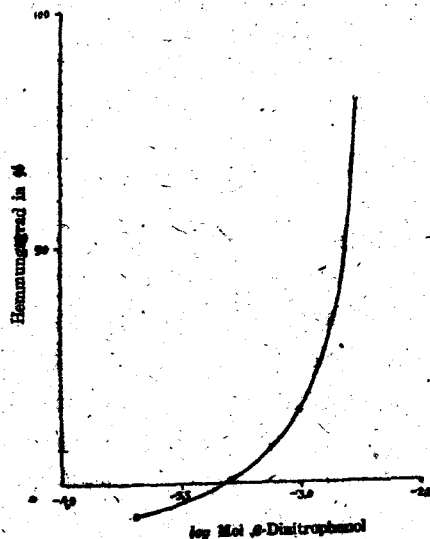
Wirkung des β -Dinitrophenols auf die Atmung von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme			
	Konzentration des β -Dinitrophenols			
	m/500	m/1000	m/2000	m/5000
Bernsteinsäure	19,6	85,0	99,5	106,9
Milchsäure		97,8		
Glucose		190,7		

gesetzt. Die Abhängigkeit der Hemmung der Bernsteinsäureoxydation von den Konzentration des β -Dinitrophenols ist graphisch in Fig. 4 dargestellt. Milchsäureoxydation ist wenig empfindlich. Auf Glucoseoxydation wirkt β -Isomer in m/1000 Konzentration in beinahe gleicher Intensität wie α -Isomer in m/2000 Konzentration.

Ferner wurde γ (1, 2, 5)-

Fig. 4.
(vgl. Tabelle IX)



Dinitrophenol  vergleichend geprüft. Wie aus der Tabelle

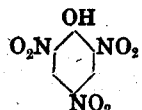
X hervorgeht, verhält sich auch γ -Dinitrophenol ähnlich wie andere Isomere. Die Oxydationssysteme von Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure werden beträchtlich stärker gehemmt als diejenigen von Milchsäure und Ameisensäure. Aber im Gegensatz zu anderen Isomeren wirkt m/1000 γ -Dinitrophenol bei pH 7,2 auf die Glucoseatmung nicht beschleunigend, sondern in geringerer Masse hemmend. In den gesuchten Bedingungen bleibt nur die Ameisensäureatmung gegen genanntes Gift unempfindlich. Hemmende Wirkung betreffender Substanz in m/1000 Konzentration ist stärker als die des α -Isomers in m/2000 Konzentration.

TABELLE X.
Wirkung des γ -Dinitrophenols auf die
Atmung von *Proteus vulgaris*.
 γ -Dinitrophenol: m/1000 pH 7,2

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme
Bernsteinsäure	2,9
Fumarsäure	12,9
Äpfelsäure	18,2
Milchsäure	60,5
Ameisensäure	100,8
Glucose	75,1

3. Trinitrophenol.

Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass 2,4,6-Trinitrophenol,

Pikrinsäure , im Gegensatz zu Mono- und Dinitrophenolen

auf die bakteriellen Oxydationen nur eine schwächere Wirkung ausübt. Wie die in Tabelle XI dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, wird die Bernsteinsäureoxydation von *Proteus vulgaris* bei pH 7,2 durch m/1000 Pikrinsäure nur um 33% erniedrigt, während die Oxydationen von Alanin, Äthylalkohol und Milchsäure gegen Einwirkung der Pikrinsäure in derselben Konzentration ganz wider-

standsfähig sind. Fördernde Wirkung auf die Glucoseoxydation, welche schon bei Mono- und Dinitrophenolen mehrmals betrachtet wurde, ist in diesem Fall wesentlich schwächer, die Beschleunigung beträgt bei pH 7,6 28,2% und bei pH 7,2 und 6,4 nur etwa 10%. Die Atmung ohne Substratzusatz wird durch Pikrinsäure in m/1000—m/2000 Konzentrationen etwas gesteigert.

TABELLE XI.
Wirkung des Trinitrophenols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme				
	m/1000 Pikrinsäure			m/2000 Pikrinsäure	m/20000 Pikrinsäure
	pH 6,4	pH 7,2	pH 7,6	pH 7,2	pH 7,2
Bernsteinsäure		67,0			
Alanin		93,2			
Milchsäure				104,4	100,2
Glucose	112,8	111,0	128,2		100,7
Äthylalkohol			107,0		
Ohne Substrat		124,5		137,6	

Wie schon erwähnt, wurden die biologischen Wirkungen des Dinitrophenols von verschiedenen Autoren an verschiedenartigen Organismen wiederholt untersucht. Auch gibt es einige Angaben, welche die Wirkungsstärken der verschiedenen Nitrophenolverbindungen vergleichend studierten. Um die hier erhaltenen Ergebnisse mit den bisherigen Angaben an anderen Organismen zu vergleichen, will ich im folgenden kurze Literaturanführungen anstellen.

Schon 1894 haben GIBBS und REICHERT¹⁾ ein vergleichendes Studium von Phenolen, Kresolen, Nitrophenolen, Dinitrophenolen, Nitrobenzolen usw. betreffs ihrer physiologischen Effekte ausgeführt. Dann fanden MAGNE, MAYER und PLANTEFOL²⁾ in neuerer Zeit, dass Trinitrophenol für Tiere im Vergleich mit Dinitrophenol schwächer

1) W. GIBBS und E. T. REICHERT: Amer. Chem. Journ., 16 (1894), 443.

2) H. MAGNE, A. MAYER und L. PLANTEFOL: Ann. Physiol. et Physicochim. Biol., 7 (1931), 269.

giftig war. In Bezug auf die Giftigkeit verschiedener Nitrophenolverbindungen für Tiere haben diese Autoren¹⁾ beim Hund festgestellt, dass unter den Mononitrophenolen p-Isomer am stärksten und o-Isomer dagegen am schwächsten wirkte, und ferner betreffs der Intensität der Giftigkeit von Dinitrophenolen, welche im allgemeinen stärker giftig als Mononitrophenole waren, haben sie folgende Reihenfolge festgestellt: 1,2,4-Dinitrophenol > 1,2,6-Dinitrophenol > 1,2,5-Dinitrophenol > 1,3,4-Dinitrophenol \geq 1,3,5-Dinitrophenol > 1,2,3-Dinitrophenol. Hinsichtlich der Intensität der Methämoglobinbildung war dagegen 1,3,6-Dinitrophenol am stärksten und 1,2,4-Isomer am schwächsten. TAINTER, BERGSTROM und CUTTING²⁾ haben zahlreiche Dinitrophenole und ihre verwandten Verbindungen auf ihre stoffwechselstimulierenden und temperaturerhöhenden Effekte für Ratte, Taube und Hund vergleichend mit 1,2,4-Dinitrophenol untersucht und dabei gefunden, dass 1,2,5-Dinitrophenol, o-Nitrophenol, m-Nitrophenol, p-Nitrophenol, 1,2,4-Dichlorphenol usw. unwirksam und 1,2,6-Dinitrophenol, 2,4-Dinitro-*a*-naphthol, Dinitro-*o*-kresol usw. nur schwächer wirksam waren. Nach PLANTEFOL³⁾ wird die Sporenkeimung und das Wachstum von *Sterigmato-cystis nigra* (*Aspergillus niger*) durch Nitrophenol gehemmt. In Bezug auf die Intensität der Hemmung wurde hierbei aus den Versuchen der minimalen Menge, welche für die vollständige Schädigung der Keimung genügte, folgende Reihenfolge festgestellt: 1,2,4-Dinitrophenol > p-Nitrophenol > m-Nitrophenol > Trinitrophenol > o-Nitrophenol > Phenol. Inbetreff der Wirkung verschiedener Nitrophenole gegen Hefeatmung wurde von FIELD, MARTIN und FIELD⁴⁾ berichtet, dass alle geprüften Nitrophenole, d.h. p-, m-Nitrophenol und α -, β -, γ -Dinitrophenol, ausgenommen von o-Nitrophenol, welches

1) H. MAGNE, A. MAYER und L. PLANTEFOL: *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, 8 (1932), 157.

2) M. L. TAINTER, F. W. BERGSTROM und W. C. CUTTING: *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 53 (1935), 58.

3) L. PLANTEFOL: *Ann. Physiol. et Physicochim. Biol.*, 8 (1932), 127.

4) J. FIELD, 2ND., A. W. MARTIN und S. M. FIELD: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 31 (1934), 996; *Journ. Pharm. and Exper. Therap.*, 53 (1935), 314.

praktisch unwirksam war, die Hefeatmung sowohl in Phosphatpufferlösung als auch in Glucose-Phosphat-Lösung steigern konnten. Die atmungssteigernde Wirkung der Nitrophenole war im allgemeinen in Phosphatpufferlösung stärker als in Glucose-Phosphat-Lösung. Hinsichtlich der Stärke betreffender Effekte von verschiedenen Nitrophenolverbindungen erhielten die obengenannten Autoren folgende Reihenfolge: p-Nitrophenol > m-Nitrophenol > α -Dinitrophenol > β -Dinitrophenol bei der Hefeatmung in Phosphatpufferlösung, während in Glucose-Phosphat-Lösung p-Nitrophenol > α -Dinitrophenol > β -Dinitrophenol > m-Nitrophenol. γ -Isomer des Dinitrophenols hatte eine deutliche, doch sehr geringere Wirksamkeit. β -Dinitrophenol in optimaler Konzentration wirkte um etwa 50% beschleunigend, hingegen rief α -Isomer in optimaler Bedingung ungefähr 100%-ige Steigerung der Hefeatmung hervor.

Bezüglich der Wirkung von verschiedenen Nitrophenolverbindungen auf die Bakterienatmung habe ich der Übersicht halber die Daten über die Oxydation von Bernsteinsäure, Alanin, Milchsäure, Glucose und Ameisensäure aus den Tabellen III bis XI entnommen und in der Tabelle XII zusammenfassend wiedergegeben. In dieser Tabelle sind die Konzentrationen jeder Nitrophenole stets m/1000, mit Ausnahme von der des α -Dinitrophenols, welche wegen seiner Unlöslichkeit m/2000 ist. Wie aus Tabelle XII hervorgeht, ruft

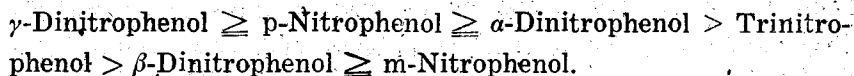
TABELLE XII.

Wirkung von verschiedenen Nitrophenolverbindungen auf die Atmung von *Proteus vulgaris*.

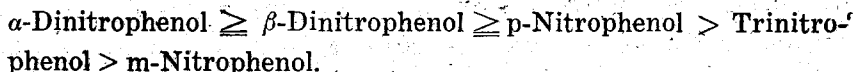
Substrat: m/30 pH 7,2

Nitrophenol	Relative O ₂ -Aufnahme				
	Bernsteinsäure	Milchsäure	Glucose	Alanin	Ameisensäure
m/1000 p-Nitrophenol	4,3	109,8	184,7	11,2	185,7
m/1000 m-Nitrophenol	88,7	108,7	107,7		
m/2000 α -Dinitrophenol	11,8	77,3	199,9	44,9	111,8
m/1000 β -Dinitrophenol	85,0	97,8	190,7		
m/1000 γ -Dinitrophenol	2,9	60,5	75,1		100,8
m/1000 Trinitrophenol	67,0		111,0	93,2	

γ -Dinitrophenol unter meinen Versuchsbedingungen die stärkste Hemmungswirkung unter den geprüften Nitrophenolverbindungen auf die Oxydation aller Substratarten hervor. Was die Hemmungsstärke der verschiedenen Nitrophenole auf die Bernsteinsäureoxydation anbelangt, so ist die Reihenfolge wie folgt:



Die Intensität der Beschleunigungswirkung gegen Glucoseoxydation wird in folgender Reihenfolge geordnet:



Nur γ -Dinitrophenol in m/1000 Konzentration unter den geprüften Nitrophenolen wirkt hemmend auf die Glucoseoxydation bei pH 7,2 ein. In Übereinstimmung mit den Angaben von FIELD, MARTIN und FIELD¹⁾ an Hefe ist die Wirkung des m-Nitrophenols unter den Mono- und Dinitrophenolen auf die Glucoseatmung von Bakterien am schwächsten, und wirkt α -Dinitrophenol auf die Oxydationsvorgänge aller Substratarten immer stärker als β -Isomer. Die Wirkung des Trinitrophenols ist unter den Mono- und Dinitrophenolen mittlerer Grösse, und seine Wirkungsstärke liegt zwischen m-Nitrophenol und p-Nitrophenol bei Glucoseoxydation. Unter den drei typischen Nitrophenolen, nämlich p-Nitrophenol, α -Dinitrophenol und Trinitrophenol, wirkt p-Nitrophenol für Alaninoxidation am stärksten hemmend. p-Nitrophenol wirkt stärker beschleunigend auf Ameisensäureoxydation als α - bzw. γ -Dinitrophenol. Unter den geprüften Nitrophenolen wird Milchsäureoxydation nur durch α - und γ -Dinitrophenol gehemmt.

Vor kurzem berichteten CLIFTON und LOGAN²⁾ über die Wirkung des α -Dinitrophenols auf die Atmung von *Bacillus coli* in Gegenwart einiger Substratarten. Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen an

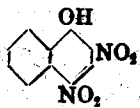
1) J. FIELD, 2ND, A. W. MARTIN und S. M. FIELD: Loc. cit.

2) C. E. CLIFTON und W. A. LOGAN: Journ. Bacter., 37 (1939), 523.

Proteus vulgaris haben sie bestätigt, dass Bernsteinsäure- und Fumarsäureveratmungen von *Bacillus coli* durch α -Dinitrophenol stärker gehemmt werden als die Atmungen anderer Substratarten wie Propionsäure, Brenztraubensäure, Glucose und Glycerin. 50%-ige Hemmung der Bernsteinsäureatmung wurde nach diesen Autoren durch α -Dinitrophenol in m/16000 Konzentration verursacht. Um die Atmung im Gegenwart von Brenztraubensäure in gleicher Grösse zu behindern, wurde α -Dinitrophenol in m/200 Konzentration benötigt.

4. Dinitronaphthol.

Vergleichenderweise habe ich als nächsten Schritt Dinitronaphthol geprüft. HEYMENS und BOUCKAERT¹⁾ beschäftigten sich

mit der Wirkung des Dinitro- α -naphthols  beim Hund

und berichteten, dass diese Substanz wie Dinitrophenol stoffwechselstimulierend und folglich hyperthermisch wirken konnte, Analoge Wirkung konnten UYTVANCK²⁾, HEYMANS und UYTVANCK³⁾, TAINTER, BERGSTROM und CUTTING⁴⁾ bei Taube und Ratte bestätigen. Diese Substanz ist als ein-Farbstoff, Martiusgelb, bekannt. In vorliegenden Versuchen wurde Martiusgelb von Firma Dr. G. GRÜBLER verwendet.

Im Gegensatz zu Nitrophenol besitzt Dinitronaphthol überhaupt keinen Einfluss auf die bakterielle Oxydation. Diese Unempfindlichkeit der Bakterienatmung gegen Einwirkung des Dinitronaphthols bleibt auch in saurerer Reaktion, und sogar in höheren Konzentrationen wie z.B. m/200 unverändert (siehe hierzu Tabelle XIII).

1) C. E. HEYMANS und JEAN-J. BOUCKAERT: Compt. rend. Soc. Biol., **49** (1928), 636.

2) P. VAN UYTVANCK: Ebenda, **103** (1930), 29; **106** (1931), 477.

3) C. HEYMANS und P. VAN UYTVANCK: Ann. Physiol. et Physicochim. Biol., **7** (1931), 279.

4) M. L. TAINTER, F. W. BERGSTROM und W. C. CUTTING: Journ. Pharm. and Exper. Therap., **53** (1935), 58.

TABELLE XIII.

Wirkung des Martiusgelbs auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme	
	0,02 % (\approx m/1000) Martiusgelb, pH 7,2	0,1 % (\approx m/200) Martiusgelb, pH 6,4
Bernsteinsäure	98,3	
Fumarsäure		99,3
Milchsäure	112,9	96,0
Ameisensäure	97,1	
Glucose	97,7	


Dinitronaphtholsulfonsäure (Flaviansäure)  wirkt dagegen etwas hemmend auf die Bernsteinsäure- und Äpfelsäureoxydationen, hingegen bleiben Milchsäure-, Ameisensäure-, Brenztraubensäure- und Glucoseoxydationen ungehindert. Siehe hierzu Tabelle XIV.

