werden oder ausfallen, dürfte der biochemischen Analyse Wege weisen und ihr helfen, Verknüpfungen in den Genwirkketten zu erkennen. Wenn, wie bei *a*-Mutanten und bei dem Genotypus „*biochemica*“ von *Ephestia* der Ausfall eines oder mehrerer Stoffe von einer erhöhten Konzentration anderer Stoffe begleitet ist, so werden solche Befunde für die Be-

urteilung des Stoff-„Wechsels“ bedeutungsvoll sein.

Ein vorläufiger Vergleich der hier mitgeteilten Ergebnisse an *Ephestia* mit den Befunden, die Hadorn und Mitchell² mit entsprechender Methodik an *Drosophila* erhoben haben, läßt neue Wege für eine genauere Homologisierung von Genwirkungen bei verschiedenen Manifestationssystemen erkennen.

Die mikrobiologische Bestimmung der B₁₂-Vitamine mit der Grünalge „*Euglena gracilis* var. *bacillaris*“. III. Mitt.^{1, 2}

Von H. C. HEINRICH und H. LAHANN

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. J. Kühnau

(Z. Naturforschg. 8b, 589—598 [1953]; eingegangen am 30. Juni 1953)

Die biologisch-chemischen Grundlagen, insbesondere der Vitamin B₁₂-Bedarf und Stoffwechsel der Grünalge, die eine exakt reproduzierbare und spezifische Bestimmung der B₁₂-Vitamine im biologischen Material ermöglichen, werden eingehend dargestellt. Die daraus entwickelte mikrobiologische Technik der Vitamin B₁₂-Bestimmung erlaubt die Erfassung von $1 \mu\mu \gamma = 10^{-15} \text{ g B}_{12}/\text{ml}$.

Nach Jahren der kritischen Erprobung der verschiedenen bisher beschriebenen chemischen, biologischen und mikrobiologischen Methoden zur Bestimmung der B₁₂-Vitamine hat sich mit aller Deutlichkeit gezeigt, daß nur der Test mit der grünen Form und der weißen Mutante der Grünalge „*Euglena gracilis* var. *bacillaris*“ (Egvb)* den Anforderungen genügt, die man an eine Vitaminbestimmungsmethode hinsichtlich Spezifität, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit unbedingt stellen muß. Das Anwendungsgebiet des Grünalgentestes erstreckte sich bisher insbesondere auf die B₁₂-Bestimmung in Körperflüssigkeiten, Organen und anderem biologischen Material mit sehr geringem B₁₂-Gehalt^{3–12}, für die sich andere Methoden der B₁₂-Bestimmung infolge ihrer geringen Empfindlichkeit als ungeeignet oder nur beschränkt anwendbar erwiesen. Die Untersuchung des Stoffwechsels der B₁₂-Vitamine

im menschlichen und tierischen Organismus wurde dadurch einem Studium zugänglich^{3–8, 13}.

Bei der Bestimmung des „wahren“ B₁₂-Gehaltes in Produkten der pharmazeutischen Industrie war der Grünalgentest ohne Schwierigkeiten anwendbar. Dabei zeigte sich, daß die Deklarationen vieler Leberextrakte, Rückstände der antibiotischen Gärung u. a. m., die meistens mittels des unzulänglichen *L. leichmannii*-Testes untersucht worden waren, oft zwischen 200 und 2000% über dem wahren Vitamin B₁₂-Gehalt der Präparate liegen^{3, 4, 13}.

Wenn der Grünalgentest während der letzten Jahre trotzdem nicht die Verbreitung und Verwendung erfahren hat, die ihm wegen seiner später zu besprechenden Eigenschaften zukommen, so liegt das daran, daß selbst der Mikrobiologe bei der Arbeit mit diesem Organismus vor methodische Schwierigkeiten gestellt ist, die in unserem mangelhaften Wissen um

* Phytoflagellat aus der Familie der Euglenidae.

¹ H. C. Heinrich u. H. Lahann, Z. Naturforschg. 7b, 417 [1952].

² H. C. Heinrich, H. Hill u. S. Brilling, Naturwiss. 40, 144 [1953].

³ H. C. Heinrich, Tagg. Deutsch. Ges. Physiol. Chem., Nr. 35, Hamburg, 25. bis 27. Sept. 1952.

⁴ H. C. Heinrich u. Mitarb., 1951—53, unveröffentlicht.

⁵ H. C. Heinrich u. H. Lahann, Dtsch. med. Wschr. 78, Nr. 39 [1953].

⁶ H. C. Heinrich u. H. Lahann, im Druck [1953].

⁷ D. L. Mollin u. G. I. M. Ross, J. clin. Pathol. 5, 129 [1952].

⁸ D. L. Mollin u. G. I. M. Ross, J. clin. Pathol. 6, 54 [1953].

⁹ W. J. Robbins, A. Hervey u. M. E. Stebbins, Bull. Torrey bot. Club 77, 423 [1950].

¹⁰ W. J. Robbins, A. Hervey u. M. E. Stebbins, Bull. Torrey bot. Club 78, 363 [1951].

¹¹ G. I. M. Ross, Nature [London] 166, 270 [1950].

¹² G. I. M. Ross, J. clin. Pathol. 5, 250 [1952].

¹³ H. C. Heinrich u. H. Lahann, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforschg., im Druck [1953].

die Physiologie und den Stoffwechsel, insbesondere der Wirkstoffe, bei diesem Einzeller begründet sind. Nur so lassen sich unseres Erachtens die Mißerfolge bei der Verwendung von Egvb zur Vitamin B₁₂-Bestimmung verstehen. Wir konnten in unserem Institut die an anderer Stelle gemachte Beobachtung der unbefriedigenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse^{14, 15} bei der Benutzung der Alge nicht bestätigen, müssen aber zugeben, daß der Grünalgentest in der ursprünglichen, von seinen Entdeckern angegebenen Form¹⁶ praktisch nicht zu brauchbaren Ergebnissen führt. Die biologisch-chemischen Grundlagen des Egvb-Testes wurden daher von uns eingehender untersucht, und darauf aufbauend eine Methodik der Vitamin B₁₂-Bestimmung mit der grünen Form und der weißen Mutante der Egvb entwickelt, die sich seit dem Jahre 1951 bei uns auf das beste bewährt hat.

Da die von uns geübte Technik bisher noch nicht veröffentlicht wurde, auf der anderen Seite aber ein dringendes Bedürfnis nach einer einwandfreien Vitamin B₁₂-Bestimmungsmethode vorliegt, wird im nachfolgenden das Wesentliche unserer Methode mitgeteilt. Dieses Vorhaben wurde durch die Tatsache, daß fast täglich beim Arbeiten mit der Alge neue Beobachtungen gemacht werden, die schon bald zur Verbesserung der Testmethodik führen, erheblich erschwert.

I. Prinzip der Methode

Provasoli und Mitarbeiter zeigten 1948, daß zur parenteralen Therapie der perniziösen Anämie verwendete Leberkonzentrate große Mengen eines unbekannten Wirkstoffes enthalten, der schon in starker Verdünnung das Wachstum reiner (bakterienfreier) Kulturen der *Euglena gracilis* sehr stark stimuliert¹⁷.

