

# EINE METHODE ZUM ANFÄRBN VON BAKTERIENGEIßELN UND SPOREN UND EINER STUDIE ZUR HERKUNFT DER GEIßELN

EINAR LEIFSON

From the Department of Pathology and Bacteriology, Johns Hopkins University,  
Baltimore

Received for publication May 22, 1930

## *BACTERIAL FLAGELLA – Bakterien Geisseln*

Die Geißelfärbung gilt im Allgemeinen als ein ziemlich schwieriges Verfahren, und selbst mit einer sorgfältigsten ausgeführten Technik zeigen nur wenige aus einer großen Anzahl von Objektträgern zufriedenstellende Geißeln. Das Hauptproblem bei den meisten Geißelfärbungen ist, dass das Beizmittel, das verwendet wird, nicht stabil ist. Es können einmal gute und beim nächsten Mal schlechte Ergebnisse erzielt werden. Eine wichtige Eigenschaft einer guten Geißelfärbung sollte daher ein stabiles Beizmittel sein. Ein solches Beizmittel wurde von Gray beschrieben (1). Er mischte Kaliumalaun, Quecksilberchlorid, Gerbsäure und alkoholisches Fuchsin und goss die Mischung sofort auf den Abstrich. Alle diese Reagenzien sind vollkommen stabil, und die Färbung lässt sich jederzeit duplizieren. Sie ist im Vergleich zu anderen Geißelfärbungen ausgezeichnet. Eine Gegenfärbung für eine starke Lösung aus basischem Fuchsin ist ebenfalls notwendig. Diese Färbung führt zu hervorragenden Ergebnissen bei sporenbildenden Organismen, wie *B. vulgatus*, *B. subtilis*, *B. terminalis*, *Cl. botulinum*, *Cl. tetani*, etc.

Mit *Bact. typhosum*, und den *Vibrios*, werden nicht so gute Resultate erzielt. Es wurden verschiedene Modifikationen der Färbung versucht. Eine deutliche Verbesserung war die Zugabe einer ausreichenden Menge Salzsäure zum Alaun, um die Konzentration der Säure auf 1/100 N<sup>1</sup> zu erhöhen. Es wurde festgestellt, dass Ammoniumalaun anstelle von Kaliumalaun ein gutes Ergebnis ergab. Allerdings wurde erst nach der Zugabe von Alkohol eine nahezu perfekte Geißelfärbung erzielt. Ohne den Alkohol im sogenannten "Beizmittel" ist die Geißel ohne Gegenfärbung nur sehr schwach sichtbar.

---

<sup>1</sup> 37 % Salzsäure 12,019 mol/l, benötigt wird 1/100 N,  
 $12,019 / (12,019 \cdot 100) \text{ mol} / (12,019 \cdot 100) \text{ l} =$   
0,01 mol/0,0008l)

0,8ml in 1Liter Alaun

1ml = 1g = 20 Tropfen(testen); 0,8ml = 0,8\*20= 16 Tropfen; 100ml 1,6 Tropfen  
wenn weniger Alaun, dann weniger Salzsäure, z.B, 100m alaun

Mit dem Alkohol ist keine Gegenfärbung erforderlich, und die Flagellen sind intensiv gefärbt und enorm vergrößert.

### *Methoden für Bakterienausstriche* *Die Objektträger*

Die Objektträger müssen so sauber wie möglich sein. Unsere Methode besteht darin, die alten Objektträger in eine alkalische Seifenlösung zu legen, um das Öl zu entfernen, und sie dann etwa einen Tag lang in eine gute Reinigungslösung zu legen. Die Objektträger werden dann sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und zwischen Papiertüchern getrocknet. Das Waschen mit Alkohol scheint keine zusätzliche Reinigungswirkung zu haben. Die ausgewählten Objektträger sollten so frei von Kratzern wie möglich sein. Kurz vor dem Gebrauch werden sie stark geflammt.