TABELLE XIV.

Wirkung der Dinitronaphtholsulfonsäure auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme	
	Dinitronaphtholsulfonsäure	
	m/ 500	m/250
Bernsteinsäure	73,3	71,2
Äpfelsäure	63,9	
Alanin	92,1	
Milchsäure		99,2
Ameisensäure	106,5	
Glucose	107,5	125,7
Brenztraubensäure	110,7	

5. Phenol.

Um zu bestimmen, ob die Nitrogruppe in der Molekül des Nitro-

phenols für das Auftreten der betreffender Wirkung verantwortlich sei, wurde Phenol (Carbolsäure) auf sein Verhalten gegenüber Zellatmung geprüft. Trotz seiner starken bakteriziden Wirkung ruft Phenol, wie man in Tabelle XV ersehen kann, keine nennenswerte Wirkung auf die Bakterienatmung hervor, nur eine äusserst geringfügige Hemmung der Bernsteinsäureatmung und eine schwache Steigerung von Glucoseatmung. Ausserdem konnten diese Wirkungen erst in erheblich höherer Konzentration (m/100) erkannt werden. Doch kann man auch in diesem Falle bemerken, dass Bernsteinsäureoxydation stärker gehemmt wird im Vergleich mit Milchsäureoxydation und ferner Glucoseoxydation schwächer, doch deutlich beschleunigt wird. In m/500 und m/1000 Konzentrationen ist Phenol vollständig ohne Einfluss.

TABELLE XV.
Wirkung des Phenols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	Konzentration des Phenols		
	m/100	m/500	m/1000
Bernsteinsäure	68,8	94,4	99,2
Milchsäure	82,5		
Glucose	138,6		

Unter den zahlreichen Literaturen über die bakterizide Wirkung des Phenols gibt es einzig in der Mitteilung von TEZUKA¹⁾ einige Angaben über den Einfluss des Phenols auf die Bakterienatmung. TEZUKA verwandte Phenol zwar in sehr höheren Konzentrationen (m/50–m/5), aber in seinen Angaben von ruhenden Bakterien (*Escherichia coli*) ohne Substratzusatz kann keine starke Abweichung von m inem Befund gefunden werden.

6. Salicylsäure.

In Fortsetzung meiner bisherigen Versuche ist es nun interes-

1) E. TEZUKA: Jap. Journ. Exper. Med., 18 (1940), 387.

sant zu untersuchen, wie sich weitere andere verwandte Verbindungen, welche in der Molekül nicht nitrosubstituiert sind, gegenüber bakterieller Oxydation verhalten. Erstens wurde Salicylsäure untersucht. Es ist wohl bekannt, dass Salicylsäure eine starke antiseptische Wirkung besitzt. Ihre Wirkung auf die bakterielle Atmung ist aber verhältnismässig schwach, und sie ruft erst in höherer Konzentration eine spezifische Hemmung hervor. Wie man in Tabelle XVI bemerkt, werden Bernsteinsäure-, Fumarsäure-, Äpfelsäure- und Citronensäureoxydationen von *Proteus vulgaris* stärker geschädigt, in ähnlicher Weise wie im Fall von Nitrophenol. Vergleichend mit diesen obengenannten Oxydationssystemen werden Milchsäure- und Ameisensäure-Systeme nur in geringerem Masse behindert. Glucoseoxydation wird auch in diesem Falle etwas befördert.

TABELLE XVI.

Wirkung der Salicylsäure auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat: m/30 pH 7,2

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme	
	Konzentration der Salicylsäure	
	m/100	m/200
Bernsteinsäure	22,7	78,4
Fumarsäure	30,9	
Äpfelsäure	39,8	
Citronensäure	25,9	
Alanin	52,4	
Milchsäure	73,7	92,1
Ameisensäure	80,3	
Glucose	125,0	
Brenztraubensäure	46,0	
Glycerinphosphorsäure	90,2	
Äthylalkohol	90,0	

Diese Tatsachen sind von dem Standpunkt aus bemerkenswert, dass eine dem Nitrophenol analoge selektive Hemmungswirkung durch eine Verbindung ohne Nitrogruppe hervorgerufen werden kann.

Abweichungen davon sind eine stärkere Hemmung gegenüber Brenztraubensäuresystem und eine schwächere Hemmung auf Äthylalkohol- bzw. Glycerinphosphorsäuresystem. Alaninoxidation lässt sich durch m/100 Salicylsäure nur um etwa 50% hemmen. In m/200 Konzentration wirkt Salicylsäure auf Bernsteinsäuresystem nur um 21,6% hemmend und in dieser Konzentration ist Milchsäuresystem ganz unempfindlich.

Ferner habe ich Benzoesäure, welche hydroxyllöse Salicylsäure ist, vergleichend mit Salicylsäure geprüft. Hinsichtlich der antiseptischen Wirkung sind beide Stoffe einander ähnlich. Dagegen ist Benzoesäure selbst in m/100 Konzentration völlig wirkungslos auf die Bakterienatmung, und keine spezifische Wirkung ist davon bemerkbar, wie aus Tabelle XVII hervorgeht. Bernsteinsäureoxydation wird nicht stärker gehemmt, und im Gegenteil ist Milchsäureoxydation empfindlich. Einzige Ausnahme ist Glucoseoxydation, welche um etwa 56,7% beschleunigt wird. Wirkungslosigkeit der Benzoesäure weist aller Wahrscheinlichkeit nach darauf hin, dass Hydroxylgruppe im Molekül für das Zustandekommen betreffender Wirkung unentbehrlich sei.

TABELLE XVII.
Wirkung der Benzoesäure auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	Konzentration der Benzoesäure		
	m/100	m/200	m/500
Bernsteinsäure	97,3	84,7	
Fumarsäure	83,9		
Äpfelsäure	89,7		
Alanin	81,4		
Milchsäure	77,8	104,4	133,9
Glucose	156,7		

7. Thymol.

Thymol, 3-Methyl-6-isopropylphenol, ist seit langem als ein anti-

septisches Mittel bekannt¹⁾ und in enzymatischen Versuchen oft verwendet worden. Aber, soweit ich die Literatur übersehe, ist Thymol vom atmungsphysiologischen Standpunkt aus noch nicht gebraucht worden. Ich habe Thymol als ein Phenolderivat in dieser Mitteilung in betreff seiner Wirkung auf die Bakterienatmung untersucht. Resultate über die Einwirkung von Thymol in m/1000 und m/2000 Konzentration auf die Veratmung verschiedener Substrate von *Proteus vulgaris* sind in Tabelle XVIII zusammenfassend angegeben.

TABELLE XVIII.

Wirkung des Thymols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat: m/30 pH 7,2

Substrat	Relative O ₂ Aufnahme	
	Konzentration des Thymols	
	m/1000	m/2000
Bernsteinsäure	8,1	75,7
Fumarsäure	6,8	
Äpfelsäure	6,8	
Citronensäure	8,9	
Alanin	14,8	
Milchsäure	44,9	81,7
Ameisensäure	68,3	
Glucose	68,8	116,9
Brenztraubensäure	40,4	
Glycerinphosphorsäure	17,0	
Äthylalkohol	25,7	
Glycerin	10,6	
Ohne Substrat	0	

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist es beachtenswert, dass Thymol in ganz analoger Weise wie Nitrophenole die bakteriellen Oxydation von Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Citronensäure und von Alanin zum grössten Teil unterdrückt: Die Hemmungen durch m/1000 Thymol betragen an *Proteus vulgaris* bei pH 7,2 im allge-

1) Vergl. z. B. E. W. SCHMIDT: Zeitschr. f. physiol. Chem., 67 (1910), 412.

meinen über 90%. Andere Oxydationssysteme sind auch gegen Thymol empfindlich, aber sie werden durch Thymol viel schwächer als die oben genannten Systeme gehemmt: Milchsäure- und Brenztraubensäuresysteme werden durch m/1000 Thymol bei pH 7,2 um beinahe 60% herabgesetzt, und Ameisensäure- und Glucosesysteme nur um 30–40%. Eine Abweichung der Wirkung des Thymols von der des Nitrophenols ist die folgende Tatsache, dass Thymol verhältnismässig stärker hemmend als Nitrophenol auf die Veratmung von Milchsäure, Ameisensäure und Glucose einwirkt.

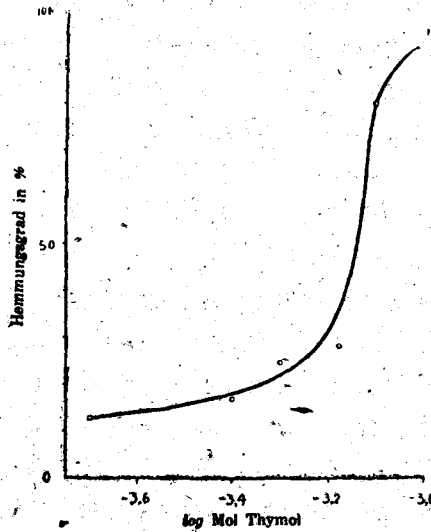
Trotz der beinahe vollständigen Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch m/1000 Thymol, sinkt der Hemmungsgrad, wie in Tabelle XVIII ersichtlich, merklich ab, wenn man Thymol in schwächerer Konzentration (m/2000) verwendet. Die Hemmungsstärke beträgt dabei nur 24,3%. Die Tatsache, dass der Hemmungsgrad durch eine geringere Veränderung der Thymolkonzentration unerwartet stark herabsinkt, erfordert eine weitere Untersuchung über die Abhängigkeit der Hemmung von der Konzentration des Thymols. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle XIX und in Fig. 5 wiedergegeben. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, ist die Hemmung auf Bernsteinsäureoxydation zwischen m/1250 und m/1500 von der Konzentration des Thymols stark abhängig, und in Konzentrationen unter m/1500 ist die Erniedrigung der Hemmungsintensität sehr langsam. In der Konzentration von m/5000 beträgt die Hemmung nur 12,8%.

TABELLE XIX.

Wirkung des Thymols in verschiedenen Konzentration auf die Atmung von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme					
	Konzentration des Thymols					
	m/1000	m/1250	m/1500	m/2000	m/2500	m/5000
Bernsteinsäure	8,1	20,0	72,0	75,7	83,3	87,2

Fig. 5.
(vgl. Tab. XIX)



Nächstem wurde die Abhängigkeit der Hemmung von der Wasserstoffionenkonzentration geprüft. Im Gegensatz zu Nitrophenol scheint die Hemmung gewissermassen schwächer bei saurer Reaktion (siehe hierzu Tabelle XX).

TABELLE XX.

Abhängigkeit der Thymolwirkung von pH.

Proteus vulgaris.

Thymol: m/1000

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	pH 6,4	pH 7,2	pH 8,0
Bernsteinsäure	13,7	8,1	8,4

FRANKE und LORENZ¹⁾ haben in ihren enzymatischen Studien über die Glucose-Oxydase von *Aspergillus niger* berichtet, dass genanntes Enzym bei pH 7,0 durch 0,06 m-Thymol nur äusserst

1) W. FRANKE und F. LORENZ: LIEBIGS Ann. d. Chem., 532 (1937), 1.

geringfügige Hemmung (7%-ige Hemmung) erfuhr, dagegen die Hemmung in saurem Medium (pH 4,4) bedeutend stark (65%) war.

Vergleichsweise wurde dann die Wirkung des Thymols auf die Atmung anderer Bakterienarten, d.h. *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus coli* und *Staphylococcus citreus* geprüft. Wie in Tabelle XXI zusammengestellt ist, kann man keinen wesentlichen Unterschied der Thymolwirkung bei *Proteus vulgaris* finden. Unter den vier geprüften Bakterienarten ist *Bacillus pyocyaneus* gegen Einwirkung des Thymols verhältnismässig widerstandsfähig.

TABELLE XXI.

Wirkung des Thymols auf die Atmung von drei Bakterienarten.

Thymol: m/1000

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	<i>B. pyocyaneus</i>	<i>Staph. citreus</i>	<i>B. coli</i>
Bernsteinsäure	30,2		12,9
Fumarsäure		12,5	
Äpfelsäure	33,7		
Citronensäure		23,2	
Milchsäure	79,5	60,8	25,4
Glucose			35,9
Äthylalkohol	80,3		
Glycerin		59,8	

Die Hemmung durch Thymol tritt sofort nach seinem Zusatz ein, dann verstärkt sich die Hemmung progressiv mit der Zeit etwa 30 Minuten lang, und schliesslich nach diesem Zeitpunkt verläuft die Sauerstoffaufnahme zeitlich konstant. Ein Beispiel der Sauerstoffaufnahme bei Bernsteinsäureoxydation unter Zugabe von m/1000 Thymol wird in Tabelle XXII und Fig. 6 gezeigt. Von der Induktionszeit der Thymolhemmung und von der damit im Zusammenhang stehenden Wirkungsweise des Thymols ist nochmals später, im zweiten Abschnitt dieser Mitteilung, die Rede (siehe hierzu S. 45). In den vorangehenden Tabellen, so z.B. in Tabelle XVIII, sind allerdings

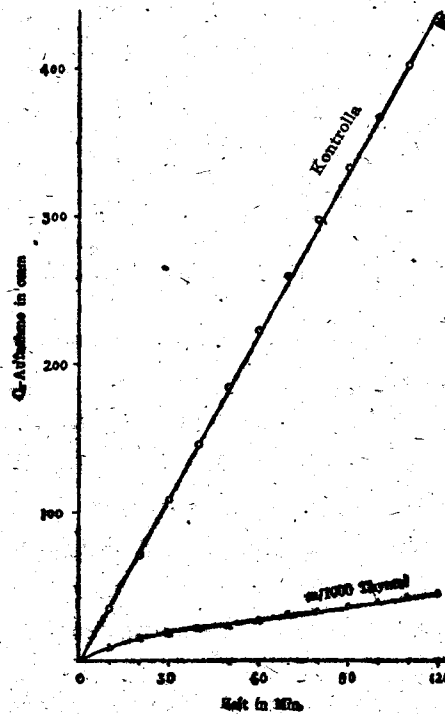
TABELLE XXII.

Einfluss des Thymols auf die Bernsteinsäureatmung
von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,2 mg.
Bernsteinsäure: m/30 pH 7,2 30°C

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm	
	Ohne Thymol	Mit m/1000 Thymol
10	35,9	9,2
20	71,3	15,3
30	109,0	18,3
40	146,7	21,3
50	184,7	24,1
60	222,1	27,1
70	259,8	30,3
80	297,2	33,3
90	332,3	36,3
100	367,4	38,7
110	401,2	41,9
120	434,4	44,7

Fig. 6.
(vgl. Tab. XXII)



die Werte des Hemmungsgrades aus den linear verlaufenden Kurven-
teilen, d.h. aus den aufgenommenen Sauerstoffmengen nach der In-
duktionszeit, berechnet worden.

8. α -Naphthol.

Wie Thymol besitzt Naphthol eine antiseptische Wirkung¹⁾.
Auch gegenüber Zellatmung scheint α -Naphthol sich in gleicher Weise
wie Thymol zu verhalten. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass
Phenol bei Anwendung kleiner Konzentration, wie bereits beschrie-
ben, keinen nennenswerten Einfluss auf Bakterienatmung ausübt,
dagegen, dass Naphthol darauf wie Thymol eine dem Nitrophenol
ähnliche starke Hemmung hervorruft.