Nach der erfolgreichen Isolierung des Antiperniciosafaktors und seiner Identifizierung mit dem Vitamin B₁₂ im Jahre 1948 konnten dann Hutner und Mitarbeiter diese Beeinflussung des Algenwachstums auch mit hochverdünnten Lösungen des kristallisierten Vitamin B₁₂ erreichen. Die das Vitamin B₁₂ in großen Mengen enthaltenden sogenannten „animal protein factor“-Präparationen wiesen neben einer

erythropoetischen Aktivität ebenfalls die Wachstumswirkung im Grünalgentest auf. Im Gegensatz zu Proteinen pflanzlicher Herkunft förderten alkoholische Extrakte des rohen Caseins das Algenwachstum¹⁶. Als wirksame Komponente erwies sich in allen Fällen das Vitamin B₁₂.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurden dann etwa gleichzeitig und unabhängig voneinander in amerikanischen, englischen und deutschen Laboratorien Vitamin B₁₂-Bestimmungsmethoden entwickelt^{1, 4, 9, 12}. Von den Autoren wird das in Abhängigkeit von der B₁₂-Konzentration im Medium erfolgende Wachstum der Grünalgen durch Zellzählung in der Zählkammer^{1, 2, 9, 17}, Trübungsmessung^{9, 12, 16}, Alkalititration¹² oder pH-Messung mit der Glaselektrode⁴ im inkubierten Medium bzw. durch spektrophotometrische Chlorophyllbestimmung bei 4370 Å¹ ausgewertet. Auch ein Plattentest mit Egvb, der allerdings nur 0,1 mγ Vitamin B₁₂ erfaßt, wurde ausgearbeitet⁹ und hat sich bei Untersuchungen über die Spezifität des B₁₂ für Egvb, Hemmstoffeffekte auf das Algenwachstum sowie bei der Erkennung von B₁₂-synthetisierenden Mikroorganismen bewährt.

Die Kombination der papierchromatographischen Abtrennung der B₁₂-Vitamine — von den im *Lactobacillus leichmannii*-Test störenden, im biologischen Material enthaltenen Substanzen — mit einer bioautographischen Euglena-Technik erlaubt den Nachweis von 10 μγ B₁₂/ml¹⁵.

Bei der Benutzung der empfindlichsten dieser Auswertemethoden, bei der das der Photosynthese dienende Chlorophyll bestimmt wird, müssen die gesamten Versuchsbedingungen auf den nun ausschließlich durch Photosynthese erfolgenden Aufbau der organischen Substanz der Algenzellen abgestellt werden, da sonst Chlorophyllbiosynthese und Zellteilung einander nicht parallel gehen und das gebildete Chlorophyll nicht auf die vorhanden gewesenen Vitamin B₁₂-Mengen bezogen werden kann^{1, 2}.

Bei der weißen Mutante der Egvb, bei der die notwendige Entkoppelung von Chemosynthese und Photosynthese durch die mutagene Wirkung des Streptomycins¹⁷ erfolgt ist^{2, 18}, geschieht die Auswertung des durch Vitamin B₁₂ stimulierten Wachstums der weißen Algenzellen^{2, 18} durch Zellzählung oder wesentlich exakter durch Bestimmung des P- oder N-Gehaltes der organischen Substanz, schneller

¹⁴ J. E. Ford, Brit. J. Nutrit. **6**, 324 [1952].

¹⁵ J. C. Picken u. W. R. Bauriedel, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **75**, 511 [1950].

¹⁶ S. H. Hutner, L. Provasoli, E. L. Stokstad, C. E. Hoffmann, M. Belt, A. L. Franklin u. T. H. Jukes, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **70**, 118 [1949].

¹⁷ L. Provasoli, S. H. Hutner u. A. Schatz, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **69**, 279 [1948].

¹⁸ H. C. Heinrich, Disc. 2. Congrès Intern. Biochim., Paris, 21. bis 27. Juli 1952.

jedoch durch Messung des p_H mit der Glaselektrode im Basalmedium nach erfolgter Inkubation⁴. Im folgenden wird nur eine Arbeitsvorschrift für die Benutzung der grünen Form der Egvb zur Vitamin B₁₂-Bestimmung angegeben. Die ausführlichere Be-

bis 7000¹², 7100⁹ bzw. 7400³ Moleküle Vitamin B₁₂ benötigt. Im anorganischen Basalmedium wurde der Vitamin B₁₂-Bedarf bei den verschiedenen B₁₂-Konzentrationen im Medium eingehender untersucht (vgl. Abb. 2 und l. c.¹³): Tab. 1.

Abb. 2. Wachstumskurve (Eichkurve) der Grünalge *Euglena gracilis* var. *bacillaris* bei der mikrobiologischen Bestimmung der B₁₂-Vitamine. Bestimmung von $\log J_0/J_{4360 \text{ \AA}}$ des Acetonauszuges von 10,0 ml Algenkultur im Elektrophotometer Eppendorf bei einer Küvettschichtdicke von 10,0 mm mit dem Filter 436 m μ (vgl. 2). Die Zellzählung erfolgte in Zählkammern nach Thoma oder Bürker. Angegeben sind die Mittelwerte aus Dreifach-Bestimmungen. $\log I_0/I_{4360 \text{ \AA}}$; + — +; Bedarf Moleküle B₁₂/Zelle: o - - - o; Algenzahl/ml: • - - - •.

schreibung des B₁₂-Testes mit der weißen Mutante^{3, 18} bleibt einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

II. Der Vitamin B₁₂-Bedarf und -Stoffwechsel der Alge Egvb, unter Berücksichtigung der Vor- und Zwischenzüchtung der Kulturen

Für die Entstehung einer einzelnen *Euglena*-Zelle werden im organischen Basalmedium 4800¹⁹, 6000

Das maximale Wachstum der Alge erfolgt bei einer B₁₂-Konzentration von 150¹⁶ bzw. 100¹ $\mu g B_{12}/ml$. Halbmaximales Wachstum wird bei ausgewachsenen Kulturen im Bereich zwischen 10 und 20 $\mu g B_{12}/ml$ beobachtet³, bei nicht ausgewachsenen Kulturen je nach Länge der Inkubationszeit (6—8 Tage) bei 0,5 bis 5,0 $\mu g B_{12}/ml$ ¹ (Abb. 2). Ein nur noch mittels der spektrophotometrischen Auswertemethode und der darauf abgestellten Technik nachweisbarer minima-

¹⁹ S. H. Hutner, Science [New York] 110, 548 [1949].