### *Die Organismen*

Die Organismen wachsen am besten in Bouillon für zwölf bis vierundzwanzig Stunden, von denen sie zentrifugiert, in destilliertem Wasser suspendiert, rezentrifugiert und resuspendiert werden, um eine leicht milchige Suspension zu erhalten. Die Anzahl von Waschungen ist in der Regel ausreichend, aber weiteres Waschen kann manchmal zu einem sauberen Objektträger führen. Sehr gute Ergebnisse können auch erzielt werden, wenn eine verdünnte Suspension der Organismen aus einer Agarschale hergestellt wird. Eine Impfnadel voll mit den Organismen wird auf das Ende des leicht warmen Objektträgers gelegt und dann läßt man die Lösung den Objektträger hinunterlaufen. Wenn das Wasser nicht über den Objektträger abläuft, ist er fettig und sollte verworfen werden. Entgegen der landläufigen Meinung sind die Geißeln, zumindest bei einigen Bakterien, nicht leicht abzuberechen. Eine Suspension von Typhusbazillen in destilliertem Wasser wurde in einer Schüttelmaschine zwanzig Minuten lang geschüttelt, wobei nur etwa 50 Prozent der Geißeln verloren gingen. In destilliertem Wasser suspendiert, blieb die Geißel an Typhusbazillen einen Monat lang intakt. Nach dieser Zeit wurden keine Färbungen gemacht. Die Geißeln von *Bacillus terminalis* waren nach zwei Wochen in destilliertem Wasser an den Organismen noch intakt.

### *Die Färbung*

Basisches Fuchsin ist nicht der einzige Farbstoff der für die Geisselfärbung verwendet werden kann. Methylene Blau and Kristallviolett wurde mit

dem gleichen Erfolg verwendet. Unterschiede in der Löslichkeit dieser Farbstoffe in Alkohol machen es notwendig, diese in unterschiedlichen Konzentrationen zu Alkohol zu verwenden, um gute Ergebnisse zu erhalten. Mit basischen Fuchsin hat das Rezept folgende Zusammensetzung:

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                                                                                            | CC. |
| Ammonium <sup>1</sup> <del>or potassium</del> <sup>2</sup> Alaun, gesättigte Wasser Lösung | 20  |
| Tannic acid, 20 per cent water solution                                                    | 10  |
| Distilled water                                                                            | 10  |
| 95 per cent ethyl alcohol                                                                  | 15  |
| Saturated ethyl alcoholic solution of basic fuchsin <sup>4</sup>                           | 3   |

<sup>1</sup> Ammoniumalaun

<sup>2</sup> ~~Kaliumalaun~~

<sup>3</sup> Tanninsäure

<sup>4</sup> die fertigen Lösung mit Fuchsin sind oft auf Wasserbasis – also nicht brauchbar

<sup>5</sup> kann man Spiritus verwenden?

Kristallviolett ist etwa doppelt so gut in Alkohol löslich wie basisches Fuchsin. Wenn dieser Farbstoff verwendet wird, sollten nur etwa 1,5 cm<sup>3</sup> davon anstelle von 3 cm<sup>3</sup> basischem Fuchsin zugegeben werden. Methylenblau hat nur zu etwa 1,5 Prozent oder zu einem Viertel die Löslichkeit von basischem Fuchsin. Da so mit dem Farbstoff erheblich Alkohol eingebracht wird, sollte die Menge des zugesetzten Alkohols als solcher auf die Hälfte reduziert werden. Bei Methylenblau wird die folgende Formel empfohlen:

|                                                      |     |
|------------------------------------------------------|-----|
|                                                      | CC. |
| Ammonium or potassium alum, saturated water solution | 20  |
| Tannic acid, 20 per cent water solution              | 10  |
| Distilled water                                      | 5   |
| 95 per cent ethyl alcohol                            | 5   |
| Saturated alcoholic solution of methylene blue       | 10  |

Die Zutaten werden in der angegebenen Reihenfolge gemischt. In der Regel bildet sich ein leichter Niederschlag, der abfiltriert werden kann, dies ist aber nicht notwendig. Die Färbelösung sollte in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt werden und ist eine Woche oder länger haltbar. Mit zunehmendem Alter färbt die Färbelösung schwächer als zu Beginn, aber es bildet sich auch weniger Niederschlag auf den Objektträgern.