Versuchsergebnisse an *Proteus vulgaris* sind in Tabelle XXIII
zusammengestellt. α -Naphthol wurde hierbei in drei verschiedenen
Konzentrationen verwendet. In m/1000 Konzentration übt α -Naph-
thol eine beinahe vollkommene Hemmung auf die Oxydationen von
Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Alanin,
Essigsäure und Glycerinphosphorsäure aus, dagegen werden die Oxy-
dationen von Milchsäure und Ameisensäure durch α -Naphthol ver-
hältnismässig schwach gestört. Die Hemmung der Oxydation des
Äthylalkohols ist schwächer als diejenige der Bernsteinsäureoxyda-
tion. Glucose- bzw. Glycerin-Oxydationen sind durch m/1000 α -
Naphthol nur in gerinerem Masse befördert. Aber in m/2000 Kon-
zentration wirkt α -Naphthol um 41% steigernd auf die Glucose-
atmung und dabei wurde die Bernsteinsäureatmung um etwa 50%
gehemmt. Die Atmung ohne Substratzusatz wird auch durch α -Naph-
thol beschleunigt. In m/500 Konzentration wirkt α -Naphthol
stärker hemmend, und selbst die Milchsäureoxydation wird dabei
um etwa 80% gehemmt.

1) C. BOUCHARD: Compt. rend., 105 (1887), 702; J. MAXIMOVITCH: Compt.
rend., 106 (1888), 366, 1441.

TABELLE XXIII.

Wirkung des α -Naphthols auf die Atmung
von *Proteus vulgaris*.

Substrat: m/30 pH 7,2

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme		
	Konzentration des α -Naphthols		
	m/500	m/1000	m/2000
Bernsteinsäure	5,6	7,7	48,2
Fumarsäure		8,8	
Äpfelsäure		11,0	
Citronensäure	3,5	3,6	
Alanin	6,3	6,8	
Milchsäure	20,5	73,8	
Ameisensäure		85,9	
Glucose		105,6	141,0
Essigsäure		4,7	
Äthylalkohol		54,9	
Glycerinphosphorsäure	21,1	11,5	
Glycerin		122,1	
Ohne Substrat		159,7	

Über die Abhängigkeit der Wirkungsstärke des α -Naphthols von seiner Konzentration kann man aus Tabelle XXIV und Fig. 7 die dem Fall von Thymol sehr ähnlichen Versuchsergebnisse ersehen. Der Hemmungsgrad ist zwischen m/1000 und m/5000 von der Konzentration stark abhängig. Die Hemmung beträgt beinahe 50% in m/2000 Konzentration. In den Konzentrationen niedriger als m/5000 wirkt α -Naphthol nur äusserst schwach hemmend, und infolgedessen verläuft die Hemmung-Konzentration-Kurve flacher.

TABELLE XXIV.

Wirkung des α -Naphthols in verschiedenen Konzentrationen
auf die Atmung von *Proteus vulgaris*.

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme				
	Konzentration des α -Naphthols				
	m/500	m/1000	m/2000	m/5000	m/10000
Bernsteinsäure	5,6	7,7	48,2	84,5	98,5

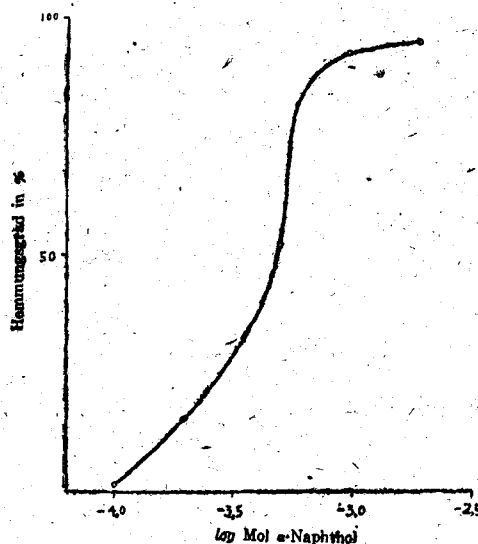


Fig. 7

(vgl. Tab. XXIV)

Die Hemmung der Bernsteinsäureoxydation ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Wie man in Tabelle XXV bemerkt, ist die Naphtholhemmung wie beim Fall von Thymol in saurem Medium schwächer als in alkalischem. Analoge pH-Abhängigkeit gilt auch für Glucoseoxydation.

TABELLE XXV.

pH-Abhängigkeit der α -Naphtholwirkung.*Proteus vulgaris* α -Naphthol: m/1000

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme			
	pH 6,4	pH 7,2	pH 7,6	pH 8,0
Bernsteinsäure	22,7	7,7	11,4	10,3
Glucose	102,7	113,9		90,3

Um die ungleichmässigen Hemmungen, welche durch Naphthol je nach den zugesetzten Substratarten hervorgerufen werden, von anderen Bakterien zu kontrollieren, habe ich weiter die Versuche an *Bacillus pyocyaneus* ausgeführt. Wie in Tabelle XXVI ersichtlich, wirkt α -Naphthol auch in diesem Falle in ganz ähnlicher Weise wie beim Fall von *Proteus vulgaris* ein. Wie bei Thymol scheint die Hemmungsstärke durch α -Naphthol im allgemeinen an *Bacillus pyocyaneus* schwächer als an *Proteus vulgaris*.

TABELLE XXVI.

Wirkung des α -Naphthols auf die Atmung von *Bacillus pyocyaneus*. α -Naphthol: m/1000 pH 7,2

Substrat	Relative O ₂ -Aufnahme
Bernsteinsäure	20,8
Milchsäure	70,0
Äthylalkohol	69,8

Im Gegensatz zu Thymol, tritt die Hemmung durch α -Naphthol plötzlich nach seinem Zusatz auf, bleibt die Sauerstoffaufnahme während längerer Zeit konstant. Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme in der Bernsteinsäureoxydation in Anwesenheit des m/1000 α -Naphthols ist in Tabelle XXVII und Fig. 8 wiedergegeben.

TABELLE XXVII.

Einfluss des α -Naphthols auf die Bernsteinsäureoxydation
von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 0,85 mg Bernsteinsäure: m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm	
	Ohne α -Naphthol	Mit m/1000 α -Naphthol
10	26,5	2,2
20	53,2	4,4
30	79,6	6,6
40	106,4	8,4
50	133,0	10,6
60	159,6	12,8
Q ₀₂	188	14
Hemmung	—	92,8

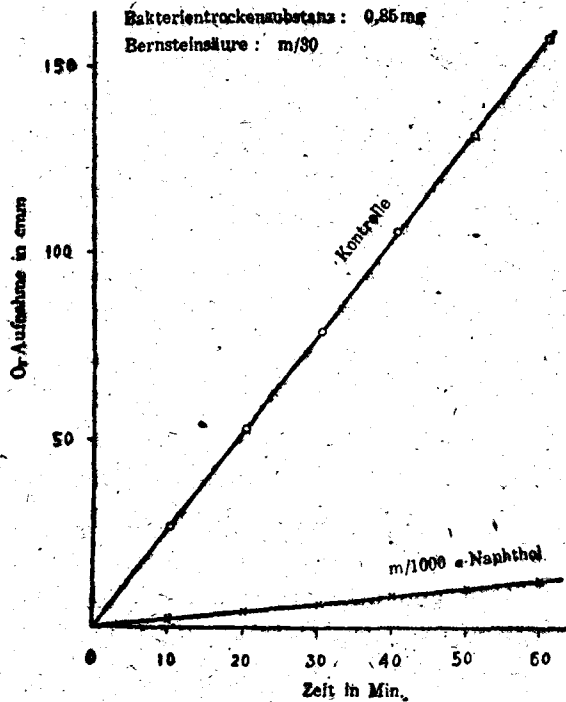


Fig. 8
(vgl. Tab. XXVII)

B. WIRKUNGSWEISE DES NITROPHENOLS.

1. Reversibilität der Hemmung.

Hinsichtlich der Wirkungsweise des Nitrophenols wurde erstens die Reversibilität der Hemmung untersucht. Um zu prüfen, ob die Hemmung durch Nitrophenol reversibel sei, wurde ein Versuch folgenderweise ausgeführt.

Bakteriensuspension wurde in Manometergefäss im Thermostaten von 30° in Gegenwart von m/1000 p-Nitrophenol eine Stunde lang geschüttelt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert, und die niedergeschlagenen Bakterien wurden für vollständige Beseitigung des Nitrophenols aus den Bakterienzellen auf der Zentrifuge mit destilliertem Wasser dreimal gewaschen und schliesslich auf ursprüngliches Volum von NaCl-Lösung suspendiert. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde in zwei Manometergefässe verteilt. Den Bakterien in einem Gefäss wurde nochmals p-Nitrophenol zugegeben. Also wurden die Bakterien in diesem Gefäss zuerst mit Nitrophenol behandelt, sodann Nitrophenol daraus entfernt und schliesslich die Bakterien wiederum damit in Berührung gebracht.

Um den Versuchsfehler zu vermeiden, welcher durch Waschen der Bakterien mittels der Zentrifuge hinsichtlich Atmungsintensität verursacht wird, wurde zugleich folgender Kontrollansatz bereitet. Die Bakterien, welche in Abwesenheit des Nitrophenols eine Stunde lang bei 30° geschüttelt worden waren, wurden mit Hilfe der Zentrifuge in derselben Weise wie beim Fall von Nitrophenolzusatz dreimal gewaschen und schliesslich wie gewöhnlich in ein Gefäss eingekippt. Als Kontrolle wurden ferner zwei Manometergefässe bereitet. Diese Gefässe wurden mit den Bakterien beschickt, welche wie in den vorhergehenden gewöhnlichen Versuchen im ersten Kapitel vorher bei 30° nicht geschüttelt und auch nicht auf der Zentrifuge mehrmals gewaschen worden waren. Ein Gefäss enthielt kein Nitrophenol. In das andere wurde m/1000 p-Nitrophenol eingekippt.

Die Sauerstoffaufnahme in diesen fünf Arten der Gefässe wurde in gewöhnlicher Weise unter Substrat- sowie Phosphatpufferzugabe

gemessen. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt und zwar mit denselben Resultaten. Ein Beispiel aus den Versuchsergebnissen über die Bernsteinsäureveratmung von *Proteus vulgaris* ist in Tabelle XXVIII und Fig. 9 gegeben. Man ersieht aus der Tabelle, dass die durch p-Nitrophenol herabgesetzte Atmung nach Beseitigung des Gifts wieder auf die Grösse der mit Nitrophenol nicht behandelten Atmung steigt. Vergleiche hierzu Gefäss IV mit III, aber nicht mit Gefäss I.

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, dass die Wirkung des p-Nitrophenols auf die Zellatmung keine irreversible Zerstörung des Atmungsmechanismus bzw. der an Zellatmung beteiligten Enzyme, sondern ihre völlig reversible Hemmung ist, und dass die Hemmung durch Auswaschen vollständig beseitigt werden kann.

TABELLE XXVIII.

Reversibilität der p-Nitrophenolhemmung bei Bernstein-
säureatmung von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien : 1,5 mg p-Nitrophenol : m/1000
Bernsteinsäure : m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm				
	Gefäss I	Gefäss II	Gefäss III	Gefäss IV	Gefäss V
	Ohne Vorbehandlung		Bei 30° 1 Std. geschüttelt, dann 3 mal zentrifugiert.	Mit p-Nitrophenol bei 30° 1 Std. geschüttelt, dann 3mal durch Zentrifugierung gewaschen.	
	Ohne p- Nitrophenol	Mit p- Nitrophenol	Ohne p- Nitrophenol	Ohne p- Nitrophenol	Mit p- Nitrophenol
10	44,3	2,0	26,6	26,5	1,7
20	89,2	4,0	51,8	52,6	2,3
30	133,3	6,0	78,4	79,4	4,4
40	177,5	8,0	104,9	104,9	5,4
50	222,0	9,0	131,5	130,4	7,0
60	265,9	11,4	156,7	155,5	7,6
Verhält- nis	100	4,3	59,9	99,2	4,9

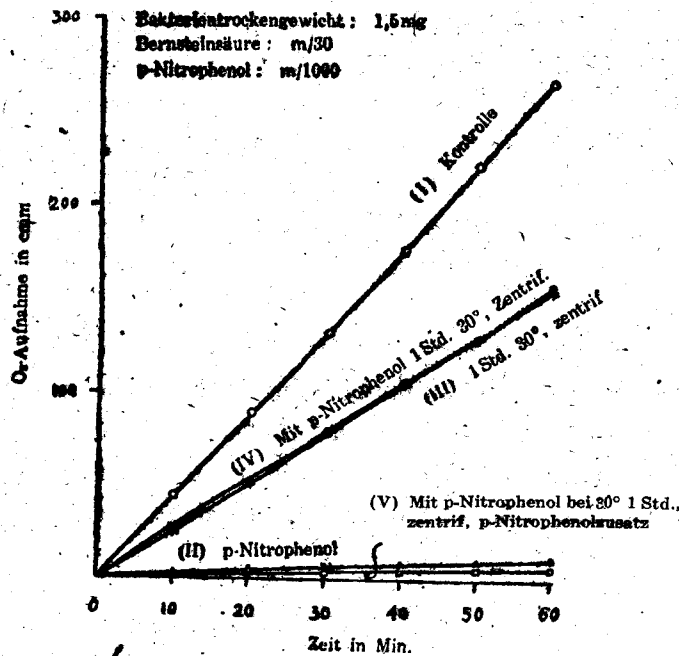


Fig. 9

(vgl. Tab. XXVIII)

Wenn man Gefäß I mit III vergleicht, so kann man erkennen, dass aufgenommene absolute Sauerstoffmenge durch oben erwähnte Behandlung ziemlich herabgesetzt wird. Die Erniedrigung der Atmung betrug etwa 40%. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die Bakterien durch mehrmalige wiederholte Zentrifugierung in ihrer physiologischen Organisation mechanisch gewissermassen gestört und infolgedessen in ihrer respiratorischen Wirksamkeit erniedrigt werden. - Etwager Verlust an Bakterien von der Suspension, welcher durch unvollkommenen Niederschlag bei Zentrifugierung verursacht wird, darf in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht ausser Betracht gelassen werden. Allerdings wurde bei den Versuchen möglichste Verminderung dieser Versuchsfehler stets sorgfältig berücksichtigt.

Wie man ferner in der fünften Spalte der Tabelle XXVIII erkennt, konnte die Atmung der Bakterien, welche zuerst durch Nitrophenol sich erniedrigte und dann durch Beseitigung des Giftes auf

den ursprünglichen Wert zurückkehrte, nochmals durch p-Nitrophenol wieder gehemmt werden. Überdies ist bemerkenswert, dass der Hemmungsgrad in gleicher Grössenordnung ist wie derjenige bei den Bakterien, welche nicht vorher mit p-Nitrophenol behandelt worden sind. Also ist es klar, dass die p-Nitrophenolhemmung der Zellatmung stets reproduzierbar ist.

Ich habe weiter untersucht, ob die Hemmung durch p-Nitrophenol nach Incubation der Bakterien mit p-Nitrophenol und Substrat zusammen auch reversibel sei. Die Bakterien wurden mit m/30 Bernsteinsäure und m/1000 p-Nitrophenol eine Stunde bei 30° geschüttelt und dann gewaschen. Als Kontrolle diente hierbei die Bakteriensuspension, welche nur mit Bernsteinsäure, aber ohne p-Nitrophenol auf dieselbe Weise behandelt worden war. Sauerstoffaufnahme dieser behandelten Bakteriensuspensionen wurde wie gewöhnlich in Manometergefässen gemessen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle XXIX angegeben. Bei den Bakterien, welche mit Substrat und Gift zusammen incubiert worden waren, war die durch p-Nitrophenol veranlasste Hemmung durch Auswaschen der Bakterien teilweise reversibel; Reversibilität betrug 62,2% (Gefäss V). Die Herabsetzung der Sauerstoffaufnahme durch Zentrifugierung war auch dabei bemerkbar, wie dies aus der Vergleichung von Gefässen I und II hervorgeht. Dagegen wurde der Hemmungsgrad durch Zentrifugierung nicht verändert, wie man bemerkt, wenn man Gefässe III und V in dieser Tabelle vergleicht.

Nur aus diesen Versuchen lässt sich aber der Unterschied zwischen den Resultaten von Tabellen XXVIII und XXIX nicht entscheidend erklären, doch ist es daraus klar, dass die unvollkommene Reversibilität der Nitrophenolwirkung bei vorbehandelten Bakterien ihre Ursache in der Einwirkung des Giftes in Anwesenheit des Substrats findet. Vermutlich wurde durch das Zusammenwirken von Gift und Substrat im Atmungsmechanismus der Bakterien teilweise eine irreversible Veränderung von unbekannter Natur hervorgerufen.