I Vitamin B ₁₂ -Konzentration im Medium in		II Algenzahl/ ml	III Anzahl der für die Bildung einer Algen- zelle benötig- ten Moleküle Vit. B ₁₂
$\mu\gamma$ /ml	Molekülen/ml		
0,0044	$1,99 \cdot 10^6$	$0,5 \cdot 10^4$	398
0,088	$39,9 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^4$	997
0,888	$399 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^4$	5320
2,22	$997 \cdot 10^6$	$12 \cdot 10^4$	8307
4,44	$1994 \cdot 10^6$	$16,5 \cdot 10^4$	12085
11,11	$4988 \cdot 10^6$	$30 \cdot 10^4$	16627
22,22	$9968 \cdot 10^6$	$48 \cdot 10^4$	20767
44,44	$19935 \cdot 10^6$	$70 \cdot 10^4$	28478
88,88	$39907 \cdot 10^6$	$100 \cdot 10^4$	39907
111,11	$49883 \cdot 10^6$	$91 \cdot 10^4$	54816

Tab. 1. Der Vitamin B₁₂-Bedarf von Egvb für die Bildung einer einzelnen Algenzelle (vgl. auch Abb. 4).

ler Wachstumseffekt — parallel gehend der gebildeten Chlorophyllmenge — findet sich bei 0,1 m $\mu\gamma$ B₁₂/ml. Die Empfindlichkeitsgrenze des Grünalgentestes bei Verwendung der spektrophotometrischen Auswertemethode (= 1 m $\mu\gamma$ = 10^{-15} g B₁₂/ml) wird dadurch bedingt^{1, 4}. In nicht ausgewachsenen Kulturen (Inkubationszeit 6—8 Tage) besteht zwischen dem Wachstum bzw. der gebildeten Chlorophyllmenge und dem log der Vitamin B₁₂-Konzentration im Bereich zwischen 1 m $\mu\gamma$ und 100 $\mu\gamma$ B₁₂/ml eine angenähert linear-funktionelle Beziehung^{1, 3}. Werden die Kulturen darüber hinaus im Photothermostaten weiterhin belichtet (je nach Vorzüchtung und B₁₂-Konzentration im Ansatz insgesamt 10—18 Tage), so wachsen die Algen im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 $\mu\gamma$ B₁₂/ml noch weiter, und es kommt ein anderer Verlauf der Wachstumskurven zustande. Eine angenähert linear-funktionelle Beziehung zwischen der gebildeten Chlorophyllmenge bzw. der Zellzahl und dem Logarithmus der Vitamin B₁₂-Konzentration besteht dann nur noch zwischen 1 m $\mu\gamma$ und 1 $\mu\gamma$ B₁₂/ml, während die Wachstumskurve im Bereich zwischen 1 und 100 $\mu\gamma$ B₁₂/ml dann wie in Abb. 2 dargestellt verläuft⁴.

Im organischen Basalmedium waren nach maximalem Wachstum bei 150 $\mu\gamma$ B₁₂/ml 7×10^6 ²⁰ bzw. 5×10^6 Algenzellen/ml⁹ vorhanden. Bei 10 $\mu\gamma$ B₁₂/ml gewachsene Kulturen enthielten im organischen Basalmedium 880 000²⁰ bzw. 600 000⁹ Algenzellen/ml. Bei der Verwendung des anorganischen Basal-

²⁰ S. H. Hutner u. L. Provasoli, in Lwoff, Biochemistry and Physiology of Protozoa; Academic Press New York 1951.

mediums werden andere Wachstumsverhältnisse beobachtet¹³. Begnügt man sich mit einem Auswertebereich von 3—4 Größenordnungen (= 1 m $\mu\gamma$ —1 bis 10 $\mu\gamma$ B₁₂/ml), so genügt nach dem Gesagten eine Inkubationszeit von 5—8 Tagen. Wird dagegen ein sich über 5 Größenordnungen erstreckender Auswertebereich (= 1 m $\mu\gamma$ —100 $\mu\gamma$ B₁₂/ml) gewünscht, so ist eine Inkubationsdauer von 10—18 Tagen nicht zu vermeiden.

Diese auf den ersten Augenblick enorm lang anmutende Inkubationszeit wird aber noch durch einen zweiten, nun zu besprechenden Gesichtspunkt unumgänglich, da die außerordentliche Empfindlichkeit der von uns entwickelten Methodik dadurch erst ermöglicht wird.

Die Dauer der notwendigen Inkubation im Photothermostaten wird bestimmt: 1. durch das Auswachsen der Kulturen bei den höheren Vitamin B₁₂-Konzentrationen und 2. durch das Ausmaß der Vitamin B₁₂-Speicherung in der zur Impfung verwendeten Vorkultur. Die Nichtbeachtung des letzten Punktes führt außerdem zu hohen Blindwerten und damit zur Verringerung der Empfindlichkeit der Methode, falls die geimpfte Vorkultur nicht ausreichend Vitamin B₁₂-entspeichert war. Die grüne Form und die weiße Mutante der Egvb speichern schon nach kurzer Inkubationszeit das im Kulturmedium enthaltene Vitamin B₁₂ intrazellulär. Diese gespeicherten B₁₂-Mengen, die über den eigentlichen Bedarf an Molekülen B₁₂ pro Zellteilung (Tab. 1) weit hinausgehen, ermöglichen der Alge ein sich manchmal über mehrere Passagen erstreckendes maximales Wachstum selbst in einem B₁₂-freien Medium³.

Die zur Erreichung einer hohen Empfindlichkeit notwendige B₁₂-Entspeicherung der Vorkultur erfolgt zweckmäßigerweise aus einer bei etwa 40 $\mu\gamma$ B₁₂/ml gewachsenen Zwischenkultur durch 1(—3) Passagen über ein Medium, das etwa 100 m $\mu\gamma$ B₁₂/ml enthält. Die so in der Vorkultur erzielte B₁₂-Entspeicherung läßt sich leicht beurteilen, da sie sich quantitativ zu erkennen gibt:

1. In dem geringen Algenwachstum bei 100 m $\mu\gamma$ im Verhältnis zu den gleichzeitig mit derselben Zwischenkultur angeimpften Kulturen mit 1 bzw. 40 $\mu\gamma$ B₁₂/ml (Abb. 2) (s. a. Abb. 1*, g—i).

2. Morphologisch in dem Auftreten von Riesenalgenzellen mit verlängerter Mitosezeit und atypischem Mitoseablauf^{2, 3, 18} (Abb. 1 a, b, c, d). Die letztgenannten Phänomene sind reversibel. Werden die

* Abb. 1 a—i, s. Tafel S. 548 d.

Algenzellen in den Zwischenkulturen zu stark von Vitamin B₁₂ befreit (bei 0,1 bis 10 m μ g B₁₂/ml), so vergeht allerdings nach Animpfung des Testes mit der Vorkultur eine Latenzzeit von wenigen Tagen bis zum Wiedereinsetzen der Zellteilungen, und die Inkubationszeit und damit die Testdauer werden unnötig in die Länge gezogen (bis zu 3—4 Wochen). Diese zu starke Entspeicherung hat sich — obwohl sie mit einer weiteren Steigerung der Testempfindlichkeit verbunden ist — nicht bewährt und kann nicht empfohlen werden, da sich dann oft die Mitosestörungen selbst nach langer Inkubationszeit als irreversibel erweisen^{4, 18}. Wird die Entspeicherung in der von uns empfohlenen Weise durchgeführt, so vergeht zwischen dem Anpflanzen und dem makroskopisch schon erkennbaren Angehen des Testes nur eine Zeit von etwa 2 Tagen.