Der Färbung bleibt länger in gutem Zustand, wenn eine größere Menge von Farbstoff hinzugefügt wird, aber erst nach einem oder mehreren Tagen wird sie wirklich gut werden. Wenn die Beize nur zum Zeitpunkt der Zubereitung verwendet werden soll, können die Mengen an Farbstoff, die hinzugefügt werden, reduziert werden. Statt 3 Kubikzentimeter Fuchsin ergeben 2 Kubikzentimeter Fuchsin etwas bessere Ergebnisse.

An einem warmen Tag können die unfixierten Abstriche mit der Färbung überschichtet und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur belassen werden. An einem kalten Tag ist es jedoch besser, die Abstriche in den Inkubator zu legen.

Je höher die Temperatur, desto stärker werden die Geißeln gefärbt, aber es bilden sich auch mehr Niederschläge auf dem Objektträger. Nach etwa zehn Minuten wird die Färbelösung mit Wasser abgewaschen.

### *Gegenfärbung*

Was die Geißeln selbst betrifft, wird keine Gegenfärbung benötigt. Sehr schöne Präparate lassen sich jedoch erzielen, wenn man eine Gegenfärbung verwendet, deren Farbe sich von der Farbe der Geißelfärbung unterscheidet. Mit den rot gefärbten Geißeln können die Organismen durch fünf- bis zehnminütige Gegenfärbung mit einer wässrigen Lösung von Methyleneblau, die wie folgt hergestellt wird, blau gefärbt werden:

|                             | per cent |
|-----------------------------|----------|
| Methylene blue (dry powder) | 0.1      |
| Borax                       | 1        |

Carbol-Fuchsin, 1/10 mit Wasser verdünnt und fünf bis zehn Minuten lang aufgetragen, ist eine gute Gegenfärbung, falls die Geißeln blau sind.

### Diskussion

In letzter Zeit scheint sehr wenig Arbeit über die Natur von bakteriellen Geißeln geleistet worden zu sein. Die vollständigste Diskussion des Themas scheint die von Migula in seinem bekannten "System der Bakterien"<sup>2</sup> zu sein. Aus den damals vorliegenden Daten schloss Migula, dass Geißeln Auswüchse des bakteriellen Ektoplasmas seien. Auch dieser Gedanke scheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt allgemein akzeptiert zu sein. Aus dem Auftreten von Geißelpräparaten von *Bact. typhosum* und *Proteus vulgaris* lässt sich eine andere Schlussfolgerung ziehen. Wie bereits erwähnt, färbt keiner dieser Organismen fest mit der Geißelfärbung. Die Geißeln, die ektoplasmatiscche Zone und eine zentrale Säule sind rot gefärbt. Der Rest des Organismus ist farblos, es sei denn, es wird eine Gegenfärbung verwendet, in welchem Fall er die Farbe der Gegenfärbung annimmt. In einer Reihe von Fällen kann man sehen, dass die Geißeln ihren Ursprung in der zentralen Säule haben. Nur selten entsteht ein Flagellum zwischen der zentralen Säule und der ektoplasmatiscchen Zone. Am häufigsten scheinen die Geißeln an der Oberfläche zu entstehen.

---

<sup>2</sup> [Walter Emil Friedrich August Migula](#)

Abbildung 1 zeigt Zeichnungen einer Anzahl von *typhoid bacilli*. Abbildung 2 ist eine Fotografie von Typhusbazillen. Es ist möglich, dass die zentrale Säule ein Artefakt ist und ein geschrumpftes Endoplasma darstellt. In diesem Fall sollte die klare Zone zwischen ihr und dem Ektoplasma leer sein. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein,