TABELLE XXIX.

Effekt der Incubation der Bakterien mit Bernsteinsäure
und p-Nitrophenol auf p-Nitrophenolhemmung.

Proteus vulgaris Trockengewicht der Bakterien: 0,45 mg p-Nitrophenol: m/1000
Bernsteinsäure: m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm				
	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III	Gefäß IV	Gefäß V
	Incubation mit Bernsteinsäure und Phosphatpuffer, 1 Std. bei 30°.		Incubation mit Bernsteinsäure, Phosphatpuffer und p-Nitrophenol, 1 Stunde bei 30°.	Auf der Zentrifuge 3 mal gewaschen	
	Ohne p-Nitrophenol	Ohne p-Nitrophenol		Ohne p-Nitrophenol	Mit p-Nitrophenol
10	12,7	9,1	0,6	5,5	0,9
20	26,5	18,5	1,2	11,3	1,5
30	39,5	27,2	1,9	16,7	2,1
40	53,2	36,2	2,5	21,9	3,0
50	66,2	45,2	3,2	27,7	3,9
60	78,9	53,9	3,9	33,5	4,8
Verhältnis	100	100	4,9	62,2	8,9

Auch beim Fall von Glucoseoxydation ist die Nitrophenolwirkung ganz reversibel. Durch vollständiges Auswaschen der mit Nitrophenol behandelten Bakteriensuspension erhöht sich die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme wieder auf den Grad der unbehandelten Bakterien, und folglich ist keine Nachwirkung des Gifts mehr bemerkbar (siehe Tabell XXX). Hingegen, wie in der dritten Spalte der Tabelle erkennbar, kann bei den Bakterien, welche nach der Behandlung von 1-stündiger Incubation mit p-Nitrophenol davon vollständig befreit werden, durch Nachzugabe des p-Nitrophenols ihre Glucoseatmung wieder beschleunigt werden, wenn auch in geringerem Grad als diejenige der unbehandelten Bakterien.

TABELLE XXX.

Reversibilität der p-Nitrophenolwirkung bei
Glucoseveratmung von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,1 mg p-Nitrophenol: m/1000
Glucose: m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm		
	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
	Incubation mit Glucose und Phosphatpuffer 1 Std. bei 30°, dann durch Zentrif. 3 mal gewaschen.	Incubation mit Glucose, Phosphatpuffer und p-Nitrophenol 1 Stunde bei 30°, dann durch Zentrifuge 3 mal gewaschen.	
	Ohne p-Nitrophenol	Ohne p-Nitrophenol	Mit p-Nitrophenol
10	11,4	11,8	17,9
20	23,2	23,8	35,5
30	34,0	35,9	53,2
40	45,5	46,9	70,7
50	57,0	59,6	88,0
60	68,1	71,1	105,1
Verhältnis	100	104,4	154,3

In der bereits oben zitierten Mitteilung von FIELD, MARTIN FIELD¹⁾ wurde die Reversibilität der α -Dinitrophenolwirkung im Zusammenhang mit ihrer Abhängigkeit von pH nachgewiesen. Nach diesen Autoren wurde Glucoseatmung von Hefe durch α -Dinitrophenol in geringerer Konzentration bei pH 6,8 beträchtlich beschleunigt, dagegen bei pH 5,9 deutlich gehemmt. Wenn man durch Säurezusatz die Reaktion des Mediums in Manometergefäßen von pH 6,8 bis pH 5,9 ansäuerte, so ging die Wirkung des Dinitrophenols, welche bei pH 6,8 Hefeatmung beschleunigt hatte, plötzlich in Hemmung über. Ferner, wenn man durch Alkalizusatz pH von 5,9 wieder auf 6,8

1) J. FIELD, 2ND., A. W. MARTIN und S. M. FIELD: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 4 (1934), 406.

regulierte, so kehrte die gehemmte Sauerstoffaufnahme wieder auf den ursprünglichen Wert von pH 6,8 zurück. Es ist also nach diesen Autoren gelungen, die Wirkung des α -Dinitrophenols hinsichtlich der Glucoseatmung durch pH-Änderung von Beschleunigung auf Hemmung und ferner von Hemmung wieder auf Beschleunigung umzuschalten. Durch diese Versuchen wurde die Reversibilität der α -Dinitrophenolwirkung nachgewiesen. Analoges Verhalten wurde nach diesen Autoren auch bei β -Dinitrophenol bestätigt.

Im Gegensatz zu Nitrophenol scheint die Wirkung des Thymols zum grössten Teil irreversibel. Sämtliche Untersuchung wie bei p-Nitrophenol wurde mit Thymol ausgeführt. Wie aus den in Tabelle

TABELLE XXXI.

Reversibilität der Thymolwirkung bei Bernsteinsäureatmung von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,4 mg Thymol: m/1000
Bernsteinsäure: m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm					
	Gefäss I	Gefäss II	Gefäss III	Gefäss IV	Gefäss V	Gefäss VI
	Incubation mit Phosphatpuffer 1 Stunde, bei 30°	Incubation mit Phosphatpuffer und Thymol 1 Stunde, bei 30°		Incubation mit Phosphatpuffer und Substrat, 1 Std., bei 30°	Incubation mit Phosphatpuffer, Substrat und Thymol 1 Stunde, bei 30°	
	auf der Zentrifuge wiederholt gewaschen					
	Ohne Thymol	Ohne Thymol	Mit Thymol	Ohne Thymol	Ohne Thymol	Mit Thymol
10	42,2	16,0	2,9	30,3	9,0	3,1
20	83,7	29,8	6,4	61,5	16,5	5,8
30	126,2	41,5	9,9	91,4	23,5	8,5
40	168,4	52,8	13,3	119,6	30,2	11,2
50	210,5	63,3	17,4	147,3	37,0	13,3
60	252,3	74,9	21,4	176,2	43,0	15,3
Verhältnis	100	29,7	8,5	100	24,4	8,7

XXXI angegebenen Versuchsergebnissen ersichtlich, stieg die durch Thymol herabgesetzte Bernsteinsäureatmung durch Auswaschen der Bakterien wieder nur auf etwa 30% der nicht mit Thymol zugesetzten Atmung. Incubation mit Substrat und Gift zusammen übte hierbei fast keine Veränderung der Versuchsergebnisse aus.

In Übereinstimmung mit der Irreversibilität der Thymolwirkung steht die bereits im ersten Kapitel dieser Mitteilung bestätigte Tatsache, dass die Wirkung des Thymols nicht von Anfang des Giftzusatzes an konstant verläuft, sondern sich gewissermassen sukzessiv mit der Zeit verstärkt. Es mag angenommen werden, dass Thymol

TABELLE XXXII.

Reversibilität der α -Naphtholwirkung bei Bernsteinsäureatmung von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,2 mg α -Naphthol: m/1000
Bernsteinsäure: m/30 pH 7,2 30°

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm						
	Gefäss I	Gefäss II	Gefäss III	Gefäss IV	Gefäss V	Gefäss VI	Gefäss VII
		Incubation mit Phosphatpuffer 1 Std. bei 30°	Incubation mit Phosphatpuffer und α -Naphthol 1 Std. bei 30°	Incubation mit Phosphatpuffer und Substrat 1 Std. bei 30°	Incubation mit Phosphatpuffer, Substrat und α -Naphthol 1 Std. bei 30°		
	auf der Zentrifuge wiederholt gewaschen						
	Ohne α -Naphthol	Ohne α -Naphthol	Ohne α -Naphthol	Mit α -Naphthol	Ohne α -Naphthol	Ohne α -Naphthol	Mit α -Naphthol
10	51,3	38,5	29,8	3,1	24,2	21,2	3,3
20	104,8	77,3	59,5	6,1	50,0	43,6	6,6
30	158,3	115,5	89,7	9,0	75,4	65,5	9,4
40	217,8	153,3	119,5	12,2	101,2	86,6	12,5
50	267,3	191,5	150,4	15,0	127,6	109,5	15,3
60	312,3	227,0	182,3	18,0	153,7	132,9	17,9
Verhältnis		100	: 80,3	: 7,9		100	: 86,5 : 11,5

auf den Atmungsmechanismus oder auf die Zellfunktion irgendeine allgemeine Inaktivierung von irreversibler Natur hervorrufe. Jedoch kann die schon bestätigte Tatsache, dass die Hemmung je nach den zugegebenen Substratarten verschieden ist, nicht durch diese Auffassung erklärt werden.

Die Wirkung des α -Naphthols ist dagegen reversibel. Die in Tabelle XXXII wiedergegebenen Messungen zeigen, dass die vorher durch m/1000 α -Naphthol über 90% gehemmte Bernsteinsäureatmung von *Proteus vulgaris* nach Beseitigung des α -Naphthols durch Auswaschen wieder auf 80% der unvergifteten Kontrolle steigt. Wie beim Fall von p-Nitrophenol wurde die durch Auswaschen wieder gesteigerte Atmung durch zweiten Giftzusatz abermals herabgesetzt. Incubation der Bakterien mit Gift und Substrat zusammen übte in diesem Falle keine Verminderung der Reversibilität aus.

2. Einfluss des p-Nitrophenols auf die Oxydationsweise von Glucose und auf RQ.

Schon aus den im früheren Kapitel angeführten experimentellen Ergebnissen hat man gesehen, dass die Glucoseveratmung der Bakterien durch p-Nitrophenol in geeigneten niedrigen Konzentrationen ausserordentlich gesteigert wurde. Wir gehen nun zur Frage über, ob Nitrophenol nur auf die Geschwindigkeit der Oxydation eine Veränderung ausübt, oder ob der Mechanismus der Oxydation durch Nitrophenol gründlich verändert wird. Um diese Frage zu lösen, wurde erstens die Einwirkung des Nitrophenols auf die Glucoseoxydation in Anwesenheit von Glucose in möglichst niedrigen Konzentration während längerer Zeit messend verfolgt. Die Messung dauerte etwa 3-4 Stunden lang bis zum Zeitpunkt, wo die Sauerstoffaufnahme praktisch zum Stillstand kam. Aus den aufgenommenen totalen Sauerstoffmengen wurde die Molzahl des dabei in Reaktion eintretenden Sauerstoffs berechnet.

Ein typisches Beispiel aus den mehrmals wiederholten Versuchsergebnissen wurde graphisch in Fig. 10 angegeben. Zahlenwerte von

Fig. 10

(vergl. Protokoll Nr. 1)

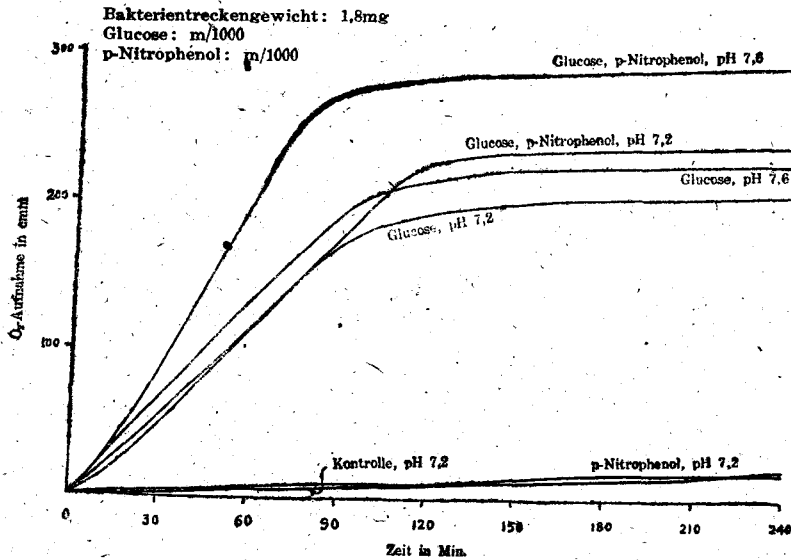


Fig. 10 kann man in Versuchsprotokoll Nr. 1 finden. Dabei wurde Sauerstoffaufnahme von *Proteus vulgaris* in Gegenwart von m/1000 Glucose bei pH 7,2 und 7,6, in An- und Abwesenheit von m/1000 p-Nitrophenol 4 Stunden lang gemessen. Wie in Fig. 10 bemerkbar, blieb die Geschwindigkeit der Oxydation in diesen Versuchen, bei denen nur geringe Menge von Glucose als Substrat hinzugefügt worden war, entweder in Anwesenheit des zugesetzten p-Nitrophenols oder in seiner Abwesenheit nur etwa 80-90 Minuten lang konstant erhalten. Die plötzliche Abnahme, welche nun in der Folge der anfänglichen beständigen Geschwindigkeit eintrat, zeigte einen Kurververlauf, wo die folgende langsame Atmung allmählich linear mit der Zeit zurückging. Die oben erwähnte starke Geschwindigkeitsabnahme beruht vermutlich darauf, dass in diesem Augenblick das zugefügte Atmungssubstrat, Glucose, im grösseren Teil durch Bakterien verbraucht werde und aus dem Medium verschwunden sei.

Zum Vergleich der aufgenommenen totalen Sauerstoffmengen sind die gerechneten Resultate in Tabelle XXXIII zusammenfassend wieder angegeben. In der zweiten Zeile der Tabelle sind die für Glucoseoxydation eigens gebrauchten absoluten Sauerstoffmengen gezeigt. Das wurde folgendermassen berechnet; von den aufgenommenen totalen Sauerstoffmengen in der ersten Zeile werden die Sauerstoffmengen der Leeratmung der Bakterien, d.h. der Atmung ohne Substratzugabe, abgezogen. Molzahl des Sauerstoffs wurde in folgender Weise gerechnet. Falls man annimmt, dass Glucose durch Bakterien vollständig oxydiert werde, so müssten gemäss folgender Gleichung pro 1 Mol Glucose 6 Mole Sauerstoff verbraucht werden.



Da bei meiner Versuchsbedingung 2,5 ccm einer 1/1000 molarer Konzentration der Glucose verwendet worden ist, beträgt das für vollständige Oxydation der verwendeten Glucose erforderliche Volum des Sauerstoffs bei 30°,

$$22.400 \text{ cmm} \times \frac{2,5}{1000} \times \frac{273 + 30}{273} \times 6 = 372,9 \text{ cmm}$$

Aus diesem theoretischen Wert kann man die für die Oxydation von 1 Mol Glucose verbrauchten praktischen Molzahlen des Sauerstoffs berechnen. Diese Zahlen sind in der fünften Zeile der Tabelle XXXIII angegeben.

Dass zugegebene Glucose durch Bakterien nicht vollständig, sondern nur teilweise oxydiert wird, ist bereits von COOK und STEPHENSON¹⁾ an *Bacillus coli* nachgewiesen. Sie fanden, dass die Mengen des aufgenommenen Sauerstoffs in Bezug auf die Mengen der verbrauchten Glucose stark zurückblieben im Vergleich mit denjenigen, welche sich bei Annahme vollständiger Oxydation erwarten liessen. Nach den Angaben dieser Autoren erreichte die Glucoseoxydation durch *Bacillus coli* nur 2/3 der vollständigen Oxydation. In Übereinstimmung damit fand auch an *Proteus vulgaris* keine voll-

1) R. P. COOK und M. STEPHENSON: Biochem. Journ., 22 (1928), 1368.

TABELLE XXXIII.

 Einfluss des p-Nitrophenols auf die Glucoseoxydation
 von *Proteus vulgaris*.

Glucose : m/1000 p-Nitrophenol : m/1000 30°

	pH 7,2		pH 7,6	
	—	p-Nitrophenol	—	p-Nitrophenol
Aufgenommene totale O ₂ -Menge in 240 Min. in cmm	217,7	251,8	238,2	305,1
Dieselbe der Leeratmung in 240 Min. in cmm	20,2	20,3	20,2	20,3
Für Glucoseoxydation verbrauchte totale O ₂ -Menge in cmm	197,5	231,5	218,0	284,8
Verhältnis	100	117,2	100	130,6
Molzahl des Sauerstoffs pro 1 Mol Glucose	3,2	3,7	3,5	4,6

ständige Oxydation der Glucose statt, und nach meinen eigenen Versuchen beträgt die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs nur 53%–58% des Wertes von vollständiger Oxydation.