Andere Autoren^{9, 12} züchten ihre Vorkulturen bei 50—80 μ g bzw. sogar bei 500 μ g B₁₂/ml und erreichen damit eine dichtere (Abb. 1, i) Vorkultur und evtl. auch eine kürzere Inkubationszeit, müssen allerdings dabei auch eine wesentlich geringere Empfindlichkeit von 1—10 μ g B₁₂/ml in Kauf nehmen. Bei unserer Vorzüchtung kann dagegen in Verbindung mit der hochempfindlichen Auswertemethode ohne Schwierigkeiten eine Empfindlichkeit von 1 m μ g Vitamin B₁₂/ml erreicht werden^{1, 18}.

Die Vorrats-, Vor- und Zwischenkulturen werden in Abständen von etwa 7—10 Tagen überimpft, da es nach längerer Zeit sonst, insbesondere bei ständiger intensiver Belichtung und bei submaximaler B₁₂-Konzentration zu Degenerationserscheinungen (Chlorophyllabbau, Cytolyse und Verklumpung) kommt.

Auf Schrägagar, der aus dem organischen Basalmedium, Neopepton (Difco) B₁ und B₁₂ (evtl. auch Leberextrakt) sowie Agar-Agar sich zusammensetzt, lassen sich die Vorratskulturen im Dunkeln sogar über mehrere Monate aufbewahren, wenn sie durch Paraffinieren vor dem Austrocknen geschützt sind. Leberextrakte enthalten keine accessorischen Wachstumsstoffe für Egvb³, so daß sich Zwischenzüchtungen darüber erübrigen. Lösungen des kristallisierten Vitamin B₁₂ ermöglichten in einem vollsynthetischen Basalmedium bisher das maximale Wachstum über 100 Passagen.

Oberhalb der bei 100 μ g B₁₂/ml gelegenen optimalen Wachstumsstoffkonzentrationen sind charakteristische, vorläufig noch nicht zu deutende Hemmungen des Wachstums bei Egvb beobachtet worden¹. Zwischen 160 μ g und 2 m μ g B₁₂/ml und auch gelegent-

lich bei noch höheren Konzentrationen bestehen keine quantitativen Beziehungen mehr zwischen Algenwachstum und B₁₂-Konzentration im Medium. Manchmal erfolgt dann maximales Wachstum, manchmal aber auch unvorhergesehen eine Hemmung mit nur halbmaximalem Wachstum³ (vgl. Abb. 4).

Von Kreitmaier wurden Hemmungswirkungen des B₁₂ und anderer B-Vitamine auf das Wachstum von *Paramaecium caudatum* beobachtet²¹.

III. Basalmedium

Die benutzte Auswertungsmethode ist entscheidend für die Auswahl des zu verwendenden Basalmediums. Autoren, die die Zellzählung, Trübungsmessung oder Alkalititration als Auswertemethode benutzen, verwenden organische Basalmedien, die Buttersäure, Glutaminsäure oder Äpfelsäure als Lieferanten einer Kohlenstoffkette enthalten und der Alge ein Wachstum durch Chemosynthese allein schon ermöglichen^{9, 12, 16}. Bei der Benutzung der hochempfindlichen, spektrophotometrischen Auswertungsmethode haben sich diese organischen Basalmedien als ungeeignet erwiesen, da bei ihrer Benutzung keine exakt reproduzierbare Beziehung zwischen der Vitamin B₁₂-Konzentration und der gebildeten Chlorophyllmenge in der Kultur besteht⁴.

Zur Erzielung dieser unter II eingehend diskutierten Beziehung ist eine Entkopplung von Photo- und Chemosynthese bei der Alge unumgänglich notwendig. Bei der grünen Form der Egvb läßt sich diese Entkopplung einfach durch Weglassen der organischen Bestandteile aus dem Basalmedium, die dann der Alge nicht mehr als Bau- und Energiestofflieferanten zur Verfügung stehen, erreichen. Unter solchen Umständen ist die grüne Algenzelle zu ausschließlichem Aufbau ihrer organischen Substanz durch Photosynthese in einem anorganischen Medium gezwungen. Algenwachstum und Chlorophyllbildung stehen dann in reproduzierbarer Beziehung zum anwesenden Vitamin B₁₂. Bei der weißen Mutante, die eine durch Streptomycin ausgelöste Chlorophyllverlust-Mutation aufweist, unterbindet das Fehlen des intakten Chlorophyllmoleküls die Photosynthese, und ein Algenwachstum ist nur durch Chemosynthese in einem organischen Basalmedium möglich^{2, 3, 18}.

Die Algen wachsen im anorganischen Basalmedium in einem 0,01-m. Phosphatpuffer bei p_H 6,8. Gleich gut geeignet ist aber auch eine Einstellung des p_H im

²¹ G. Kreitmaier, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 4, 542 [1952].

Basalmedium	Anorganisches für die grüne Form der Egvb. (p_H 6,8)				Organisches für die weiße Mutante der Egvb. (p_H 6,1)			
	Stammlösung		mg/l 4—SAM	C_{TM} γ /ml	Stammlösung		mg/l 4—SOM	C_{TM} γ /ml
	mg/ml	ml			mg/ml	ml		
K ₃ -Citrat + H ₂ O	—	—	2000	500	—	—	2000	500
Na ₂ HPO ₄ + 12 H ₂ O	35,8	200	7160	1790	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄ ¹	13,6	200	2720	680	—	—	2000	500
NH ₄ NO ₃	—	—	4000	1000	—	—	400	100
MgSO ₄ + 7 H ₂ O	—	—	500	125	—	—	400	100
CaCl ₂	—	—	100	25	—	—	160	40
H ₃ BO ₃	0,4	2,5	1	0,25	0,4	2	0,8	0,2
ZnCl ₂	0,4	2,5	1	0,25	0,4	8	3,2	0,8
MnSO ₄ + 4 H ₂ O	1,0	1	1	0,25	24	1	24	6
Na ₂ MoO ₄ + 2 H ₂ O	0,5	1	0,5	0,125	0,5	8	4	1
CuSO ₄ + 5 H ₂ O	0,2	2	0,4	0,1	0,2	2	0,4	0,1
Co(NO ₃) ₂ + 6 H ₂ O	0,05	1	0,05	0,0125	10	2	20	5
FeSO ₄ + 7 H ₂ O	—	—	20	5	—	—	80	20
Na-Acetat + 3 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	12000	3000
Mono-Na-l-glutamat ²	—	—	—	—	—	—	8000	2000

¹ Kaliumdihydrogenphosphat, reinst. krist. (E. Merck, Darmstadt).

² Reihst (Dr. Th. Schuchardt, München).

Die übrigen Bestandteile des Basalmediums wurden ausschließlich in Originalpackungen als pro analysi-Substanzen der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

Tab. 2. Zusammensetzung der anorganischen und organischen Basalmedien für die grüne Form und weiße Mutante der Grünalge „*Euglena gracilis* var. *bacillaris*“. Abkürzungen: 4-fach starkes anorganisches Basalmedium: 4-SAM, entspr. organisches Basalmedium: 4-SOM.

