

FOLIA MICROBIOLOGICA.

FOLIA MICROBIOLOGICA.

HOLLÄNDISCHE BEITRÄGE ZUR
GESAMTEN MIKROBIOLOGIE.

HERAUSGEGEBEN VON :

M. W. BEIJERINCK, DELFT.
A. KLEIN, GRONINGEN.
J. POELS, ROTTERDAM.
J. G. SLEESWIJK, DELFT.

UNTER MITWIRKUNG VON :

C. W. BROERS, Utrecht — R. P. VAN CALCAR, Leiden —
L. POLAK DANIËLS, Haag — C. EIJKMAN, Utrecht —
H. J. HAMBURGER, Groningen — H. C. JACOBSEN,
Delft — D. A. DE JONG, Leiden — R. DE JOSSELIN DE
JONG, Rotterdam — J. J. VAN LOGHEM, Amsterdam —
L. LOURENS, Rotterdam — H. MARKUS, Utrecht —
C. A. PEKELHARING, Utrecht — H. E. REESER,
Rotterdam — N. L. SÖHNGEN, Delft — C. H. H. SPRONCK,
Utrecht — C. S. STOKVIS, Amsterdam.

II. JAHRGANG.

: 1913. :

LIBRARY
NEW YORK

BOTANICAL
GARDEN

ADMINISTRATION UND VERLAG DER
FOLIA MICROBIOLOGICA:
PHOENIXSTRAAT 18 DELFT.

v. 2
1913

SACHREGISTER.

	Seite.
Alkohol 70 % (Bakterizide Wirkung).....	162
Alkoholgärung.....	95
Aspergillus niger.....	135
Darmtuberkulose.....	271
Fäzes (Bestimmung der Bakterienmenge in —).....	201
Immunität (durch Simultanimpfung).....	225
Indolreaktion (bei Bac. Proteus).....	261
Kolloide.....	95
Lakmusmicrococcus.....	185
Leukocytolyse.....	237
Mangancarbonat (Oxydation durch Bakterien).....	123
Milchsäuregärung.....	180
Nahrung (Selektion bei der —).....	135
Nahrungswert (und narkotische Wirkung).....	254
Penicillium glaucum.....	254
Polyarthrits (beim Schaf).....	1
Presshefe.....	173
Proteusbazillen (Indolreaktion bei —).....	261
Rotlaufbazillus 1, Gifte des —.....	10
Serumimpfung (vereinigt mit natürlicher Infektion).....	225
Tetanus (— bazillen, — toxin).....	66
Trypanosomen.....	79

AUTORENREGISTER.

	Seite.
BAUDET	261
BEIJERINCK	123, 185
KLEIN	201, 285
V. NEDERVEEN	10
POELS	1, 225
REESER ..	66, 237
ROESSINGH	271
SÖHNGEN.....	95
TIJMSTRA.....	162
VISSER.....	201
VRIJBURG	79
WATERMAN	135, 173, 254

2017
P. 10

**POLYARTHRITIS BEIM SCHAF, VERURSACHT
DURCH DEN ROTLAUFBACILLUS
DER SCHWEINE.**

(*Bacillus rhusiopathiae suis*)

VON

Prof. Dr. J. POELS.

(Aus dem Reichsseruminstitut in Rotterdam).



Von Herrn M. C. v. D. POEL, Tierarzt in Nieuwenhoorn, wurde bei einigen Schafen das Dasein einer Krankheit konstatiert, verbunden mit einer Bewegungsstörung und ich hatte durch seine wohlwollende Mitwirkung die Gelegenheit diese Krankheit einzustudieren.

Ich erhielt von Herrn v. D. POEL am 27. August 1912 folgendes Schreiben, nachdem ich schon seit Ende Juni mit ihm über diese Krankheit in Korrespondenz war.

»Über die Lämmer von A. L. TROUW in Nieuwhelvoet, von denen eins nach dem Reichsseruminstitut geschickt worden ist, teile ich Ihnen Folgendes mit:

Total krank gewesen	4
geschlachtet	1
verramscht	1
noch krank	2
genesen	—

Auf dem Hofe selbst ist kein Rotlauf vorgekommen; wohl am 23. Juni bei Schweinen eines Viehbesitzers, der gleich neben der Weide wohnt, wo die Lämmer waren. Die Lämmer waren am 23. Juni schon länger als eine Woche krank.