Durch Zugabe des p-Nitrophenols wird, wie bereits erwähnt, die Anfangsgeschwindigkeit der Glucoseoxydation deutlich gesteigert. Da in dieser Versuchreihe Glucose nur in äusserst geringer Konzentration verwendet wurde, war die beschleunigende Wirkung des p-Nitrophenols nicht sehr merkwürdig wie beim Fall von Glucosezugabe in höherer Konzentrationen, insbesondere war es der Fall bei pH 7,2. Es geht aber aus der Tabelle deutlich hervor, dass p-Nitrophenol nicht nur auf die Geschwindigkeit der Glucoseoxydation eine Steigerung ausübt, sondern auf den Oxydationsmechanismus der Bakterien eine Veränderung hervorbringt. In Gegenwart des m/1000 p-Nitrophenols nimmt *Proteus vulgaris* pro 1 Mol Glucose 3,7 Mole Sauerstoff bei pH 7,2, und 4,6 Mole Sauerstoff bei pH 7,6 auf, während bei seiner Abwesenheit die aufgenommene Sauerstoff-Molzahl pro 1 Mol Glucose bei pH 7,2 und 7,6 je 3,2 bzw. 3,5 ist, d.h. 0,5–1,1 Mole Sauerstoff werden durch Einwirkung des p-Nitrophenols übernormal

aufgenommen.

In diesem Zusammenhang werden einige Angaben früherer Autoren betreffs der Glucoseoxydation berührt. BARKER¹⁾ hat die Oxydation der Glucose durch eine Alge, *Prototheca Zopfi*, quantitativ gemessen und bestätigt, dass die Alge nur 2 Mole Sauerstoff pro 1 Mol Glucose aufnehmen konnte. Er hat eine Erklärung dieser unvollständigen Oxydation darin gefunden, dass in den Zellen neben dem Atmungsvorgang noch die mit der Atmung so untrennbar verknüpften assimilatorischen Prozesse stets stattfinden. Da für Assimilation keine Sauerstoffaufnahme erforderlich ist, muss nach der Ansicht von BARKER die zugefügte Glucose wenigstens zum Teil in diesen assimilatorischen Prozessen ohne Sauerstoffaufnahme verbraucht werden. Diese Ansicht ist von mehreren Forschern an verschiedenen Mikroorganismen, z.B. *Spirillum*arten²⁾, *Bacillus coli*³⁾, *Pseudomonas calco-acetica*³⁾, *Saccharomyces cerevisiae*⁴⁾ usw. mit verschiedenen Atmungssubstraten ausser Glucose, z.B. Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Glycerin, Fumarsäure, Bernsteinsäure usw. gestützt worden. Vor kurzem hat OKUNUKI⁵⁾ sich auch mit dieser Frage an verschiedenartigen Hefen beschäftigt und gefunden, dass die meisten Hefen nur 2 bis 3 Mole Sauerstoff pro 1 Mol Glucose aufnehmen können. Die Beziehung ist nach diesem Autor von der Substratkonzentration völlig unabhängig, und daraus hat er geschlossen, dass kein Substrat am Versuchsende mehr im Reaktionsmedium geblieben sei.

CLIFTON und LOGAN³⁾ haben ferner in ihren Untersuchungen dieser "oxydativen Assimilation" an *Bacillus coli* folgende Tatsache gefunden, dass Dinitrophenol, Jodessigsäure und Natriumazid in geeigneten Konzentrationen eine spezifische Hemmungswirkung nur

1) H. A. BARKER: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 8 (1936), 231.

2) G. GIESBERGER: Dissertation, Utrecht, 1936.

3) C. E. CLIFTON: Enzymologia, 4 (1937), 246; C. E. CLIFTON und W. A. LOGAN: Journ. Bact., 37 (1939), 523.

4) R. J. WINZLER: Journ. Cell. and Comp. Physiol., 15 (1940), 343; C. B. VAN NIEL und E. H. ANDERSON: Ebenda, 17 (1941), 49.

5) K. OKUNUKI: Acta Phytochim., 13 (1943), 219.

auf die assimilatorischen Prozesse ausübten, und das respiratorische Prozesse hingegen durch diese Gifte in der versuchten Konzentration fast keine Hemmung erfuhren. Es war infolgedessen nach diesen Autoren möglich, dass sie unter Anwendung der oben erwähnten Giftsubstanzen in geeigneten Mengen die Assimilation verhinderten und eine vollkommene Oxydation des Atmungssubstrats durch die Bakterien herbeiführten. In der Tat haben sie nachgewiesen, dass *Bacillus coli* in Gegenwart von $m/2000$ α -Dinitrophenol bzw. $m/400$ Natriumazid die Glucose vollständig in Kohlenoxyd und Wasser oxydieren kann. Diese assimilationshemmende und folglich atmungssteigernde Wirkung des Dinitrophenols bzw. des Natriumazids wurde ferner von WINZLER¹⁾ an Hefe bestätigt.

Bei meinen eigenen Versuchen an *Proteus vulgaris* wurde die Glucoseoxydation, wie aus den vorliegenden Versuchsergebnissen hervorgeht, durch p-Nitrophenol nicht nur an Geschwindigkeit gesteigert, sondern auch zugleich an der Molzahl der oxydierten Glucose vermehrt. Diese Vermehrung der verbrauchten Sauerstoffmengen durch Nitrophenol möge nach der Ansicht von CLIFTON und LOGAN in der Weise erklärt werden, dass die mit Atmung verknüpfte Assimilation durch Nitrophenol gestört und folglich die Sauerstoffaufnahme gesteigert werde. Jedoch konnte ich an *Proteus vulgaris* keine vollkommene Oxydation der Glucose, d.h. die Aufnahme von 6 Molen Sauerstoff pro 1 Mol Glucose, beobachten. Im günstigsten Fall nahm *Proteus vulgaris* bei pH 7,6 in Gegenwart von $m/1000$ p-Nitrophenol 4,7 Mole Sauerstoff pro M Glucose auf.

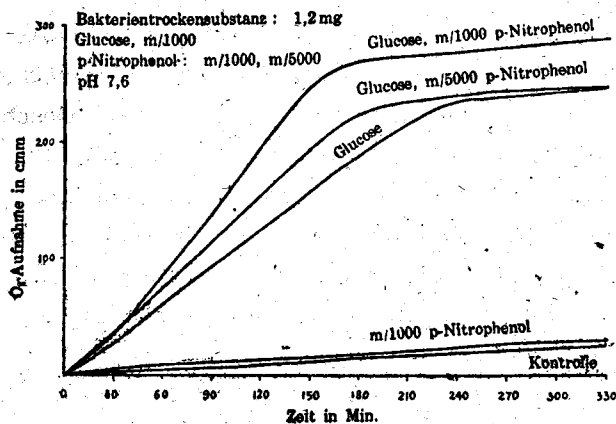
p-Nitrophenol in niedrigeren Konzentrationen übt keine Wirkung auf Oxydationsweise der Glucose aus, während die Geschwindigkeit der Oxydation deutlich beschleunigt wird. Ein Beispiel von $m/5000$ p-Nitrophenol im Vergleich mit dem Fall von $m/1000$ ist in Fig. 11 graphisch dargestellt (vergl. auch Versuchsprotokoll Nr. 2). Die Geschwindigkeit der Glucoseoxydation wurde durch $m/5000$ p-Nitrophenol beträchtlich beschleunigt, und die Atmungskurve erreichte schon nach etwa 180 Minuten fast 90% der maximalen Höhe. In

1) R. J. WINZLER: Loc. cit.

dieser Zeit erreichte die Kontrollkurve ohne p-Nitrophenol nur etwa 70% der maximalen Höhe. Der Kurvenknick fand noch später statt, und die Kurve kam erst nach 220 Minuten über 90%-ige Höhe an. Die Summen des aufgenommenen Sauerstoffs in 330 Minuten waren hierbei, unabhängig von An- und Abwesenheit des p-Nitrophenols, einander ganz gleich. Bezüglich der unvollständigen Glucoseoxydation und der Wirkungen des p-Nitrophenols auf die Glucoseveratmung der Bakterien sind weitere eingehende Untersuchungen notwendig, welche im Gang sind und später an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Fig. 11

(vergl. Protokoll Nr. 2)



Im Zusammenhang mit der Beeinflussung des Oxydationsgrades von Glucose durch Nitrophenol wurde das Verhalten des respiratorischen Quotienten (RQ) gegenüber betreffende Giftsubstanz geprüft. RQ-Bestimmung wurde folgendermassen ausgeführt. Ausser den zwei Manometergefässen, welche zur Feststellung der Sauerstoffaufnahme in An- und Abwesenheit des p-Nitrophenols dienen, wurden gleichzeitig noch zwei Gefässe bereitet. Diese Gefässe enthielten keine Kalilauge, welche in den anderen zwei Gefässen für die Absorption der Atmungskohlensäure im Einsatz des Gefässes eingekippt wurde. Ein Gefäss enthielt p-Nitrophenol und ein anderes nicht. Die bei den letzteren zwei Manometern beobachteten Druck-

änderungen bedeuten also die Summe der Sauerstoffaufnahme und der Kohlensäureabgabe. Da jedoch ein erheblicher Teil der Kohlensäure im Reaktionsmedium gebunden wurde, wurde am Ende des Versuchs alle gebundene Kohlensäure mittels der vorher in der Ansatzbirne des Gefäßes vorhandenen konzentrierten Citronensäurelösung aus der Lösung vertrieben. Noch ein Gefäß diente zur Feststellung der zu Beginn des Versuchs bereits in der Flüssigkeit eventuell vorhandenen Kohlensäure; auch hier wurde die Kohlensäure durch Zusatz von Citronensäure vertrieben. Dadurch konnte die schon vor Beginn der Messung im Versuchsmedium gelöst enthaltene Kohlensäure wegkompensiert werden. Folglich wurde durch Ablesung dieser Manometer die abgegebene Kohlensäure bestimmt und daraus RQ berechnet. Wie in Tabelle XXXIV ersichtlich, erfuhr RQ durch Einwirkung des p-Nitrophenols nur eine geringe Erniedrigung.

TABELLE XXXIV.

Einfluss des p-Nitrophenols auf RQ bei Glucoseatmung von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,4 mg Glucose: m/30
p-Nitrophenol: m/1000 pH 7,2

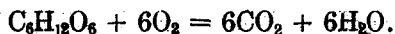
	Ohne p-Nitrophenol	Mit p-Nitrophenol
Aufgenommene Sauerstoffmenge während 1 Std. in cmm	99,0	178,2
Abgegebene Kohlensäuremenge während 1 Std. in cmm	93,9	155,0
RQ	0,95	0,87

Nach der Ansicht von CLIFTON¹⁾ über die "oxydative Assimilation" der Mikroorganismen ist die empirische Zusammensetzung des gebildeten Assimilationsprodukts fast genau diejenige eines Kohlenhydrats (CH₂O). Eine Glucoseoxydation würde dann nach folgender Gleichung vor sich gehen;

1) C. E. CLIFTON: Loc. cit.



Der respiratorische Quotient dieser Gesamtreaktion muss eins sein, ebenso wie im Fall der vollständigen Oxydation der Glucose nach folgender Reaktionsgleichung:



Die in der Tabelle XXXIV verzeichneten Werte der RQ sind in geringerem Masse kleiner als der theoretische Wert, besonders im Fall von p-Nitrophenolsugabe.

3. Zusammenwirkung des p-Nitrophenols und des Kaliumcyanids auf Bakterienatmung.

FIELD, MARTIN und FIELD¹⁾ berichteten, dass α -Dinitrophenol auf die vorher durch Natriumcyanid gehemmte Glucoseatmung von Hefe weiter eine hemmende oder beschleunigende Wirkung ausüben kann. Nach diesen Autoren wurde die Glucoseatmung, welche durch m/1000 Natriumcyanid um 86% herabgesetzt worden war, durch Zusatz des 400 mg α -Dinitrophenols pro 1 Liter (m/9200 Konzentration) bei pH 6,8 um etwa 20% befördert, dagegen wurde dieselbe Atmung bei demselben pH durch die genannte Substanz in 20-facher Konzentration weiter erniedrigt, welche für die Beschleunigung der durch Natriumcyanid nicht vergifteten Atmung optimale Konzentration ist. Bei der Nachprüfung dieser FIELDSchen Versuche, konnten hingegen DE MEIO und BARRON²⁾ keine beschleunigende Wirkung des α -Dinitrophenols auf die durch Kaliumcyanid gehemmte Atmung beobachten. Nach diesen Autoren wirkte α -Dinitrophenol nur in viel geringerem Grad beschleunigend auf die intakte Hefeatmung, und ferner wurde die Atmung, welche vorher durch Kaliumcyanid erniedrigt worden war, durch α -Dinitrophenol weiter herabgesetzt.

Ich habe mich mit dieser Frage an *Proteus vulgaris* beschäftigt.

1) J. FIELD, 2ND., A. W. MARTIN und S. M. FIELD: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 31 (1934), 997.

2) R. H. DE MEIO und E. S. G. BARRON: Ebenda, 32 (1934), 36.

In diesen Versuchreihen kamen vier mit je zwei Ansatzbirnen versehene Manometergefäße zur Verwendung. Ein Gefäß diente als Kontrolle. Andere drei Gefäße enthielten in je einer Ansatzbirne Kaliumcyanidlösung und in einer anderen p-Nitrophenollösung. Die Bakterien erfuhren drei verschiedenartige Behandlungen. Nach 30-minütiger Messung der Sauerstoffaufnahme unter Glucosezugabe wurde erstens Kaliumcyanid von der einen Ansatzbirne durch Drehung des Gefäßstopfens in Hauptraum des ersten Manometergefäßes, der die Versuchslösung enthielt, eingesetzt. Die Druckänderung wurde dann 30 Minuten lang abgelesen. Nach dieser Zeit wurde die Bakteriensuspension zweitens durch dieselbe Operation mit p-Nitrophenollösung zugegeben, welche vorher in die andere Ansatzbirne des Gefäßes eingekippt worden war. Die Sauerstoffaufnahme wurde weiter 30 Minuten messend verfolgt. Das zweite Gefäß wurde

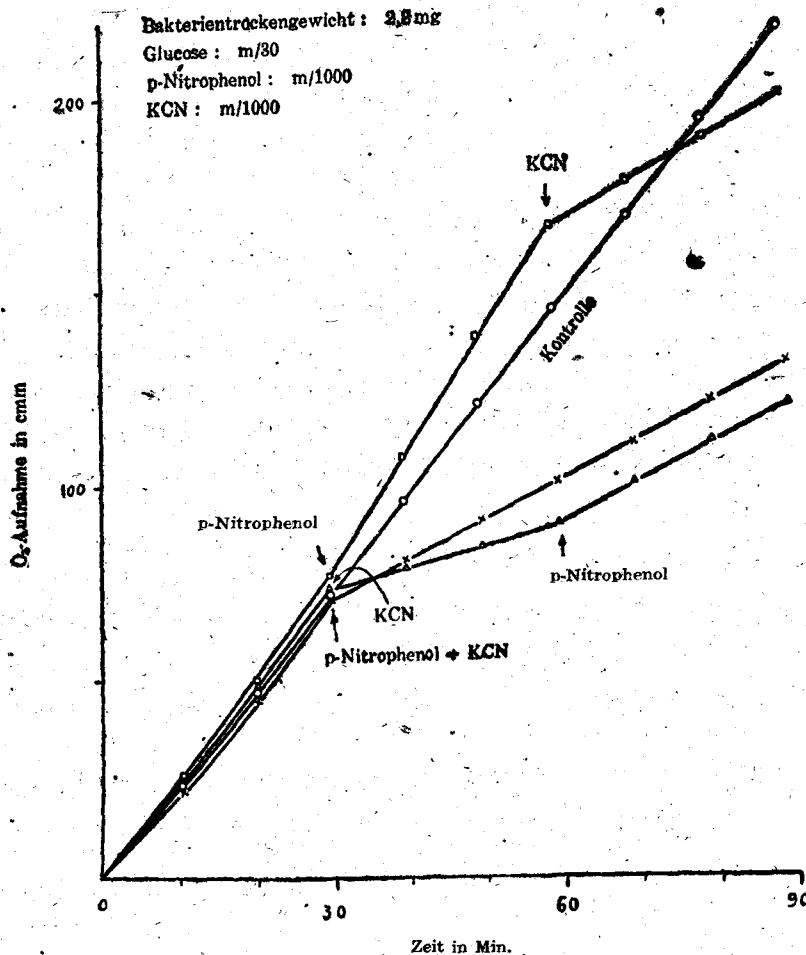
TABELLE XXXV.