Bereich zwischen 5,0 und 6,8⁴. Auch das p_H von 3,0 und 3,6 ist benutzt worden^{9,12} und bietet bei der Benutzung der Alkalititration als Auswertemethode gewisse Vorteile. Es muß aber bedacht werden, daß in diesem p_H -Bereich das Cyanocobalamin nicht mehr stabil ist und insbesondere bei Belichtung schnell in das Hydroxocobalamin übergeführt wird. Auch liegen noch keine ausreichenden Untersuchungen über die Stabilität der verschiedenen B₁₂-Vitamine im biologischen Material beim Erhitzen im Autoklaven in diesem p_H -Bereich vor. Eine konstante CO₂-Spannung läßt sich im Basalmedium leicht ermöglichen, erübrigt sich im Routinebetrieb aber gewöhnlich. Die Zusammensetzung des von uns benutzten anorganischen (für die grüne Form) und organischen Basalmediums (für die weiße Mutante der Egvb) kann aus Tab. 2 ersehen werden. Wir benutzen bei der Herstellung des Basalmediums grundsätzlich nur aus Quarz destilliertes Wasser, um im aqua dest. enthaltene Spurenelemente, die den Test stören können, von vornherein auszuschließen. Um Trübungen und Ausfällungen zu vermeiden, empfiehlt es sich, die Substanzen in der in Tab. 2 angegebenen Reihenfolge zu lösen und zusammenzugeben. Einige der Bestandteile des Mediums sind als Stammlösungen bis zu

4 Wochen im Kühlraum haltbar und wegen der geringen Konzentrationen einfacher zu pipettieren. Diese Stammlösungen sind aber zu verwerfen, sobald in ihnen auch nur die geringsten Trübungen auftreten. Die nutritiven Bedürfnisse der Algen können dann nicht mehr befriedigt werden. Das Basalmedium wird als sogenanntes 4-fach-starkes Medium (4-SM) hergestellt, in dem die in der Tabelle genannten Mengen mit Quarzwasser zu insgesamt 1000 ml aufgefüllt werden.

Über den Vitamin B₁-Bedarf der Egvb liegen keine übereinstimmenden Ergebnisse vor. Wir konnten weder bei 2 $m\gamma$ B₁/ml¹⁶ noch bei 10 γ B₁/ml²² ein maximales Algenwachstum unter sonst konstanten Bedingungen beobachten. Den in diesem Zusammenhang diskutierten Problemen²² dürfte wohl doch keine zu große praktische Bedeutung zukommen. Der eigentliche Vitamin B₁-Bedarf der Alge ist sicherlich sehr niedrig bemessen. Dessen ungeachtet arbeiten wir bei einer Vitamin B₁-Konzentration zwischen 1—10 γ B₁/ml (krist. Thiaminhydrochlorid, Merck). Weitere Untersuchungen zur Erforschung des Vitamin B₁-Stoffwechsels der Egvb müssen abgewartet werden.

²² K. Wallenfels, Z. Naturforschg. **5b**, 438 [1950].

IV. Einstellen der Vitamin B₁₂-Standards

Die Einstellung der Vergleichs- und Arbeitsstandards muß aus krist. Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) erfolgen. Etwa 1 mg krist. B₁₂ wird in Quarzwasser gelöst und in einem Meßkolben auf 20 ml aufgefüllt. Die eigentliche Standardisierung erfolgt dann spektrophotometrisch bei 3610 oder 2780 Å bzw. kolorimetrisch bei 5510 Å im Beckman-Quarz-DU-Spektrophotometer, da eine gravimetrische Standardisierung nur ungefähre Werte ergibt und für die exakte Einstellung unbrauchbar ist. Nach

$$\frac{E \cdot 10^4}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} = C (\gamma/\text{ml}),$$

wobei E die gemessene Extinktion, d. h. der $\log I_0/I$, und $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ die Extinktion einer einprozentigen B₁₂-Lösung bei einer Küvettschichtdicke von 10 mm ist, gelten die Ansätze für die Standardisierung bei:

$$3610 \text{ Å} : \frac{E_{3610 \text{ Å}} \cdot 10^4}{204} = C (\gamma/\text{ml}),$$

$$5510 \text{ Å} : \frac{E_{5510 \text{ Å}} \cdot 10^4}{63} = C (\gamma/\text{ml}),$$

$$2780 \text{ Å} : \frac{E_{2780 \text{ Å}} \cdot 10^4}{115} = C (\gamma/\text{ml}),$$

und die Vitamin B₁₂-Konzentration läßt sich in γ/ml errechnen. Steht kein kristallisiertes Vitamin B₁₂ zur Verfügung, so kann auch von im Handel befindlichen Lösungen des kristallisierten Vitamin B₁₂ im aqua bidest. (z. B. Cytobion, Docigram in Ampullen mit 15, 30 bzw. 1000 γ B₁₂/ml) ausgegangen werden. Es empfiehlt sich dann aber stets, eine spektrophotometrische oder kolorimetrische Standardisierung auf dem oben angegebenen Wege vorzunehmen, da viele Herstellerfirmen ihre Präparate nur gravimetrisch einstellen, und wegen des hygroskopischen Verhaltens der Vitamin B₁₂-Kristalle die fertige Lösung dann meist um etwa 10–20% zu hoch deklariert ist. Falls bei Bezugnahme auf fertige Lösungen des B₁₂ nicht die Möglichkeit besteht, das Absorptionsspektrum zwischen 2000 und 7000 Å auszumessen (Abb. 3), so ist es ratsam, die Quotienten der Absorptionen bei den genannten drei Wellenlängen zu bestimmen. Ihre Normwerte liegen bei

$$\frac{E_{3610 \text{ Å}}}{E_{5510 \text{ Å}}} = 3,22; \quad \frac{E_{3610 \text{ Å}}}{E_{2780 \text{ Å}}} = 1,77; \quad \frac{E_{2780 \text{ Å}}}{E_{5510 \text{ Å}}} = 1,83; \quad (\text{vgl. Abb. 2}).$$

Dabei wird nicht nur die betreffende Vitamin B₁₂-Lösung standardisiert, sondern außerdem noch ein Überblick gewonnen, ob außer dem Cyanocobalamin noch andere B₁₂-Vitamine, z. B. Hydroxocobalamin (= B_{12b}) oder andere mehr darin enthalten sind. In nicht völlig gereinigten B₁₂-Präparaten wird die Standardisierung der B₁₂-Vitamine zweckmäßigerweise durch spektrophotometrische Bestimmung der Alkalisalze der Roten Säure bei 3410 Å vorgenommen²³.

²³ H. C. Heinrich, Z. analyt. Chem. 135, 251 [1952].