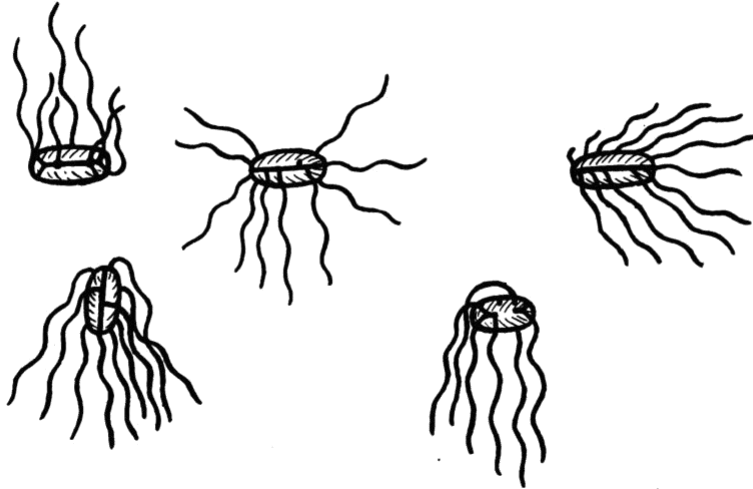


FIG. 1. *BACTERIUM TYPHOSUM*

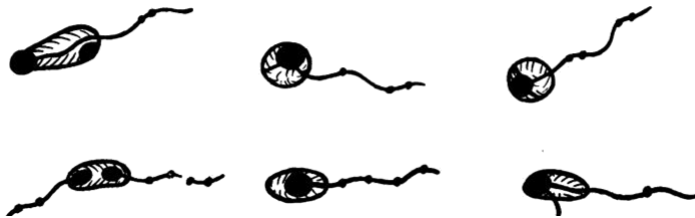


FIG. 3. *VIBRIO FINKLOR-PRIOR*

die Gegenfärbung färbt den Bereich an. Selbst sehr verdünntes alkalisches Methylenblau färbt ihn recht stark. Die alternative Erklärung wäre, dass die zentrale Säule eine bestimmte Struktur ist, die entlang des Zentrums des Organismus verläuft und eine ähnliche Zusammensetzung hat wie die Geißel.

Die untersuchten sporenbildenden Organismen, sowohl grampositive als auch gramnegativ, färben sich deutlich außer im Fall von der Bakterie *cereus*. Bei diesen Organismen wird das Ektoplasma nur teilweise angefärbt. Die Vibrios (*V. metchnikovi*, und *V. finklor-prior*) färben sich gleichmäßig und etwas schwach. Bei der Gegenfärbung mit Mansons-Methylenblau (5 Prozent Borax + 1 Prozent Methylenblau) zeigen viele von ihnen die interessante Struktur wie in Abbildung 3 dargestellt.

Aus den gewonnenen Daten, insbesondere bei *Bact. typhosum*, kann der Schluss gezogen werden, dass bakterielle Geißeln nicht von ektoplasmaschen Ursprung sind, sondern aus dem Endoplasma stammen und haben vielleicht eine bestimmte Struktur im Endoplasma. Diese Schlussfolgerung findet Untermauerung in der Arbeit von Smith und Reagh (2), wo sie zeigte, dass Agglutinine gegen einen bewegungsfähigen Stamm von Hog Cholera-Organismen waren nicht sehr aktiv gegen eine nicht-molekulare Stamm desselben Organismus. Man kommt zu dem Schluss, dass die Agglutinine für die Geißel und den Zellkörper unterschiedlich sind.

Bei Organismen mit endständigen Sporen fallen die Geißeln in der Regel zuerst von dem Ende ab, in dem sich die Sporen befinden. Dies darf vielleicht nicht als Hinweis darauf verstanden werden, dass die Geißel aus dem Endoplasma stammt, sondern lediglich darauf, dass das Ektoplasma um die Spore herum geschwächt ist. Die Abbildungen 4 und 5 sind Fotografien von *Cl. botulinum*, die sowohl Geißeln als auch Sporen zeigen. Abbildung 4 wurde speziell ausgewählt, um einen Organismus zu zeigen, bei dem die Geißeln auch am Sporende noch intakt waren. Geißeln und Sporen können bei denselben Organismen vorhanden sein. Ein besonders schöner Beweis dafür findet sich im Fall von *Ps. aeruginosa* (*Pyocyaneus*), wie in Abbildung 6 dargestellt. Diese Zellen wurden bei der Autopsie aus der Peritonealflüssigkeit eines Meerschweinchens gewonnen, der man den spezifischen Organismus injizierte.