Auszer den 4 kranken Lämmern besaz der Eigentümer noch 12 völlig gesunde Lämmer, welche sich in denselben Umständen

Turdus 5502

2 1948

befunden haben. Die kranken Lämmer zeigten Steifheit oder Lahmheit und Abmagerung. Alle Lämmer sind in einem Stall geboren, wo kein anderes Vieh kommt. Der Eigentümer hatte von einem Viehhändler erfahren, es sollen auf Flakkee dieselben Krankheitsfälle bei Lämmern vorgekommen sein."

Die angegriffenen Lämmer, welche ungefähr 4 Monate alt waren als die Krankheit entstand, zeigten also Steifheit und Lahmheit, anfangs augenscheinlich verursacht durch einer Gonitis, welche biarticular auftrat.

Die entzündeten Gelenke eines Schafes, welches ich im Anfang der Krankheit untersuchen konnte, waren bedeutend durch ein trübes Exsudat ausgedehnt, in dem zahlreiche flockige Coagula suspendiert waren. Die Synovialhaut war lokal mit einem Überzug von fibrinösem Exsudat bedeckt.

Beim Öffnen der Bauchhöhle stellte sich heraus, dass die Mesenterialdrüsen und Lumbaldrüsen stark vergrößert waren, markähnlich weisz von Farbe und ohne haemorrhagische Änderungen.

Obgleich diese Drüsen nicht genügend bakteriologisch verarbeitet wurden, glaube ich dennoch annehmen zu müssen, dass dieselben mit der Genese der Krankheit verbunden werden müssen. Bei der mikroskopischen Untersuchung und nach Färbung nach Gram war ein feines Stäbchen in einer riesigen Quantität in dem Exsudat der Gelenke anwesend, das Grampositief und den Rotlaufbazillen des Schweines völlig ähnlich war. Der Mikroorganismus wuchs auf gewöhnlichem Agar und bildete auf der Agar-oberfläche kleine punktförmige Kolonien, welche, mit einer Lupe betrachtet, Rotlaufkolonien völlig ähnlich sahen. Auf geronnenem Blutserum fand wenig Wachstum statt und dieses Serum wurde nicht flüssig, wodurch der Mikroorganismus sich deutlich von bacillus pyogenes unterscheidete. In Bouillon geimpft, wurde diese schwach trübe und bei Schütteln gab es darin schöne Wolken, wie das von einer Bouillonkultur von Rotlaufbazillen bekannt ist. Milch wurde durch den Wachstum nicht geändert; sie blieb flüssig.

Den ganzen Impfstich entlang in Gelatine entwickelte sich eine schöne bürstenartige Kultur, welche genau mit der Rotlaufbazillenkultur übereinstimmte.

Nach subkutaner Einspritzung starben Mäuse innerhalb 36 Stunden unter typischen Erscheinungen; die Augenlider waren an einander geklebt.

Tauben starben nach intramusculärer Impfung nach ungefähr 2 à 3 Tagen. Aus den gestorbenen Mäusen und Tauben wurden dieselben Bazillen gezüchtet, welche dieselben biologischen Eigenschaften hatten, als die eingespritzten Bazillen, und, welche in dem Gelatinestich schöne büstenartige Kulturen bildeten.

Um mit Gewisheit zu bestimmen, dasz ich wirklich aus den Gelenken des untersuchten Lamms den Rotlaufbazillus gezüchtet hatte, wurden Tauben eingespritzt mit $\frac{1}{2}$ cM.³ Kultur und 2 Grammen Serum gegen den Rotlauf der Schweine, während eine Kontrolletaube ausschliesslich $\frac{1}{10}$ cM.³ Kultur empfing. Die Kontrolletaube starb nach $3\frac{1}{2}$ Tage, während die Tauben, welche Serum und Kultur empfangen, gesund blieben.

Es ist denn auch nach dieser Untersuchung über allen Zweifel erhaben, dasz der Rotlaufbazillus des Schweines imstande ist spontan eine Polyarthritis bei Lämmern zu veranlassen.