Die in der oben angegebenen Weise hergestellte Vitamin B₁₂-Lösung, die etwa 50 γ B₁₂/ml enthält, kann im Kühlraum bei + 2° C unter N₂-Atmosphäre und vor Licht geschützt unbegrenzt lange aufbewahrt werden. Aus ihr werden durch Verdünnen mit Quarzwasser die Arbeitsstandards hergestellt ($C = 1,10$ und $100 \mu\gamma$; 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 70, 100 und $110 \mu\gamma$ B₁₂/ml). Diese Arbeitsstandards sind im Kühlraum bis zu 4 Wochen unverändert haltbar. Beliebig viel weitere Verdünnungen können aus ihnen hergestellt werden. Auch mit dem Grünalgentest selber können die B₁₂-Standards jederzeit nachgeprüft werden, da unter richtigen Bedingungen der Vor- und Zwischenzüchtung die Wachstumskurve mit ihrem bei $100 \mu\gamma$ B₁₂/ml gelegenen Maximum gut reproduzierbar ist und

Abb. 3. Absorptionsspektren zweier Lösungen des krist. Vitamins B₁₂ (Cyanocobalamin). Zwischen 2200 und 7000 Å im Beckman-Quarz-DU-Spektrophotometer bei einer Küvettschichtdicke von 10,0 mm ausgemessen.

bei anderen B₁₂-Konzentrationen erfolgreiches maximales Algenwachstum immer mit einer fehlerhaften Technik verbunden ist (s. a. Abb. 2).

V. Sterilisation und Ansetzen des Testes

Voraussetzung für die Bestimmung der B₁₂-Vitamine mit der Grünalge Eggb ist neben dem chemisch-exakten auch das mikrobiologisch-saubere Arbeiten. Ist nämlich eine Algenkultur mit B₁₂-synthetisierenden Bakterien oder mit Pilzen infiziert, so ist eine B₁₂-Bestimmung vor allem im biologischen Material mit geringem B₁₂-Gehalt illusorisch. Absolute Asepsis ist somit auch bei Verwendung des anorganischen Basalmediums erforderlich. Das Ansetzen des Testes zur B₁₂-Bestimmung erfolgt in kleinen 50-ml-Erlenmeyerkolben (Schott & Gen. Z-G 20), die mit einem festen Wattestopfen gut verschlossen werden. Nach sorgfältigster Reinigung, u. a. auch durch mehrmaliges Spülen mit doppelt- und quartzdestilliertem Wasser, werden in jeden Kolben 5 ml des 4-fach-starken anorganischen Basalmediums (4-SAM) pipettiert und bis zum Gesamtvolumen von 20 ml (abzüglich der nach Behandlung im Autoklaven hinzugegebenen Menge der B₁- und B₁₂-Standards sowie der auf B₁₂ zu untersuchenden Lösungen) Quarzwasser hinzugegeben. Für jeden Standard

bzw. Testwert werden mindestens drei Kolben parallel angesetzt. Sterilisiert wird dann durch 15 Min. langes Erhitzen bei 1,1 Atm. (122°C). Anschließend läßt man im Kühlraum rasch abkühlen. Das organische Basalmedium wird schonender bei 0,5 Atm. erhitzt. Auftretende gelbe Trübungen verschwinden beim Schütteln in der Kälte. Beim Arbeiten mit einem organischen Basalmedium ist zu bedenken, daß bei der Behandlung im Autoklaven evtl. Hemmstoffe aus den organischen Säuren des Mediums entstehen können⁹. Ähnliche Schwierigkeiten sind bei vielen mikrobiologischen Vitamin- und Aminosäurebestimmungsmethoden mit Lactobazillen beobachtet worden. Die Sterilisation der Vitamin B_{12} - und B_1 -Standards sowie der zu testenden Lösungen erfolgt im strömenden Wasserdampf oder bei 0,5 Atm. für die Dauer von ebenfalls 15 Min. bzw. durch Ultrafiltration in der Kälte. Lösungen des krist. Vitamins B_{12} vertragen im p_{H} -Bereich zwischen 5,0 und 7,5 das Erhitzen im Autoklaven ohne feststellbare Aktivitätsabnahmen. Wird ein Basalmedium mit schwachsaurem p_{H} im Autoklaven erhitzt, so kann auch das Vitamin B_1 den Testkolben schon vor deren Sterilisation zugesetzt werden, ohne das Risiko einer Aktivitäts-einbuße einzugehen.

Zu den das sterile Basalmedium und die entsprechenden Mengen Quarzwasser enthaltenden Testkolben werden unter aseptischen Kautelen die sterilen Vitamin B_{12} -Standards, die zu testenden Lösungen und evtl. auch die B_1 -Standards pipettiert.

Das Ansetzen des Testes wird sodann abgeschlossen mit dem Impfen einer geeigneten, vorgezüchteten Kultur (s. u. II).

Ist die Vorkultur genügend von B_{12} gereinigt, so erübrigt sich ein mehrmaliges steriles Waschen der Algen auf der Zentrifuge, falls die Kultur zuletzt in einem B_{12} -armen Medium gewachsen ist. Jedoch ist es sinnvoll, die zu impfende Vorkultur mit Basalmedium (1-SAM) oder Quarzwasser im Verhältnis von etwa 1:4 zu verdünnen, um eine möglichst geringe Einsaat (zwecks Erreichung einer optimalen Empfindlichkeit) je Kolben beim Animpfen zu erzielen. Beim Impfen der Algen mit einer Spezialpipette (je Kolben etwa 2 Tropfen) ist durch ständiges Drehen für eine gleichmäßige Verteilung der Algenzellen in der Impfpipette Sorge zu tragen. Dieses Impfen ist der Ösentechnik hinsichtlich des erforderlichen Zeitaufwandes und der gleichmäßigeren Einsaat überlegen. Bei der exakt vorgezüchteten Kultur ist es belanglos, ob die geimpfte Algenzahl um $\pm 50\%$ variiert, da die nach Abschluß der Inkubationszeit gebildete Chlorophyllmenge und Zellzahl auch dann allein von der beim Animpfen vorhanden gewesen Vitamin B_{12} -Menge abhängt.

VI. Inkubation im Photothermostaten

Die das anorganische Basalmedium, Vitamin B_1 , die Vitamin B_{12} -Standards bzw. auf B_{12} zu testenden Lösungen enthaltenden, angeimpften Kolben kommen zur Inkubation in einen eigens für diesen Zweck entwickelten Photothermostaten (Abb. 4). Zur kontinuierlichen Belichtung der Testkulturen werden 10 Tageslicht-Hg-Niederdruck-Fluoreszenzlampen (Leuchtstoffröhren: Osram HNT 120, 25 W, HG 1 oder Philips TL 25 W/55) benutzt. Eine

in Höhe der Kulturen homogene Lichtverteilung, die lichtelektrisch ausgemessen wurde, läßt sich durch eine passend eingebaute Milchglasscheibe erreichen (Abb. 4). Die Temperaturregulierung erfolgt mit einer Abweichung von $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ bei einer Arbeitstemperatur von 29°C durch einen ständig an den Kolben vorbeistreichenden Luftstrom. Dieser von einem Dauerläuferventilator erzeugte Luftstrom muß auf seinem Wege von der oberen in die untere Etage an den Flächen eines mit Wasser gefüllten Kupfertanks vorbeistreichen. Zwischen der Wassertemperatur in diesem Tank und der Temperatur des Luftstromes erfolgt ein Ausgleich. Die Wassertemperatur des Tanks wird von einem Kontaktthermometer über ein Relais durch eine am Tank angebrachte Heizspirale gesteuert. Für das Arbeiten bei einer höheren Außentemperatur (in den Sommermonaten bei mehr als 26°C) ist eine mit kaltem Wasser zu speisende Kühlschlange im

Abb. 4. Der Photothermostat zur Inkubation der grünen Form der Egvb. Schematische Skizze. KTM: Kontaktthermometer, TM: Kontrollthermometer, WT: Wassertank, KWA: Kühlwasserablauf, KWZ: Kühlwasserzulauf, HS: Heizspirale am Wassertank, VT: Ventilatoren, LSR: Leuchtstoffröhren, MGS: Milchglasscheibe, GS: Glasscheiben.