In den Experimenten zur Wirkung von Säurezusätzen (Salzsäure) auf die Geißelfärbung wurde festgestellt, dass bei Erreichen einer bestimmten Konzentration (1/10 N) die Geißel nicht mehr gleichmäßig, sondern als eine Reihe von Punkten gefärbt wird. Die Punkte sind rund und gleichmäßig verteilt. Wird die Säurekonzentration noch weiter erhöht, färben sich die Geißeln überhaupt nicht mehr. Wenn Carbol-Fuchsin zu einem hängenden Tropfen Vibrios (und auch anderen Organismen) hinzugefügt wird, kann man einige Geißeln sehen. Diese Geißeln sind nicht stark angefärbt, sondern

als eine Reihe von Punkten. Diese Punkte können natürlich Artefakte sein. Wenn sie reale Strukturen darstellen, wäre es aufgrund ihres Färbeverhaltens wahrscheinlich, dass sie nuklearer Natur sind.

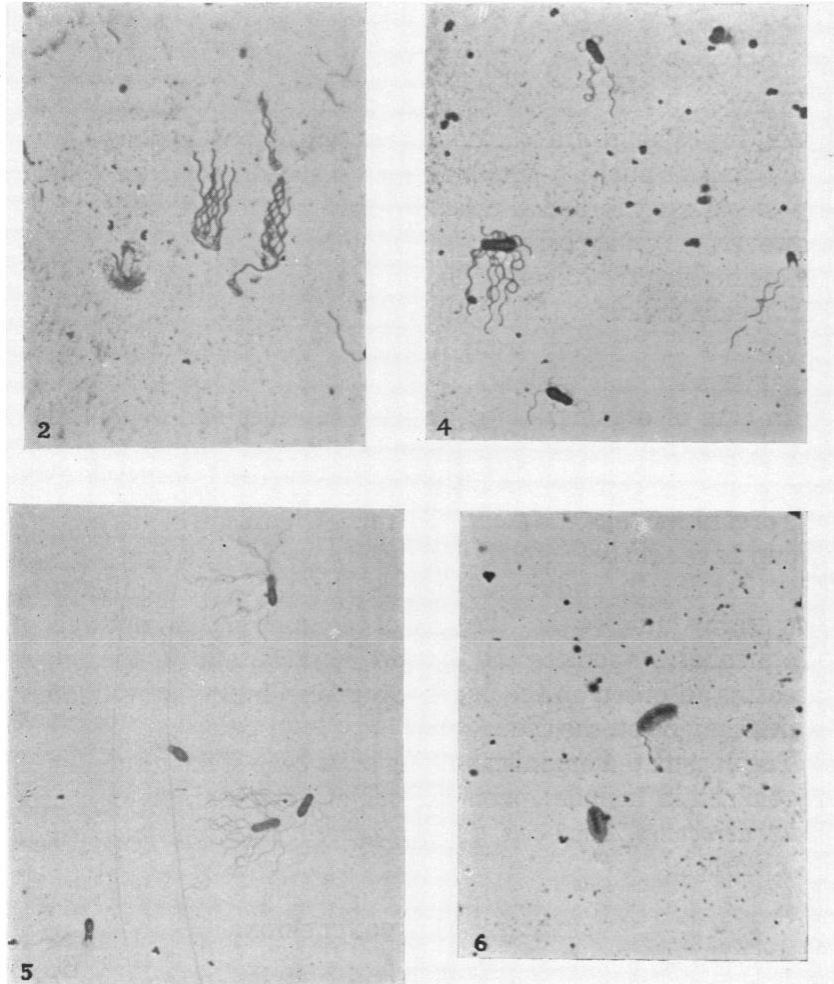


FIG. 2. BACTERIUM TYPHOSUM  
FIG. 4. CLOSTRIDIUM BOTULINUM  
FIG. 5. CLOSTRIDIUM BOTULINUM  
FIG. 6. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

(Magnification 1000 X)

Die Färbungen die allgemein für Bakteriensporen verwendet werden, sind nicht ganz zufriedenstellend. Die Färbung für Geißeln, die in den vorangegangenen Seiten beschrieben wurde, ist ebenfalls eine ausgezeichnete Sporenfärbung. Die Methode zur Anfertigung der Abstriche und der Färbung entspricht genau der für die Geißelfärbung. Die Gegenfärbung ist jedoch zwingend. Mit basischem Fuchsin in der Färbung und Methylenblau in der Gegenfärbung werden die Sporenkapseln rot und die Organismen blau gefärbt.