Zusammenwirkung des Kaliumcyanids und des p-Nitrophenols
auf die Glucoseatmung von *Proteus vulgaris*:

Bakterientrockengewicht: 2,2 mg Glucose: m/30 Kaliumcyanid: m/1000
p-Nitrophenol: m/1000 pH 7,6

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm			
	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III	Gefäß IV
10	23,3	23,5	23,7	21,8
20	47,2	47,8	49,6	44,5
30	71,8	71,8	75,9	70,0
		Zusatz des Kaliumcyanids	Zusatz des p-Nitrophenols	Zusatz des Kali- umcyanids und des p-Nitro- phenols
40	95,0	77,2	105,5	79,4
50	119,2	82,6	135,9	88,8
60	143,7	87,8	164,3	98,2
		Zusatz des p-Nitrophenols	Zusatz des Kaliumcyanids	
70	166,4	97,8	175,3	107,7
80	190,9	107,9	185,8	118,4
90	214,8	116,5	196,8	127,8

Fig. 12
(vgl. Tab. XXXV).



in ähnlicher Weise wie das erste Gefäß behandelt, aber mit der Unterschied, dass die Zusatzordnung des Kaliumcyanids und des p-Nitrophenols umgekehrt war; d.h. den Bakterien wurde in diesem Fall erstens p-Nitrophenol zugefügt, und nach 30 Minuten wurde Kaliumcyanid zugesetzt. Den Bakterien im dritten Gefäße wurden nach 30-minütiger Messung der unvergifteten Atmung Kaliumcyanid und p-Nitrophenol gleichzeitig aus beiden Ansatzbirnen zugegeben. Die Sauerstoffaufnahme in diesen vier Manometerarten

ist in Tabelle XXXV und Fig. 12 wiedergegeben. Die Atmungskurve erleidet jedesmal bei Giftzusatz einen Knick, sie wird steiler bei Nitrophenolzusatz und flacher bei Kaliumcyanidzusatz. In Übereinstimmung mit den Angaben von FIELD, MARTIN und FIELD über das Verhalten des α -Dinitrophenols an Hefe, konnte p-Nitrophenol die durch Kaliumcyanid erniedrigte Bakterienatmung beschleunigen. Ferner ist aus meinen Versuchen nachgewiesen worden, dass die vorher mit Hilfe des p-Nitrophenols gesteigerte Atmung durch Kaliumcyanid gehemmt werden kann. Die Wirkungen von beiden Substanzen scheinen also voneinander unabhängig zu sein. Beschleunigende Wirkung des p-Nitrophenols wird durch Kaliumcyanid nicht beseitigt, und auf hemmende Wirkung des Kaliumcyanids ist p-Nitrophenol ohne Einfluss. Ferner sind die Wirkungsgrade dieser Substanz fast in gleicher Grössenordnung in An- und Abwesenheit von anderen Substanzen. Im dritten Gefässe, in welches p-Nitrophenol und Kaliumcyanid zugleich eingekippt wurden, war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme eine Summe der gegenseitigen Wirkungen von beiden Substanzen. In gleicher Konzentration von m/1000 war die hemmende Wirkung des Kaliumcyanids etwas stärker als die beschleunigende Wirkung des p-Nitrophenols und infolgedessen war die Geschwindigkeit der Atmung in Anwesenheit beider Stoffe niedriger als Kontrolle. Das gilt auch bei den ersten und zweiten Gefässen bezüglich der Sauerstoffaufnahme seit dem Zeitpunkt, wo beide Substanzen zugefügt worden waren. Wie in Fig. 12 ersichtlich, verlaufen die drei Atmungskurven endlich nach 60 Minuten bei den Versuchsbedingungen gänzlich parallel.

Vergleichend mit p-Nitrophenol wurde Thymol an Bernsteinsäure- und Milchsäureatmung geprüft. In Anwesenheit des Thymols und des Kaliumcyanids zusammen war die Hemmung der Atmung eine Summe beider hemmenden Wirkungen. Summeneffekt beider Substanzen war von der Zusatzordnung unabhängig; entweder man behandelt die Bakterien erstens mit Thymol und gibt dann Kaliumcyanid zu, oder umgekehrt. Siehe Versuchsprotokolle Nr. 3 und 4.

Ferner habe ich die Beeinflussung der toluolbehandelten Bakterien durch Thymol untersucht. In früherer Mitteilung¹⁾ wurde von mir festgestellt, dass Toluol auf Bernsteinsäure- und Milchsäureatmung von *Proteus vulgaris* nur schwächer hemmend wirkt, während die Oxydationen von anderen Substraten, ausgenommen von Ameisensäureoxydation, durch Toluol ungefähr vollständig vernichtet werden. Wie aus Tabelle XXXVI und Versuchsprotokoll Nr. 5 hervorgeht, konnten die durch Toluol gehemmte Atmungen von Bernsteinsäure und Milchsäure durch Thymol weiter gehemmt werden.

TABELLE XXXVI.

Einfluss des Thymols auf die durch Toluol vorgehemmte
Bernsteinsäureoxydation von *Proteus vulgaris*.

Trockengewicht der Bakterien: 1,1 mg Bernsteinsäure: m/30 Toluolbehandlung: 30 Min. Thymol: m/1000 pH 7,2 30° Kompensationsgefäß des Manometers enthielt Bakteriensuspension ohne Substratzugabe.

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm			
	—	Toluol	Thymol	Toluol und Thymol
10	36,7	21,0	3,3	1,4
20	73,1	40,5	6,5	1,8
30	109,2	61,5	9,7	4,7
40	145,9	68,0	12,7	6,5
50	178,9	90,5	15,2	7,2
60	215,3	99,5	17,2	7,6
Verhältnis	100	46,2	8,0	3,5

4. Einfluss auf Bakterienwachstum.

In Fortsetzung der in den vorhergehenden Paragraphen beschriebenen Untersuchungen, welche lehrten, dass die Phenolverbindungen auf Bakterienatmung spezifische Einflüsse ausübten, habe ich ihre Wirkung auf Bakterienwachstum geprüft. Die Versuche wurden durch Zählung der Keimzahlen mittels des Plattenverfahrens in folgender Weise ausgeführt.

1) S. USAMI: Acta Phytochim., 12 (1941), 9.

Die Bakterien wurden in Epröuvetten, welche Pepton-Bouillon mit einer Zugabe von p-Nitrophenol oder α -Naphthol enthielten, bei 25° kultiviert. Die Probe wurde von Zeit zu Zeit mittels sterilisierter Pipette entnommen und mit sterilem Wasser in geeigneten bestimmten Verhältnissen verdünnt. Ein Teil dieser verdünnten Bakterien-suspension wurde dann in vorher aufgeschmolzenen und abgekühlten Pepton-Bouillon-Agar-Nährboden pipettiert, und schliesslich wurde der Agarnährboden, welcher Bakterien enthielt, in sterilisierte Petri-Schale gegossen. Die Schale wurde, nach Erstarrung des Nährbodens, im Thermostat von 37° 24 Stunden lang incubiert. Die auf dem Agarboden erwachsenden Kolonien wurden auf Zählplatte ausgezählt und daraus wurde die in der ursprünglichen Flüssigkeit enthaltene gesamte Keimzahl berechnet. Kontrollversuch ohne Gift-zusatz wurde zugleich parallel ausgeführt. Die Keimzahlen in der Tabelle führen die Mittelwerte aus den gleichzeitig durchgeführten vielen Zählungen an.

Ein Beispiel aus den Versuchsergebnissen ist in Tabelle XXXVII dargestellt. In Anwesenheit des 0,02% (=m/720) α -Naphthols wurde nach 24 Stunden schon kein Keim mittels des Plattenverfahrens gefunden. Alle Bakterien sind wahrscheinlich durch Einwirkung des α -Naphthols gestorben. Hingegen wirkte p-Nitrophenol

TABELLE XXXVII.

Beeinflussung des Bakterienwachstums durch
p-Nitrophenol und α -Naphthol.

Bacillus coli Pepton-Bouillon 25°

Tage	Bakterienzahl in 1 ccm		
	Ohne Gift	Mit 0,02% p-Nitrophenol	Mit 0,02% α -Naphthol
0	5,600,000	5,600,000	5,600,000
1	158,000,000	27,100,000	0
3	320,000,000	28,600,000	0
7	480,000,000	105,000,000	0
10	482,000,000	453,000,000	0
15	298,000,000	309,000,000	0

in 0,02% (=m/695) Konzentration auf Bakterienvermehrung nicht vollständig schädigend. Hierbei wurde nur die Anfangsgeschwindigkeit der Vermehrung durch p-Nitrophenol deutlich gehemmt. Die Bakterienzahl in 1 ccm der Nährflüssigkeit betrug nach einem Tag nur das 5-fache der Anfangszahl, während in Kontrollflüssigkeit die Bakterien aufs 30-fache sich vermehrten. p-Nitrophenol wirkt auf Bakterienwachstum nur anfänglich verlangsamernd, nachher wachsen die Bakterien wieder lebhaft. Wie in der Tabelle angegeben, erreicht die Keimzahl schon nach 10 Tagen der Kultur die normale Höhe. Dabei kann man keinen Unterschied zwischen den Keimzahlen in Flüssigkeiten mit und ohne Zugabe des p-Nitrophenols bemerken.

Schon im früheren Kapitel hat man gesehen (vgl. Tab. III auf S. 9 und Tab. XXIII auf S. 34), dass p-Nitrophenol auf die Oxydationen von Bernsteinsäure, Fumarsäure usw. stärker hemmend wirkt als α -Naphthol in derselben Konzentration. Die Ergebnisse dieser Wachstumsversuche also lehren, dass es keine direkte Parallelität gibt zwischen den Wirkungen dieser Giftsubstanzen auf die Atmung von Bernsteinsäure usw. und auf die andere Lebenstätigkeit der Bakterien wie das Wachstum.

Diese Meinung wurde ferner durch folgende Versuche gestützt, welche die Prüfung der Nitrophenolwirkung auf Lebensdauer der

TABELLE XXXVIII.

Einfluss des p-Nitrophenols auf Lebensdauer
der Bakterien.

Bacillus coli in 0,9 % NaCl-Lösung. Aufbewahrung bei 5°.

Tage	Bakterienzahl in 1 ccm	
	Ohne p-Nitrophenol	Mit m/300 p-Nitrophenol
0	9,510,000	6,510,000
1	8,000,000*	6,500,000
3	5,700,000	5,450,000
7	6,150,000	4,460,000
15	4,560,000	1,130,000
30	1,800,000	0

Bakterien bezweckten. Die Bakterien wurden in 0,9% NaCl-Lösung mit und ohne Zugabe des p-Nitrophenols suspendiert und im Eischrank (mittlere Temperatur etwa 5°) bewahrt. Die Zahl der lebendigen Bakterien wurde durch die oben erwähnte Methode bestimmt. Wie in Tabelle XXXVIII ersichtlich, geschah die Verminderung der Bakterienzahl in der mit m/300 p-Nitrophenol versehenen NaCl-Lösung, im Vergleich mit der des Kontrollversuchs ohne p-Nitrophenolzugabe, drei Tagen lang in beinahe gleicher Geschwindigkeit. Der Verminderungsgrad war sehr gering und daraus kann man schliessen, dass das Leben der Bakterien wenigstens drei Tagen lang in Anwesenheit des genannten Atmungsgiftes fast unverändert dauerte. Nach dieser Zeit aber verminderte sich die Bakterienzahl des Nitrophenolansatzes schneller und nach 30 Tagen konnte man schon keine Bakterien mehr im Medium finden, dagegen im Kontrollansatz waren noch lebendige Bakterien in reichlicher Zahl vorhanden.

SCHLÜSSBETRACHTUNGEN.

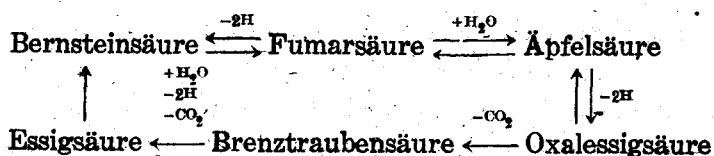
Unter den Substanzen, welche auf die Zellatmung hemmende Wirkung ausüben, sind zwei Klassen zu unterscheiden, solche, deren Wirkungen reversibel sind, und solche, deren Wirkungen irreversibel sind. Als Stoffe, welche die Atmung irreversibel vernichten, kommen beispielweise solche in Betracht, welche die Zerstörungen der an Atmungsvorgängen beteiligten Enzyme und Enzymsysteme und folglich die Aufhebung ihrer katalytischen Wirksamkeit, eine irreversible Bindung mit diesen Enzymen, eine physikalische Zustandsänderung des Protoplasmakolloids usw. verursachen. Zu diesen Hemmkörpern gehören z.B. die oberflächenaktiven Substanzen wie Toluol, welches, wie in der früheren Mitteilung gezeigt wurde, auf die Atmung der Bakterien eine irreversible Hemmung ausübt.

Die hemmende Wirkung der zur zweiten Gruppe gehörenden Stoffe beruht z.B. auf ihren reversiblen chemischen Reaktionen mit Atmungsenzymen. Im allgemeinen scheinen die in den vorangehen-

den Versuchen verwendeten Substanzen, ausgenommen Thymol, der zweiten Gruppe des Hemmkörpers anzugehören. Schon im zweiten Kapitel der vorliegenden Mitteilung konnten wir eine schöne Reversibilität der Wirkungen von p-Nitrophenol bzw. α -Naphthol beobachten.

Die Wirkungen der in vorliegender Arbeit versuchten Phenolverbindungen waren je nach den zugefügten Atmungssubstratarten ganz verschieden. Zunächst werden auf Grund der hier erhaltenen Versuchsergebnisse einige Discussionen über den oxydativen Abbaustoffwechsel von verschiedenen Atmungssubstraten in Bakterienzellen angestellt.

Aus den im ersten Kapitel angegebenen Versuchen geht hervor, dass die Oxydationen von drei C_4 -Dicarbonsäuren, nämlich Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure, unter den geprüften verschiedenen Substratarten durch betreffende Giftsubstanzen stets ausserordentlich stark gehemmt werden. Eine Übersicht über die vorhergehend erwähnten Resultate zeigt, dass diese Tatsache für fast alle versuchten Phenolverbindungen, nämlich p-, m-Nitrophenol, α -, β -, γ -Dinitrophenol, Trinitrophenol, Dinitronaphtholsulfonsäure, Thymol und α -Naphthol, und ausserdem für alle geprüften Bakterienarten allgemein gültig ist. Die Abbauvorgänge dieser C_4 -Dicarbonsäuren in der Zelle sind bekanntlich von THUNBERG folgendermassen schematisiert worden:



Bernsteinsäure wandert durch stufenweise Dehydrierungen und Decarboxylierungen über Fumarsäure, Äpfelsäure, Oxalessigsäure und Brenztraubensäure um. Zwei Moleküle der gebildeten Essigsäure zusammen werden dann zu Bernsteinsäure dehydriert. Dadurch wird die Anfangsstufe erreicht und der Abbauzyklus kann von neuem ablaufen. Jede dieser Teilreaktionen ist von verschiedenen

Autoren¹⁾ an verschiedenen Bakterienarten festgestellt oder wenigstens wahrscheinlich gemacht worden. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass alle Reaktionsglieder der oberen Zeile im obengenannten Schema ausnahmslos durch p-Nitrophenol und die in vorliegenden Versuchen verwendeten anderen Phenolverbindungen beinahe vollständig vernichtet werden. Ferner ist durch meine Versuche festgestellt, dass die Reaktionen der unteren Zeile des Schemas an *Proteus vulgaris*, abgesehen vom Umsatz der Oxalessigsäure, welche nicht versucht wurde, durch p-Nitrophenol beträchtlich gehemmt werden. Also ist es entscheidend, dass das Schema, insofern man es für bakterielle Oxydationen als gültig annimmt, bei allen Reaktionsgliedern, abgesehen von der Teilreaktion der Oxalessigsäure, durch p-Nitrophenol usw. eine vollkommene Hemmung erfährt.