Wassertank eingebaut (Abb. 4). Die von den Fluoreszenzlampen entwickelte Wärme wird durch den zweiten Dauerläuferventilator abgeführt und mit zur Beheizung des Luftstromes benutzt. Kontroll-Lampen geben über die Anzahl der eingeschalteten Fluoreszenzröhren (4, 6 oder 10 Lampen) sowie über die Temperatursteuerung Auskunft. Diese Konstruktion des Photothermostaten^{**} erlaubt eine Ausführung in Holz und Hartfaserplatten und macht den Umbau eines wesentlich teureren Metallthermostaten überflüssig. Die Hg-Lampen haben eine Lebensdauer von etwa 8 Monaten, wenn unnötig vieles Schalten vermieden wird. Die Größe der leuchtenden Fläche und damit des Photothermostaten ist so bemessen, daß mindestens 300 Kolben, das sind 100 Vitamin B_{12} -Bestimmungen, gleichzeitig inkubiert werden können. Etwa 48 Stdn. nach Beginn der Inkubation ist schon makroskopisch das Angehen des Testes zu erkennen. Von diesem Zeitpunkt an ist es notwendig, über die ganze Inkubationszeit hinweg in Abständen von etwa 12 Stdn. jeden Testkolben kurz umzuschütteln, da die Algen, besonders gegen Ende der Inkubationszeit, leicht sedimentieren und verklumpen.

^{**} Der Photothermostat wird nach unseren Angaben von dem Medizin.-Chem. Apparatebau F. Gössner (Hamburg 20, Falkenried 72) hergestellt.

Bei diesem Umschütteln erkennt man auch schon nach 2—3 Tagen, in welchen Kolben eine Infektion mit Bakterien oder Pilzen eingetreten ist. Diese infizierten Algenkulturen sind an feinen weißen Schlieren oder Trübungen, die auch gefärbt sein können, sowie durch bakteriologische oder mikroskopische Kontrolle zu erkennen. Sie sind für den B₁₂-Test nicht mehr zu verwerten. Bei sauberem Arbeiten unter günstigen Verhältnissen pflegen nicht mehr als 1—2% der angesetzten Kolben infiziert zu sein. Gegen Ende der Inkubationszeit, die bei uns mit der Berücksichtigung der beiden oben diskutierten Punkte etwa 10 bis 18 Tage beträgt, kann bei den mit den B₁₂-Standards geimpften Kolben schon makroskopisch an dem Ausmaß der Grünfärbung der Verlauf der Eichkurve überblickt werden. Die B₁₂-Standards mit weniger als 1 $\mu\gamma$ B₁₂/ml und die diesen Grünfärbungen etwa entsprechenden Testkulturen können bereits nach 10-tägiger Inkubationsdauer ausgewertet werden, da bei weiterer Belichtung die Extinktion des Acetonauszuges und auch die Zellzahl nicht mehr zunimmt. Nach insgesamt 13- bis 15-tägiger Inkubation pflegen wir die bei B₁₂-Konzentrationen zwischen 1 und 10 $\mu\gamma$ /ml gewachsenen Standards und die entsprechenden Testkulturen auszuwerten. Die hohen B₁₂-Standards (bis zu 110 $\mu\gamma$ /ml) und die entsprechend gewachsenen Testkulturen benötigen mindestens eine Inkubation im Photothermostaten über 15—18 Tage. Das eben beschriebene Vorgehen hat gegenüber der Inkubation des gesamten Ansatzes von etwa 300 Kolben über die Zeit von 15—18 Tagen den Vorteil der besseren Ausnutzung der Lichtfläche (mit dem nächsten Ansatz) und der Verteilung der zur Auswertung anfallenden Kolben über mehrere Tage. In beiden Fällen erhält man prinzipiell übereinstimmende Eichkurven bei der spektrophotometrischen Auswertung. Die Vor- und Zwischenkulturen werden unter denselben Bedingungen im Photothermostaten gezüchtet. Vorratskulturen werden nach dem Angrünen zweckmäßiger im Dunkeln aufbewahrt.

Bei Verwendung des organischen Basalmediums erfolgt das Algenwachstum durch chemosynthetischen Aufbau der organischen Substanz, so daß es nicht auf die Einhaltung einer konstanten homogenen Lichtverteilung ankommt und der beschriebene Photothermostat sich erübrigt. Für diese Zwecke ausreichende Inkubationsanordnungen wurden beschrieben^{9, 12, 16} und haben sich anfänglich bei uns gut bewährt. Wird aber eine Empfindlichkeit der Methode von 1 $m\mu\gamma$ B₁₂/ml gefordert und die spektrophotometrische Chlorophyllbestimmung als Auswertungsmethode benutzt, so sind diese Inkubationsapparaturen nicht ausreichend. Reproduzierbare Ergebnisse sind dann nur mit einem exakt arbeitenden Photothermostaten zu gewinnen.

Die Inkubation der weißen Mutante der Egvb geschieht im Dunkeln in einem gewöhnlichen Brutschrank bei 29°C über 3—5 Tage^{2, 18}.

VII. Auswertungsmethoden

Die entscheidende Bedeutung der gewählten Auswertungsmethode für die einzuhaltenden Versuchsbedingungen wurde bei der Besprechung des Prinzips der Me-

thode (I) und des Basalmediums (III) bereits eingehend erörtert.

1. **Zellzählung:** Zur Auswertung bei der B₁₂-Bestimmung bei der grünen Form^{1, 9, 22} und der weißen Mutante² der Egvb wurden Zählkammern nach Bürker oder Thoma benutzt. Diese Methode ist mit einer großen objektiven und subjektiven Fehlerbreite behaftet, nicht zuletzt wegen der Eigenbeweglichkeit (deren Ausschaltung leicht zu Verklumpungen führt) und ungleichmäßigen Verteilung der Algen in der Zählkammer.

2. **Trübungsmessung**^{9, 12, 16} ist bei der B₁₂-Bestimmung im getrübbten oder gefärbten Material oft nicht möglich¹⁰. In verschiedenen Laboratorien erwies sie sich als prinzipiell ungeeignet^{1, 22}. Möglicherweise spielt die Wahl eines geeigneten Filters eine wichtige Rolle^{9, 12, 15}. Bei der Bestimmung in konzentrierten Seren und in der Milch ist eine Trübungsmessung von vornherein ausgeschlossen.