Weiter wurde ein gesundes Schaf mit $\frac{1}{2}$ cM.³ Kultur in einem Hinterkniegelenke gespritzt. Nach ungefähr 24 Stunden entwickelte sich eine Gonitis des eingespritzten Gelenkes, welche mit heftiger Lahmheit verbunden war.

Zwei Monate später wurde das Schaf geschlachtet und dieselbe Gonitis, welche wurde wahrgenommen, bei den Schafen, welche spontan erkrankten, war auch bei dem Versuchsschaf, aber als Monarthritis, anwesend, während der Gelenkknorpel fleckweise verschwunden war. Tiefe Usuren kamen darin vor. An einigen Stellen, wo der Gelenkknorpel zerstört war, war der Prozesz ziemlich tief in die Epiphysen durchgedrungen, wodurch Usuren mit kraterförmigen Öffnungen entstanden waren.

Bei der bakteriologischen Untersuchung waren die Bazillen aus dem Gelenke verschwunden, aber sie waren noch anwesend in der Tiefe dieser Usuren.

Eine gesunde Ziege wurde auf dieselbe Weise und ebenso im Kniegelenke geimpft. Das Tier bekam eine Monarthritis, welche der spontanen, bei den Schafen konstatierten Arthritis, ähnlich war. Dieses Tier wurde 8 Tage nach der Injektion geschlachtet. Bei der mikroskopischen Untersuchung und nach Gramfärbung stellte sich heraus, dasz die eingespritzten Bazillen,

anwesend in dem Exsudat, verfallen waren in körnige Fragmente, welche dennoch bei der Verwendung der Gramfärbung positiv reagierten.

Sie wuchsen aber nicht mehr in den verschiedenen Nährboden.

Späterhin hatte ich, durch die wohlwollende Mitwirkung des Herrn v/d. POEL, dem ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche, die Gelegenheit zu untersuchen an Polyarthritiden leidende Schafe zu untersuchen aus derselben Koppel, aus welcher das Schaf war, bei dem in den Gelenken die Rotlaufbazillen gefunden wurden. Die Polyarthritiden dieser zwei Schafe war damals schon fast 3 Monate alt. Die Hinterkniegelenke, die Sprunggelenke, die Ellbogen und Handwurzelgelenke waren angeschwollen und die Epiphysen hatten sich bedeutend verdickt, verbunden mit Bildung von Osteophyten an den Gelenkrändern, wodurch die Gelenkflächen vergrößert waren.

Eine Periarthritis hatte sich entwickelt, welche eine Verdickung der Knochenhaut und des periarticulären Gewebes veranlaszt hatte.

Das Exsudat war aus einigen Gelenkhöhlen zum größten Teile verschwunden; dagegen war in den Hinterkniegelenken jedes Schafes eine ziemlich große Quantität einigermassen purulente Flüssigkeit anwesend.

Auch bei diesen Schafen waren die Mesenterial- und die Lendendrüsen stark hyperplastisch und markähnlich weiß von Farbe. Diese Änderung in den genannten Lymphoglandulae war bei den drei untersuchten Schafen so ganz gleich anwesend, dass sie meiner Meinung nach mit der Genese der Krankheit verbunden werden muss.

Von einer Nabelinfektion war bei diesen Tieren nichts zu bemerken.

Einigermassen charakteristisch für diese Arthritis war, dass fast in allen angegriffenen Gelenken Usuren vorkamen. Der Knorpel war dabei an einer oder mehr Stellen verschwunden oder sogar perforiert und diese Perforation breitete sich nicht selten bis auf eine Tiefe von $\frac{1}{2}$ —1 Zentimeter in den Epiphysen aus. Aus den hierdurch entstandenen kraterförmigen Höhlen war nicht nur der Knorpel, sondern auch das Beingewebe verschwunden; dieselben waren aber mit einer fibrinösen Masse gefüllt, worin sehr viel Leucocyten anwesend waren. Diese fibrinöse Masse hing rings herum und in der Tiefe ziemlich innig

zusammen mit den Substantia spongiosa der Epiphysen. Ausserdem befanden sich mehrere sehr oberflächliche Usuren im Knorpel, welche zum Teil mit blosszem Auge zu sehen waren, zum Teil mit Hilfe der Lupe aufgesucht werden müssten.