Ausserdem sind die Hemmungsgrade von allen Teilreaktionen in ganz gleicher Grössenordnung. So z.B. betragen die Hemmungen der Oxydationen von Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure an *Proteus vulgaris* bei pH 7,2 durch m/1000 Thymol je 91,9%, 93,2% bzw. 93,2%. Von anderen Giftsubstanzen, d.h. p-Nitrophenol, m-Nitrophenol, α -Dinitrophenol und α -Naphthol, waren auch die Hemmungsgrade dieser drei C₄-Dicarbonsäuren ausnahmslos über 90%. Die Tatsache, dass die Hemmungsgrade an allen Teilreaktionen in gleichen Grössenordnungen sind, spricht indirekt dafür, dass die Abbauvorgänge betreffender C₄-Dicarbonsäuren wenigstens an geprüften Bakterien nach dem obengenannten Schema stattfinden.

Ferner darf in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht ausser Betracht gelassen werden, dass diese C₄-Dicarbonsäuren nach der Atmungstheorie von SZENT-GYÖGYI²⁾ an tierischen Gewebezellen als

1) J. H. QUASTEL: Biochem. Journ., 18 (1924), 365; J. H. QUASTEL und A. H. M. WHATLEY: Ebenda, 25 (1919), 117; E. F. GALE und M. STEPHENSON: Ebenda, 33 (1939), 1245; K. TANAKA: Journ. Science Hiroshima Univ., B., Div., 2., 3 (1938), 121; H. WIELAND, O. PROBST, H. WALCH, W. SCHWARZE und K. RAUCH: LIEBIGS Ann. Chem., 542 (1939), 145; F. LIPMANN: Enzymol., 4 (1937), 65; E. S. G. BARRON und C. M. LYMAN: Journ. Biol. Chem., 127 (1939), 143; E. S. G. BARRON und T. E. FRIEDEMANN: Ebenda, 137 (1941), 593; H. A. KREBS: Biochem. Journ., 31 (1937), 661.

2) A. V. SZENT-GYÖGYI: Studies on biological-oxidation and some of its catalysts. Budapest, 1939.

Katalysatoren der Wasserstoffübertragung fungieren und dabei eine wichtige Rolle spielen. Nach der Ansicht von SZENT-GYÖRGYI und seinen Mitarbeitern muss der Wasserstoff, welcher durch Dehydrase aus Substratmolekül entbunden wird, über zwei C_4 -Dicarbonsäuresysteme, nämlich Bernsteinsäure-Fumarsäure-System und Äpfelsäure-Oxallessigsäure-System, auf das WARBURG-KEILIN-System übertragen werden. Diese Theorie ist aus den Untersuchungen der Atmung von Taubenbrustmuskelbrei hervorgegangen. Die Frage, ob diese Ansicht auch für Atmung von Mikroorganismen gilt, ist von einigen Autoren geprüft worden und doch haben sie nur negative Resultate gefunden. Vor kurzem hat YAMAGUCHI¹⁾ sich auch in seinen systematischen Untersuchungen über die Verwertbarkeit der verschiedenartigen Atmungssubstrate von verschiedenen Bakterien und Hefen mit dieser Frage beschäftigt. Er konnte an *Bacillus coli* weder spezifische Atmungshemmung durch Malonsäure noch ausserordentliche Atmungssteigerung durch Fumarsäure erkennen. Diese sind von SZENT-GYÖRGYI und seinen Mitarbeitern als Merkmalreaktionen betreffs der Beteiligung von C_4 -Dicarbonsäuresysteme an Zellatmung angenommen worden.

Im Einklang mit der Meinung von YAMAGUCHI u.a. wurde aus meinen eigenen Versuchen über Nitrophenolhemmungen gar kein Anhaltspunkt für die SZENT-GYÖRGYISCHE Theorie gewonnen. Wenn man nach SZENT-GYÖRGYI die unentbehrlichen katalytischen Wirkungen der C_4 -Dicarbonsäuresysteme in den Vorgängen der Zellatmung annimmt, so müssten die Veratmungen aller Substratarten geschädigt werden, falls man die Oxydationen dieser C_4 -Dicarbonsäuren durch eine dieser Giftsubstanzen gänzlich vernichtet. Hingegen sind diese Giftstoffe in der Tat gegenüber den Atmungen von Glucose und Milchsäure völlig ohne hemmende Wirkung. Glucose ist ein übliches Atmungssubstrat und gehört zu der atmungsphysiologisch wichtigsten Stoffgruppe, obzwar ihre Verwertbarkeit bei *Proteus vulgaris* nicht so gross wie Bernsteinsäure ist. Milchsäure gehört zu den durch genannte Bakterien am besten verwendbaren Atmungssubstra-

1) S. YAMAGUCHI: Acta Phytochim., 12 (1941), 115.

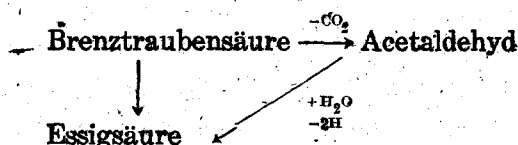
ten. Die Veratmung von oben genannten Substraten lässt sich nicht hemmen z.B. durch p-Nitrophenol in m/1000 Konzentration, welche für die vollkommene Hemmung der Oxydationen von C₄-Dicarbonsäuren genügend ist, aber eher dadurch sehr beschleunigen. Auf diese Tatsache gestützt, scheint das C₄-Dicarbonsäuresystem von SZENT-GYÖRGYI bei der Bakterienatmung im Gegensatz zum Fall von tierischen Gewebezellen keine wesentliche Rolle zu spielen.

Überdies geht es aus der Tatsache, dass die Veratmungen von Glucose und Milchsäure gegen Nitrophenole usw. gemeinsam resistent sind, aller Wahrscheinlichkeit nach hervor, dass die Oxydationsvorgänge beider Substrate miteinander in kurzem Zusammenhang stehen. Aus meinen eigenen Versuchen ist es klar geworden, dass die bakterielle Glucoseoxydation wenigstens von den Oxydationen der C₄-Dicarbonsäuren vollständig unabhängig ist. Glucoseoxydation muss nicht über das THUNBERG'schen Schema vor sich gehen. Indessen ist dabei eine Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass Glucose in ihren Abbauvorgängen in Oxalessigsäure umgewandelt wird. Da Brenztraubensäureoxydation durch Nitrophenol gänzlich vernichtet wird, muss gebildete Oxalessigsäure dann auf eine vom THUNBERG'schen Schema ganz abweichende Weise verarbeitet werden. Oder wenn man annimmt, dass das THUNBERG'sche Schema für bakterielle Oxydation gilt, so muss Oxalessigsäureoxydation auf der Stufe der Brenztraubensäure durch Nitrophenole unterbrochen werden, und infolgedessen muss Brenztraubensäure sich in den Bakterienzellen anhäufen.

Dasselbe gilt auch für Milchsäureoxydation. Was die Oxydation von Milchsäure anbetrifft, so ist es bekanntlich allgemein angenommen worden, dass sie durch unmittelbare Dehydrierung sich in Brenztraubensäure umwandelt. Aber in früherer Mitteilung habe ich bei den Versuchen über die selektive Toluolhemmung gefunden, dass die Oxydation der Brenztraubensäure im Gegensatz zu Milchsäureoxydation durch Toluol ungefähr vollständig vernichtet wird. Gestützt auf diese Tatsache, habe ich dabei bezweifelt, ob die bakterielle Oxydation der Milchsäure über Brenztraubensäure vor sich

gehen könne oder nicht. In Übereinstimmung mit dem Befunde von Toluolhemmung ist Milchsäureoxydation der Bakterien gegenüber den in vorliegender Mitteilung verwendeten Phenolverbindungen auch fast gänzlich unempfindlich, während die Brenztraubensäureoxydation dadurch eine mässige Hemmung erfährt. Falls man annimmt, dass Milchsäure durch Bakterien über Brenztraubensäure oxydiert werde, so müsste in den Bakterienzellen durch Einwirkung betreffender Giftsubstanzen eine Anhäufung von Brenztraubensäure stattfinden, wie es bei Glucoseoxydation der Fall ist.

Betreffs des Abbauvorgangs der Brenztraubensäure kann man ausser dem THUNBERGSchen Schema noch an einen Weg denken, welcher bei Hefe angenommen worden ist und aus zwei Reaktionsgliedern besteht, d.h. Decarboxylierung der Brenztraubensäure in Acetaldehyd und darauffolgende Oxydation des Acetaldehyds in Essigsäure.



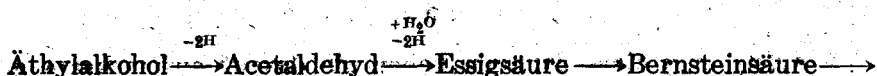
Aber in der bereits erwähnten Mitteilung hat YAMAGUTCHI auf Grund der geringeren Verwertbarkeit des Acetaldehyds durch Bakterien im Vergleich mit derjenigen von Brenztraubensäure die Ansicht geäussert, dass beim bakteriellen Brenztraubensäureabbau die oben beschriebene bei Hefe angenommene Reaktion nur eine beschränkte Bedeutung habe. In meinen Versuchen wurde auch Acetaldehydoxydation durch p-Nitrophenol gehemmt. Die Hemmung ist aber schwächer als bei Brenztraubensäureoxydation. Also bin ich geneigt, im Einklang mit der Ansicht von YAMAGUTCHI, anzunehmen, dass die Brenztraubensäure durch Bakterien nicht auf diesem Weg abgebaut werde.

Was die Abbauvorgänge der Citronensäure anbetrifft, so bleibt der Tatbestand heutzutage noch unklar. Nach einigen Autoren ist angenommen worden, dass Citronensäure mit Hilfe der Citronen-

säuredehydrase über cis-Aconitsäure und iso-Citronensäure in α -Ketoglutarensäure decarboxylatisch oxydiert wird. Dagegen behaupten andere Forscher einen Abbauweg in Oxalessigsäure und Essigsäure. Immerhin ist allgemein anerkannt worden, dass diese C_6 -Tricarbonsäure im Hauptweg der Zellatmung von Mikroorganismen keine bedeutende Rolle spielt. Indessen muss man daran erinnern, dass sie nach KREBSScher Citratcyklustheorie¹⁾ in Atmungsvorgängen der tierischen Gewebe eine hervorragende Bedeutung hat.

Citronensäureatmung ist empfindlich gegen Einwirkung betreffender Phenolverbindungen. p-Nitrophenol, α -Dinitrophenol, Thymol und α -Naphthol hemmen die Atmung bei Zugabe von Citronensäure in hohem Grad wie beim Fall der C_4 -Dicarbonsäuren. Es ist eine merkwürdige Tatsache, dass die im SZENT-GYÖRGYischen und im KREBSSchen Schema als wichtige Glieder betrachteten organischen Säuren bei ihren Oxydationsvorgängen durch Nitrophenole, Thymol und Naphthol ausnahmslos am stärksten gehemmt werden.

Die Veratmungen von Äthylalkohol, Acetaldehyd und Essigsäure erleiden durch p-Nitrophenol auch starke Hemmung. Was die Oxydationsvorgänge des Äthylalkohols anbelangt, so ist seit langem folgendermassen angenommen worden:



Die durch Dehydrierung des Äthylalkohols über Acetaldehyd gebildete Essigsäure wandelt sich ferner nach dem bereits erwähnten THUNBERG'schen Schema über Bernsteinsäure um. Das Schema ist von WIELAND auf Grund der Untersuchungen an Hefeatmung angegeben worden. Alle Reaktionsglieder dieses Schemas werden durch p-Nitrophenol beinahe vollständig gehemmt, und ausserdem in fast gleichen Grössenordnungen. Durch Einwirkung des p-Nitrophenols wird also die Bakterienatmung in dieser Richtung bei allen Teilreaktionen vollständig unterbrochen. Dass die Hemmungsgrade aller Reaktionsglieder im obengenannten Schema von nahezu gleichen

¹⁾ H. A. KREBS und W. A. JOHNSON: *Enzymologia*, 4 (1937), 148.

Größenordnungen sind, deutet darauf hin, dass das Schema auch für bakterielle Äthylalkoholoxydation gültig sei.

Die Ameisensäureatmung der Bakterien ist am beständigsten, ebenso wie die Atmung von Glucose und Milchsäure, gegen alle geprüften Giftsubstanzen. Diese Atmung erlitt auch durch Toluol nur geringe Hemmung. Es ist aber eine wohl bekannte Tatsache, dass Ameisensäuredehydrase von Bakterien sowie von anderen Organismen ein gegen verschiedene äussere Einflüsse recht widerstandsfähiges Enzym ist. Über den Abbauvorgang der Ameisensäure ist nur wenig zu sagen; sie wird durch Bakterien beinahe vollständig bis zu Kohlensäure oxydiert.

Die Alaninoxydation der Bakterien wird durch alle Giftstoffe, welche in den vorliegenden Versuchen geprüft wurden, ausnahmslos in hohem Grade geschädigt. WARBURG¹⁾ hat gefunden, dass das Coferment der d-Aminosäureoxydase eine mit der prosthetischen Gruppe des gelben Ferments identische Flavin-Adenin-Dinucleotid-Verbindung ist. Vermutlich wirkt p-Nitrophenol u.a. auf dieses Enzym hemmend ein. Bemerkenswerte Untersuchung in dieser Richtung verdanken wir KRAHL²⁾ und seinen Mitarbeitern. Sie haben sich mit den Wirkungen von nitro- und halosubstituierten Phenolverbindungen auf biologische Oxydationen beschäftigt und auf Grund der Untersuchungen haben sie darauf aufmerksam gemacht, dass diese Phenolverbindungen auf Flavoproteinkatalyse eine spezifische Hemmungswirkung ausüben. Von diesen Autoren wurden als substituierte Phenolverbindung folgende Substanzen verwendet; 4,6-Dinitro-o-kresol, 2,4-Dinitro-o-cyclohexylphenol, 2,4,5-Trichlorophenol und o-Nitrophenol. Alle diese Substanzen, mit Ausnahme der letzt genannten Verbindung, hemmten die zwei typischen Flavoproteinkatalysesysteme, nämlich d-Aminosäureoxydase von WARBURG und Herzmuskelflavoprotein von STRAUB, indessen war Xanthinoxydase unempfindlich. So z.B. wurde d-Aminosäureoxydase bei Zugabe von

1) Siehe hierzu z. B. O. WARBURG und W. Christian: *Biochem. Zeitschr.*, **298** (1938), 150.

2) M. E. KRAHL, A. K. KELTSCH und G. H. W. CLOWES: *Journ. Biol. Chem.*, **136** (1940), 563.

m/10 dl-Alanin durch 2,4,5-Trichlorophenol in m/100 Konzentration um 60% geschädigt. Es ist aber noch nicht möglich, nur aus den Angaben von KRAHL zu allgemeingültigen entscheidenden Schlussfolgerungen beträchtlich der Einwirkung derartiger Körper auf Flavoproteinkatalyse zu gelangen. Jedoch in Übereinstimmung mit ihren Befunden würde auch in meinen eigenen Versuchen die bakterielle Alaninoxidation durch verschiedene Phenolverbindungen, besonders durch p-Nitrophenol, Thymol und α -Naphthol in hohem Grade gehemmt. Und auch waren die Grade der Hemmung durch obengenannte Substanzen in niedrigeren Konzentrationen beträchtlich höher als die des Trichlorophenols in KRAHL'schen Angaben. Aus diesen Versuchen liegt es nahe anzunehmen, dass d-Aminosäureoxydase gegen eine Reihe von Phenolverbindungen sehr empfindlich sei. Diese Ansicht ist ferner dadurch gestützt, dass nach GREEN und BLACK¹⁾ Riboflavin, ein wichtiger Bestandteil des Flavoproteins, gegen Phenol und einige Phenolderivate eine höhere Löslichkeit und Affinität besitzt.