3. **Alkalititration** wurde bei der Bestimmung in getrübbten Seren benutzt¹². Die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit reicht aber bei der Bestimmung niedriger B₁₂-Konzentrationen nicht aus, und der Umschlagspunkt des Indikators ist bei getrübbten, gefärbten und gut gepufferten Lösungen oft nicht einwandfrei zu erkennen⁴.

4. **p_H-Messung mit der Glaselektrode**⁴ ist ohne Zweifel die eleganteste Auswertungsmethode mit dem geringsten Zeitaufwand, da sie unmittelbar im Testkolben erfolgen kann und leicht 100 Auswertungen/Stde. durchzuführen gestattet. Die gegen die Alkalititration erhobenen Einwände der geringeren Reproduzierbarkeit und beschränkten Anwendbarkeit in gepufferten Lösungen gelten aber auch bei dieser Auswertungsmethode. Dennoch hat sie sich bei der B₁₂-Bestimmung mit der weißen Mutante der Egvb in Serum und Harn gut bewährt⁴.

5. **Spektrophotometrische Bestimmung des gebildeten Chlorophylls bei 4370 Å im Elektrophotometer**¹ ist bei Einhaltung der oben erörterten Bedingungen (vgl. I, II u. III) die hinsichtlich Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit geeignetste Auswertungsmethode bei der Bestimmung der B₁₂-Vitamine mit der grünen Form der Egvb und war bisher in jedem biologischen Material anwendbar. Sie wurde in dieser Zeitschrift bereits beschrieben¹, so daß nur noch wenige Dinge besprochen werden müssen. Das Waschen vor der Aceton- oder Methanolextraktion darf nicht unterbleiben, da sonst Trübungen in den Extrakten zu beobachten sind. Insbesondere bei der B₁₂-Bestimmung im biologischen Material mit einer Eigenfarbe (Leberextrakte, Urine u. a. m.) ist 2-maliges Waschen unerlässlich. Steht keine hochtourige Zentrifuge^{***} zur Verfügung und gelingt es deshalb nicht, die Algen in der Spitze des Zentrifugenglases quantitativ zum Haften zu bringen, so ist das Dekantieren des Basalmediums bzw. des Waschwassers zu unterlassen, da unweigerlich Algenzellen dabei verlorengehen

*** Benutzt wurden die Zentrifugen von Christ (Osterode/Harz) und Runne (Heidelberg-Rohrbach). Nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Doz. Dr. Hill (Physiol. Inst. Tierärztl. Hochsch. Hannover) hat sich auch eine hochtourige Zentrifuge nach Closs und Hill für diesen Zweck bewährt.

würden. In solchen Fällen hat sich das vorsichtige Absaugen des Überstehenden mit einer dünnen Kapillare bei sehr langsam arbeitender Wasserstrahlpumpe gut bewährt.

Anfertigung der Eichkurve: Von den am Elektrophotometer abgelesenen Extinktionen der B₁₂-Standards werden die gemessenen Extinktionen des Blindwertes (Aceton oder Methanol) abgezogen. Aus den verschiedenen für dieselbe Probe angesetzten Kolben wird dann das arithmetische Mittel errechnet und sodann die verschiedenen Volumina der aus den Kolben entnommenen Proben und die Verdünnung berücksichtigt. Die so errechnete Extinktion wird auf der Ordinate eines halblogarithmischen Millimeterpapiers gegen die Vitamin B₁₂-Konzentration (auf der Abszisse) abgetragen. Die in Abb. 4 dargestellte Eichkurve wurde so erhalten. Mit Hilfe dieser Eichkurven wird dann auf dem üblichen Wege aus den auf analoge Weise errechneten Extinktionen der Testwerte der Vitamin B₁₂-Gehalt ermittelt.

Für jeden Ansatz (etwa 100 B₁₂-Bestimmungen) werden 10 B₁₂-Standards mitinkubiert, da der Verlauf der Eichkurve von der Vorzüchtung der Impfkultur abhängt und somit von Ansatz zu Ansatz geringfügig variiert.

VIII. Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Spezifität der Methode

Die erreichbare Empfindlichkeit wird bestimmt durch die gewählte Auswertungsmethode und die dadurch festgelegten Arbeitsbedingungen (vgl. unter II und III). Wird durch Trübungsmessung, Zellzählung, Alkalititration oder pH-Messung mit der Glaselektrode ausgewertet, so liegt die Empfindlichkeitsgrenze bei 1—10 $\mu\gamma$ Vitamin B₁₂/ml^{2, 3, 9, 12, 16}, bei Benutzung der spektrophotometrischen Chlorophyllbestimmung bei 1 m $\mu\gamma$ B₁₂/ml¹.

Die mit der letztgenannten Auswertungsmethode erreichte Empfindlichkeit hat bisher die Vitamin B₁₂-Bestimmung in jedem biologischen Material, auch bei geringstem B₁₂-Gehalt, ermöglicht. Untersuchungen über den Vitamin B₁₂-Stoffwechsel des Menschen, insbesondere bei Megaloblasten-Anämien^{5, 13}, und wäh-

rend der Gravidität und Lactation^{6, 13} sind dadurch ermöglicht worden.

Mit der weißen Mutante der Egvb wird im biologischen Material eine Empfindlichkeit von 0,1—1 $\mu\gamma$ B₁₂/ml erreicht^{2, 3, 18}. Die Reproduzierbarkeit beträgt bei der Vitamin B₁₂-Bestimmung (unter Benutzung der spektrophotometrischen Auswertemethode) in Lösungen des krist. Vitamin B₁₂ und in Vitamin B₁₂-Konzentraten 1—5%, in biologischem Material 5—10%.

Bisher wurden in der Natur noch keine Substanzen aufgefunden, die die B₁₂-Vitamine im Grünalgentest ersetzen können, so daß die Bestimmung der B₁₂-Vitamine mit dem Grünalgentest als einzige der vielen beschriebenen biologischen und chemischen Methoden eine absolut spezifische Erfassung der B₁₂-Vitamine erlaubt^{4, 9, 10, 12, 15, 16, 24}.

Es sei auf eine an anderer Stelle erfolgende ausführlichere Diskussion der Spezifität des *Euglena*-Testes und der übrigen biologischen, mikrobiologischen und chemischen Methoden zur Vitamin B₁₂-Bestimmung verwiesen¹³.

Die Anwendung der mikrobiologischen Vitamin B₁₂-Bestimmungsmethoden mit der grünen Form und der weißen Mutante der Egvb bei der Vitamin B₁₂-Bestimmung in Körperflüssigkeiten (Serum, Urin und Milch), tierischen und menschlichen Organen, pflanzlichen Geweben und Mikroorganismen wird zusammen mit den von uns verwendeten Methoden zur Extraktion und Freisetzung des gebundenen Vitamin B₁₂ im biologischen Material in weiteren Publikationen beschrieben.

Wir danken Fr. Elisabeth Eichhorn für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Mikrophotographien.

²⁴ W. J. Robbins, A. Hervey u. M. E. Stebins, *Nature* [London] **170**, 845 [1952].