Einige dieser Vertiefungen stellten sich wie flache Ulcera dar.

Es ist über allen Zweifel erhaben, dass die kleineren Vertiefungen aufgefasst werden müssen, alsob sie sich befanden im Anfangstadium der grösseren kraterförmigen Höhlen. In den grösseren Vertiefungen, welche bis in die Epiphysen durchdrangen, waren die Rotlaufbazillen noch in ziemlich bedeutender Anzahl und in lebensfähigem Zustand anwesend. Sie konnten durch die Gramfärbung und die Kultur leicht gezeigt werden. Aber auch in dem purulenten Exsudat der beiden Hinterkniegelenke kamen sie vor, und auch in einem Handwurzelgelenke. Also ungefähr nach einer Periode von drei Monaten, denn die Krankheit hat augenscheinlich schon Anfang Juni angefangen und die letzte Untersuchung fand statt am 9. September, waren die Rotlaufbazillen noch in den kraterförmigen Vertiefungen anwesend, obgleich sie in den meisten Gelenkhöhlen nicht mehr gezeigt werden konnten.

Auch in der Umgegend dieser Vertiefungen in den stark rot gefärbten Spongiosa der Epiphysen fand ich noch spärlich Rotlaufbazillen. Es hatte Interesse zu wissen ob die Bazillen, die sich in diesen Vertiefungen und in dem Exsudat der beiden Hinterkniegelenke befanden, noch lebensfähig und virulent waren, aus welchem Grunde mehrere Media mit dem Inhalt der höhlen geimpft wurden, während ein Teil dieses Inhalts bei Tauben intramusculair eingespritzt wurde. Schon nach 24 Stunden hatten die angelegten Kulturen sich entwickelt und es stellte sich heraus, dass die gewachsenen Kolonien aus Rotlaufbazillen bestanden. Nun konnte die Frage beantwortet werden, auf welche Weise sind die obenerwähnten Usuren und tieferen Höhlen in der Gelenkflächen entstanden.

a. Haben die Bazillen eine Infektion mit nachfolgender Nekrose des Gelenkknorpels verursacht und sind sie darauf tiefer in die Epiphysen durchgedrungen?

b. Oder haben die Bazillen erst auf haematogenem Wege die Epiphysen infiziert und haben sie darauf von den Epiphysen aus den Gelenkknorpel nekrotisch gemacht und perforiert?

Bei diesen zwei Fragen bemerke ich, dass diese Höhlen auch anwesend waren in dem Gelenke des Schafes, das durch Einspritzung, in die Gelenkhöhle, einer Reinkultur der Bazillen nach 2 Monaten, behaftet mit einer Monarthrit, geschlachtet wurde. Bei diesem Schafe konnte nicht die Rede sein von einer haematogener Infektion der Epiphysen. Ausserdem waren zahlreiche kleine Vertiefungen in dem Gelenkknorpel anwesend, welche noch nicht in die Epiphysen durchgedrungen waren, und die schwerlich anders entstanden sein konnten als durch die direkte Einwirkung der Rotlaufbazillen auf der Oberfläche des Knorpels.

Obgleich es mir wahrscheinlich vorkommt, dass beide Wege möglich sind, kommt gewiss die unter *a* genannte Weise am meisten vor.

Diese Vertiefungen wurden auch gefunden im Gelenkknorpel der Kniescheibe und hatten sich darin auch bis in das Bindegewebe fortgesetzt.

Einige dieser Vertiefungen zeigten sich wie flache Ulcera. Bei der bakteriologischen Untersuchung stellte sich also heraus, dass aus den meisten Gelenkhöhlen die Rotlaufbazillen verschwunden waren, was offenbar auf den Umstand zurückgeführt werden müsste, dass darin, sobald das Exsudat resorbiert worden ist, eine baktericide Funktion zur Entwicklung kommt, welche die Bazillen aus den Höhlen der Gelenke verschwinden macht.