Organismen wie Pneumokokken können für Sporenkapseln angefärbt werden durch Ausstreichen der Objektträger direkt aus der Peritonealflüssigkeit (Bauchfell). So ist es, im Allgemeinen am besten, die Organismen in destilliertem Wasser zu waschen, bevor der Abstrich gemacht wird. Der Waschvorgang wird durchgeführt wie er für die Geißelfärbung beschrieben wurde. Die Färbungen werden praktischerweise gemacht, indem man die Organismen vom Agar für Abstriche mit destilliertem Wasser verdünnt und schräg ablaufen läßt.

Im Falle von Organismen, die sowohl Sporen als auch Geißeln haben, werden beide gleichzeitig angefärbt, wie in Abbildung 6 dargestellt. In solchen Fällen nehmen sowohl die Sporen als auch die Geißeln die Farbe der Färbung an, während die Organismen die Farbe der Gegenfärbung aufnehmen. Organismen der Gruppe *Bact. coli* wurden ebenfalls mit Sporen sowohl als auch mit den Geißeln gefunden. Die Tatsache, dass Geißeln und Sporen mit der gleichen Färbung färben, bedeutet nicht unbedingt, dass sie von gleicher allgemeiner Natur sind. Wenn der Alkohol verdunstet, fällt der Farbstoff aus und wird dabei an den Geißeln, Sporen oder jedem andere Material, das sich auf dem Objektträger befinden kann, adsorbiert.

Zu den sporenbildenden Organismen, die mit dieser Färbung erfolgreich angefärbt wurden, gehören: *Pneumokokken*, *Streptokokken*, *Staphylokokken*, *Bact. aerogenes*, *Bact. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Bact. pneumoniae* und *Bact. anthracis*.

### *Zusammenfassung und Schlußfolgerung*

1. Es wurde eine Geißelfärbung beschrieben, die in zehn Minuten färbt, einfach herzustellen ist, eine Woche oder länger stabil bleibt und bei der keine Gegenfärbung erforderlich ist.
2. Die Geißeln und Zellkörper können durch Verwendung eines geeigneten Gegenfarbstoffs in einer anderen Farbe gefärbt werden.

3. Es werden Beweise dafür vorgelegt, dass Geißeln möglicherweise nicht ektoplasmatischen Ursprungs sind, sondern möglicherweise irgendwo im Endoplasma ihren Ursprung haben.
4. Sporenbildende Organismen können ihre Geißeln behalten, obwohl sie voll sporenbildend sind. Die Geißeln fallen zuerst dort ab, wo die Sporen gebildet werden.
5. Geißeln und Sporen können koexistieren.
6. Es gibt einige Anzeichen dafür, dass Geißeln nicht homogen sind, sondern Massen von Kernmaterial enthalten, die in regelmäßigen Abständen verteilt sind.
7. Die beschriebene Geißelfärbung ist auch eine ausgezeichnete Sporenkapselfärbung. Dies läßt nicht schlussfolgern, dass Geißeln und Sporen von ähnlicher Zusammensetzung sind.

#### REFERENCES

- (1) GRAY, P. H. H. 1926 Jour. Bact., 12, 273.
- (2) SMITH, T., AND REAGH; A. L. 1903 Jour. Med. Research, 10, 89.

#### Erklärungen

**Vibrionen** ist die eingedeutschte Bezeichnung für Bakterien der [Gattung Vibrio](#), die mäßig bis stark salzbedürftig sind.<sup>[1]</sup> Es handelt sich um [gramnegative Bakterien](#), fakultativ anaerobe, gekrümmte Stäbchen. Die [Geißeln](#) sind meist polar angeordnet. Überdauerungsorgane wie [Sporen](#) werden nicht erzeugt. Die [Humanpathogen](#) sind neben dem bekannten [Choleraerreger Vibrio cholerae](#) auch [Vibrio parahaemolyticus](#) und [Vibrio vulnificus](#), die beide in warmem Salzwasser vorkommen und für schwere [Magendarminfektionen](#) und [Weichteilinfektionen](#) verantwortlich sein können.

Ectoplasm is the outer layer

Endoplasm is the inner cytoplasm.