Im Folgenden werden an dieser Stelle einige Vermutungen bezüglich des Angriffspunktes der in vorliegender Arbeit behandelten Giftsubstanzen auf bakterielles Atmungssystem besprochen. Da der Vorgang der Zellatmung auf Grund neuerer Anschauungen aus sehr komplizierten Reaktionsketten zusammengesetzt ist, an welchen verschiedene Enzyme und ihre Hilfsstoffe sich beteiligen, kann die Frage, auf welches Glied der Katalysatorsysteme von Zellatmung diese Giftstoffe ihre hemmenden Wirkungen ausüben, nicht leicht beantwortet werden. Um diese Frage entscheidend zu lösen, muss man alle an Atmungsvorgängen beteiligten Enzyme aus den Zellen extrahieren und die Hemmbarkeit jedes Giftstoffes auf die mit den extrahierten Enzymen rekonstruierten Teilreaktionen der Zellatmung prüfen. Wegen der methodischen Schwierigkeiten sind heutzutage die Reindarstellungen aller Atmungsenzyme aus Bakterienzellen noch nicht gelungen. Betreffs des Angriffspunktes betreffender Giftstoffe auf die Atmung muss man sich also mit einigen Vermutungen auf

1) R.-D. GREEN und A. BLACK: Journ. Amer. Chem. Soc., 59 (1937), 1820.

Grund der Versuche *in vivo* begnügen. Vom Standpunkt der heute allgemein angenommenen weitgehenden Spezifität der Dehydrase aus wird die schon mehrmals besprochene ungleichmässige Hemmbarkeit der Giftstoffe je nach der Verschiedenheit der zugefügten Atmungs-substratarten ohne weiteres dadurch erklärt, dass diese Gifte auf bestimmte Dehydrasesysteme spezifisch hemmend einwirken. Es ist zur Zeit von verschiedenen Forschern nachgewiesen worden, dass Dehydrasesysteme aus folgenden Komponenten zusammengesetzt werden, nämlich Apodehydrase (Proteinträger), Codehydrase (Prosthetische Gruppe des Enzyms), Diaphorase (Flavoprotein, Zwischenwasserstoffüberstfäger) usw. Die Frage, auf welche Komponente des Dehydrasesystems die genannten Phenolverbindungen einwirken, ist heute noch offen. Die oben erwähnte Meinung von KRAHL¹⁾, dass nitro- und chlorosubstituierte Phenolverbindungen nur auf den Flavoproteinkatalysenteil in Atmungsvorgängen hemmend wirken würden, ist nicht immer gerechtfertigt, weil, obwohl die Alaninoxydation durch diese Substanzen stark geschädigt wird, die Bernsteinsäureoxydation, welche durch Succinodehydrase katalysiert wird und zur Aktivierung die Mitwirkung des Flavoproteins nicht immer zu benötigen scheint, durch dieselben Phenolverbindungen in demselben Grad unwirksam gemacht wird. Es ist indessen eine beachtenswerte Tatsache, dass die Dehydrierungen von Milchsäure und Ameisensäure unter den gegen Phenolverbindungen beständigen Oxydationen in ihren Wirkungen keiner Cofermente bedürfen. Gegen Einwirkungen der oberflächenaktiven Substanzen wie Toluol war neben den erwähnten zwei Dehydrierungen auch die Bernsteinsäureoxydation resistent. Im Gegensatz dazu war die Glucoseoxydation durch Toluol vollständig geschädigt. In dieser Hinsicht scheinen die Phenolverbindungen in ihren Wirkungsmechanismen sich von Toluol wesentlich zu unterscheiden.

Die Vergiftungen der bakteriellen Oxydationen durch betreffende Giftsubstanzen haben ihre Ursache wahrscheinlich darin, dass die Gifte mit einer oder einigen Komponenten des Atmungskatalysators

1) M. E. KRAHL, A. K. KELCH und G. H. A. CLOWES: loc. cit.

reversibel sich verbinden und infolgedessen sie in inaktiven Zustand bringen, oder dass die Reaktionen zwischen diesen Komponenten durch die Gifte geschädigt werden, wie z.B. durch Konkurrierung der Gifte mit einer dieser Komponente. Es ist doch noch nicht möglich, zu irgendwelchen allgemeinen Schlussfolgerungen bezüglich des Mechanismus der Einwirkung derartiger Giftsubstanzen auf Zellatmung zu gelangen.

Bezüglich der chemisch-konstruktiven Eigenschaften der wirksamen Phenolverbindungen wird aus der Übersicht über die im ersteren Kapitel mitgeteilten Versuche der Schluss gezogen, dass NO_2 -Gruppe in der Molekül für das Auftreten der Wirkung zwar nicht immer unentbehrlich ist, doch alle geprüften NO_2 -substituierten Verbindungen ausnahmslos einwirken. Insbesondere wirken die Verbindungen stärker, welche in ihren para-Stellungen mit NO_2 -Gruppe substituiert sind. So wirken p-Nitrophenol, 1,2,4-Dinitrophenol und 1,2,5-Dinitrophenol stärker hemmend als m-Nitrophenol und 1,2,6-Dinitrophenol. Eine Ausnahme ist Pikrinsäure, welche NO_2 -Gruppe in para-Stellung besitzt doch nur in äusserst geringem Masse hemmend wirkt. Ausser Nitrophenolverbindungen wirkt Phenol schwächer ein, dagegen wirkt α -Naphthol in gleicher Grössenordnung wie Nitrophenol. Dinitronaphthol ist einflusslos.

Die Wirkung dieser Phenolverbindungen gegen Bakterienatmung scheint mit ihrer bakteriziden bzw. antiseptischen Wirkung in keiner direkten Beziehung zu stehen. Wie aus dem Versuchsteil dieser Mitteilung hervorgeht, ist das Phenol, welches in der Bakteriologie schon seit langem als Sterilisationsmittel im allgemeinen verwendet worden ist, nicht immer ein starkes Atmungsgift. Seine bakterizide Wirkung beruht also wahrscheinlich auf anderem Mechanismus. Im Gegensatz dazu gehört p-Nitrophenol, welches auf Zellatmung eine spezifische Hemmungswirkung ausübt, nicht zu den starken Desinfizientien. Unter den gesuchten Phenolkörpern besitzt nur α -Naphthol beide Eigenschaften, nämlich eine starke atmungshemmende Wirkung und eine hervorragende antiseptische Wirkung.

Zum Schluss ist von der beschleunigenden Wirkung der Nitrophenolverbindungen gegenüber bakterieller Glucoseoxydation die Rede. Es ist seit langem bekannt, dass α -Dinitrophenol die Möglichkeit besitzt, tierischen und menschlichen Stoffwechsel übernormal zu stimulieren. Dieser stoffwechselstimulierende Effekt hat seinen Grund in der Beförderung des Kohlenhydrat- insbesondere Glucoseumsatzes. Das Dinitrophenol bedingt in tierischen Gewebezellen eine übernormale Ausnutzung der Glucoseoxydation. Das Ergebnis kommt im erhöhten Sauerstoffbedarf zum Ausdruck. In der Pharmakologie wurde α -Dinitrophenol früher als ein Abmagerungsmittel verwendet. Der Beschleunigungsmechanismus der Glucoseatmung selbst bleibt aber gegenwärtig noch unerklärt. Die schon erwähnte Ansicht von CLIFTON und LOGAN¹⁾, dass Dinitrophenol auf die mit der Atmung untrennbar verknüpfte Assimilation, einen hemmenden Einfluss ausübe und folglich eine anscheinend erhöhte Sauerstoffaufnahme hervorrufe, ist ohne Zweifel eine Erklärung dieses Mechanismus. In der Tat lässt sich keine Abweichung von dieser Ansicht in meinen Versuchsergebnissen finden. Doch ist heute noch keine endgültige Lösung der betreffenden Frage zu geben. Dafür werden weitere eingehende Versuche benötigt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Unter Anwendung der intakten Zellen von *Proteus vulgaris* und einigen anderen Bakterienarten wurden die Beeinflussungen der bakteriellen Oxydationen verschiedener Atmungssubstrate durch Nitrophenole, Dinitrophenole, Trinitrophenol, Phenol, Naphthol, Thymol und einige verwandte Verbindungen untersucht.

2. Die Oxydationen verschiedener Substrate durch die Bakterien sind gegen betreffende Phenolverbindungen verschieden empfindlich.

3. Die Oxydationen von Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Citronensäure werden unter den versuchten Oxydationen

1) C. E. CLIFTON und W. A. LOGAN: Journ. Bact., 37 (1939), 523.

durch die Phenolverbindungen in niedrigeren Konzentrationen am stärksten gehemmt.

4. Alaninoxydation wird auch durch die Phenolverbindungen besonders stark unterdrückt.

5. Die Oxydationen von Äthylalkohl, Essigsäure, Glycerin und Glycerinphosphorsäure werden beträchtlich herabgesetzt.

6. Ameisensäureoxydation ist vollständig unempfindlich gegen Einwirkungen genannter Phenolverbindungen.

7. Milchsäureoxydation ist resistent, dagegen wird Brenztraubensäureoxydation gehemmt.

8. Glucoseveratmung bei den Bakterien wird im Gegensatz zu Veratmungen anderer Substratarten durch Nitrophenole usw. deutlich beschleunigt.

9. p-Nitrophenol wirkt stark, dagegen wirkt m-Nitrophenol schwach. Unter den geprüften drei Isomeren des Dinitrophenols wirkt β -Isomer am schwächsten. Die Wirkung des Trinitrophenols ist äusserst geringfügig. Dinitronaphthol übt praktisch keine Hemmung auf die Bakterienatmung aus.

10. Phenol wirkt nur in einer 10 fachen Konzentration als Nitrophenol etwas hemmend. Salicylsäure hemmt die Bakterienatmung auch nur in höherer Konzentration. Benzoessäure ist ohne Einfluss.

11. Thymol und α -Naphthol rufen auf Bakterienatmung ebenso starke Hemmung wie Nitrophenol hervor.

12. Die Hemmungen durch Nitrophenole sind bemerkenswerter in saurer Reaktion als in alkalischer. Die Beschleunigung der Glucoseoxydation ist stärker in alkalischer Reaktion.

13. Die Hemmung der Bernsteinsäureoxydation durch p-Nitrophenol bzw. α -Naphthol und die Beschleunigung der Glucoseoxydation durch genannte Substanzen sind vollkommen reversibel. Ihre Wirkungen können durch Auswaschen der vergifteten Bakterien mit Wasser vollständig beseitigt werden. Hingegen ist die Wirkung des Thymols nur teilweise reversibel.

14. Glucoseoxydation erfährt durch Einwirkung des p-Nitro-

phenols sowohl auf ihre Geschwindigkeit als auch auf ihre Oxydationsnatur eine Veränderung. Indessen erleidet RQ der Glucoseoxydation durch p-Nitrophenol praktisch keinen Einfluss.

15. Kaliumcyanid hemmt die vorher durch p-Nitrophenol beschleunigte Glucoseoxydation. p-Nitrophenol beschleunigt die vorher durch Kaliumcyanid gehemmte Glucoseoxydation.

16. Thymol wirkt ferner hemmend auf die vorher durch Toluol herabgesetzte Bernsteinsäureoxydation.

17. Diese Phenolverbindungen wirken nur schwach hemmend auf Bakterienwachstum.

18. Auf Grund der erhaltenen Versuchsergebnisse wurden einige Auffassungen diskutiert betreffs der Oxydationsvorgänge verschiedener Atmungssubstrate und ferner hinsichtlich der Wirkungsnatur betreffender Phenolverbindungen.

Die Untersuchungen wurden im Pflanzenphysiologischen Laboratorium der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Hokkaido Universität angestellt. Herrn Prof. emer. Dr. K. SHIBATA an der Universität zu Tokyo sowie Prof. Dr. T. SAKAMURA vom hiesigen Laboratorium bin ich für ihre stetigen Unterstützungen zum grossen Dank verpflichtet.

VERSUCHSPROTOKOLLE.

Nr. 1

Proteus vulgaris Glucose: m/1000 p-Nitrophenol: m/1000

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm					
	Ohne Substrat		Glucose			
	pH 7,2		pH 7,2		pH 7,6	
	—	p-Nitrophenol	—	p-Nitrophenol	—	p-Nitrophenol
10	1,0	1,5	16,3	13,4	24,4	23,1
20	2,0	2,3	34,7	30,6	45,8	53,2
30	3,4	3,5	55,8	50,0	67,9	89,2
40	4,4	4,3	75,4	70,4	90,0	125,5
50	5,4	5,8	96,5	92,0	111,4	162,6
60	6,4	7,0	117,0	115,2	133,5	200,0
70	7,1	8,2	138,4	137,1	154,9	240,0
80	7,1	9,0	158,3	160,0	175,9	266,1
90	7,8	9,4	175,5	182,3	196,9	276,7
100	9,2	9,8	185,5	203,3	208,7	281,5
110	10,2	10,2	193,7	221,7	215,7	285,9
120	11,2	11,0	193,2	232,8	219,8	288,5
140	11,9	13,7	205,1	239,8	226,8	292,5
160	13,6	16,0	208,7	242,0	230,9	296,2
180	15,3	16,8	211,4	245,8	232,4	298,8
200	16,0	17,6	213,2	247,1	235,7	300,3
220	18,1	18,4	216,5	249,6	237,5	302,9
240	20,2	20,3	217,7	251,8	238,2	305,1

Nr. 2

Proteus vulgaris

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm				
	Ohne Substrat		m/1000 Glucose		
	—	m/1000 p-Nitrophenol	—	m/5000 p-Nitrophenol	m/1000 p-Nitrophenol
10	1,3	2,7	8,9	11,9	8,1
20	3,0	5,4	18,4	23,4	22,1
30	4,0	6,5	28,5	35,6	36,1
40	4,3	7,6	39,9	49,3	51,6
50	4,6	8,0	50,6	61,2	68,3
60	4,6	9,8	61,0	74,9	85,0
80	7,6	12,0	82,8	101,9	120,6
100			102,7	127,8	156,7
120	11,2	14,1	125,2	154,1	194,7
130			135,0	166,7	212,9
140			144,2	179,3	229,2
150	13,2	17,0	159,9	192,6	247,0
160			169,4	206,3	258,6
170			178,3	216,7	266,4
180	17,2	19,5	188,4	225,3	269,1
190			197,3	229,3	272,2
200			207,1	232,5	274,6
210	17,9	21,7	217,2	235,7	274,6
220			222,7	236,8	275,4
240	20,9	24,2	236,2	240,8	277,0
270	22,9	27,1	239,3	244,0	281,7
300	24,6	28,9	241,8	245,4	285,6
330	25,9	30,0	247,9	247,2	288,7

Nr. 3

Bakterientrockengewicht : 1,0 mg Substrat : m/30 Bernsteinsäure
Kaliumcyanid : m/1000 Thymol : m/1250

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm		
	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
		Zusatz des Thymols	Zusatz des Kaliumcyanids
10	60,4	8,5	11,5
20	121,2	16,8	22,3
30	181,5	24,8	33,3
		Zusatz des Kaliumcyanids	Zusatz des Thymols
40	239,1	28,1	40,6
50	296,8	32,2	47,9
60	355,4	35,2	57,1

Nr. 4

Bakterientrockengewicht : 0,5 mg Substrat : m/30 Milchsäure
Kaliumcyanid : m/1000 Thymol : m/1000

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm		
	Gefäß I	Gefäß II	Gefäß III
		Zusatz des Thymols	Zusatz des Kaliumcyanids
10	42,8	15,9	11,9
20	86,6	30,8	22,7
30	129,6	44,7	35,0
		Zusatz des Kaliumcyanids	Zusatz des Thymols
40	172,9	55,0	43,6
50	215,9	64,3	51,9
60	256,8	75,3	59,9

Nr. 5

Bakterientrockengewicht: 2,2 mg Substrat: m/30 Milchsäure Toluolbehandlung: 30 Min. Thymol: m/1000 pH 7,2 30°. Kompensationsgefäß des Manometers enthielt Bakteriensuspension ohne Substratzugabe.

Zeit in Min.	O ₂ -Aufnahme in cmm			
		Toluol	Thymol	Toluol und Thymol
10	34,0	18,3	15,5	11,5
20	67,0	36,7	31,0	23,2
30	100,5	54,5	46,9	30,5
40	132,8	68,9	60,5	37,9
50	165,1	84,6	75,2	44,7
60	190,8	98,4	89,3	50,9
Verhältnis	100	51,6	46,8	26,7