Bleibt das Exsudat anwesend und nimmt es dabei einen purulenten Charakter an, so können die Bazillen wohl drei Monate und offenbar viel länger in lebensfähigem und virulentem Zustand darin anwesend sein. Von einer hoch entwickelten baktericiden Funktion der kraterförmigen Höhlen in den Epiphysen kann schwerlich die Rede sein und man mag annehmen dass die Rotlaufbazillen darin mehrere Monate leben können. Die bedeutenden Deformitäten und Verdickungen der Gelenke bei den untersuchten Schafen müssen zu einem groszen Teil zurückgeführt werden auf die Infektion der Epiphysen durch die Rotlaufbazillen, wobei auch Bildung von Osteophyten an den Gelenkrändern statt findet.

Man kann auf Grund dieser Untersuchung daran nicht zweifeln, dass beim Lamm oder beim jungen Schafe, die zwei letzten Tieren waren schon 7 Monate alt geworden, kann vorkommen

eine chronische Form des Rotlaufs der Schweine, welche als Polyarthrits verläuft, wodurch der Beweis geliefert worden ist, dass das Schaf ein chronischer Virusträger des Rotlaufs sein kann.

Ich zweifle nicht daran, dass die Polyarthrits durch Rotlaufbazillen bei Lämmern viel mehr vorkommt und ich habe denn auch angefangen eine Untersuchung danach anzustellen.

Man mag annehmen, dass das Schweinerotlaufserum gegen diese Krankheit eine präventive und kurative Wirkung hat.

Bei dieser Untersuchung meine ich die Frage stellen zu mögen ob beim Kinde kann vorkommen eine Arthritis durch Rotlaufbazillen, denn es ist bekannt, dass der Mensch ziemlich empfindlich ist für eine Wundinfektion durch diese Bazillen. Ausserdem wissen wir, dass beim Essen rohes Schweinefleisch bisweilen grosse Quantitäten Rotlaufbazillen konsumiert werden. LUBOWSKY fand die Rotlaufbazillen in den Faezes eines fünfjährigen Kindes, welches mit Darmkatarrh und Ikterus behaftet war.

Die empfindlichkeit des Menschen für diese Bazillen ist zweifellos nicht weniger gross als die des Schafes.

Auch lenke ich die Aufmerksamkeit darauf, dass die untersuchten Schafe nicht an einer Endocarditis litten. Zum Schluss teile ich noch mit, dass Arthritis durch Rotlaufbazillen häufig beim Schweine vorkommt und dass diese Arthritis viel Ähnlichkeit hat mit der der Lämmer. Auch beim Schweine treten Usuren des Gelenkknorpels und Deformitäten zufolge der Bildung von Osteophyten an den Rändern der Gelenke auf.

Dass die Polyarthrits durch Rotlaufbazillen bei Ferkeln nicht viel mehr konstatiert wird, muss zurückgeführt werden auf den Umstand, dass junge Ferkel überhaupt wenig empfindlich sind für Rotlauf.

Dass Schweine, welche an Arthritis durch Rotlaufbazillen leiden, auch in den Gelenken lange Zeit den Ansteckungsstoff beherbergen können, habe ich durch Untersuchungen feststellen können. Später ergab sich noch aus der Untersuchung, dass die Rotlaufbazillen, nachdem die Schafe geschlachtet waren, in den Gelenken, wenn dieselben genügendes Exsudat enthalten und bei einer nicht zu niedrigen Temperatur bewahrt werden, auf eine erstaunliche Weise zu wachsen anfangen. Diese Beobachtung muss von Wichtigkeit gehalten werden für mikroskopische Diagnose.

Ist nämlich die mikroskopische Diagnose in alten Fällen wegen der geringen Anzahl Bazillen, bisweilen schwer, wenn man die verdächtigen Gelenke während einiger Tage geschlossen aufbewahrt, wird die Anzahl Bazillen so ungeheuer groß, dass die mikroskopische Untersuchung eines, nach Gram gefärbten Präparates, nicht kann fehlen. Wenn man diese Gelenke in den Brutapparat auf 37° C. bringt, wird das Wachsen offenbar noch schneller stattfinden.

Auch bei anderen bakteriellen Arthritiden lässt sich vielleicht diese Methode mit Erfolg praktisch anwenden; auch kann man das Gelenke äusserlich mit einem Antisepticum behandeln.

Die Methode kann den Namen tragen der intra-articularen Kultur.

Die Erwiderung der Frage, ob wir bei dieser Polyarthrititis der Schafe zu tun haben mit den Mäuseseppticaemiebazillen, von R. KOCH im Jahre 1878 beschrieben, ist bei dem gegenwärtigen Standpunkt unsrer Kenntnissen in der Tat überflüssig. Auch meine Untersuchungen über diesen Punkt bestätigen ganz die Meinung kompetenter Beurteiler als PREISZ, JENSEN und PRETTNER, aus welcher Meinung sich herausstellt, dass ein wirklich stichhaltiger Unterschied zwischen den Rotlaufbazillen und den Mäuseseppticaemiebazillen nicht besteht. Wäre der Mäuseseppticaemiebacillus statt im Jahre 1878 zwanzig Jahre später entdeckt worden, so würde der Name von Mäuseseppticaemiebacillus ohne Zweifel nicht entstanden sein und man würde einfach geredet haben von einer Rotlaufinfektion, eventuell von einer Rotlaufepizoötie unter Mäusen.

Die Rotlaufbazillen, gezüchtet aus Schweinen, welche an Rotlauf leiden, zeigen untereinander ebenso große Unterschiede als die, welche bestehen zwischen diesen und den Mäuseseppticaemiebazillen.

Auch Herrn Dr. BÜCHLI spreche ich hiermit meinen Dank aus für die angegriffenen Gelenke eines Schafes, welche ich von ihm erhielt und worin sich die Rotlaufbazillen in Reinkultur vorfanden. Die Gelenke rührten von einem Schafe her aus einem ganz anderen Teil der Provinz. Noch empfing ich von Herrn DHONT, Direktoren des Schlachthofes in Rotterdam, die Gelenke einiger Schafe, welche die obenerwähnten tiefen Usuren, nebst Osteophyten an den Gelenkrändern zeigten. In

diesen Gelenken wurden die Rotlaufbazillen wieder in Reinkultur gefunden. Weil ich jetzt schon 9 Schafe untersuchte, welche an dieser Polyarthritits litten, musz man wohl annehmen, dasz die Polyarthritits durch Rotlaufbazillen bei Schafen häufig vorkommt.

Die gefundenen Bazillen agglutinierten durch Rotlaufserum als Rotlaufbazillen.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER IM ROTLAUF- BAZILLUS ENTHALTENEN GIFTE.

VON

Dr. H. J. VAN NEDERVEEN.

(Aus dem Reichs-Seruminstitut in Rotterdam).

EINLEITUNG.

Die ätiologische Forschung der letzten Jahrzehnte hat entschieden, dass man die durch pathogene niedere Organismen hervorgerufenen Krankheiten in zwei Gruppen einteilen kann. Bei der erste bleiben die Erreger meist auf den primären Ort der Infektion lokalisiert und vermehren sich im Körper nur in geringem Grade, während toxische Substanzen, welche durch diese Krankheitserreger direkt sezerniert werden, bei dem von ihnen hervorgerufenen Krankheitsprozess eine Hauptrolle spielen. Das Paradigma dieser Art von Erkrankungen stellt der Tetanus dar; auch die Diphtherie repräsentiert einen nah verwandten Typus.

An jenen toxischen Substanzen hat man die besondere Eigentümlichkeit feststellen können, dass sie antigene Eigenschaften besitzen, d. h. dass unter ihrem Einfluss im Tierkörper Antikörper gebildet werden, welche mit den Giften sich direkt verbinden und sie dadurch unwirksam machen. Man spricht in diesen Fällen von »Toxinen« und nennt das Reaktionsprodukt »Antitoxin«.

Bei der zweiten Gruppe der Infektionskrankheiten bleiben die Krankheitserreger nicht, wie bei ersterer, auf den Ort der Infektion lokalisiert, sondern verbreiten sie sich, wenigstens wenn der Krankheitsprozess fortschreitet, von hier aus durch den ganzen Körper; auch ist mit dieser Verbreitung eine in der Regel üppige Vermehrung verbunden. Von diesen Erregern werden Toxine, in dem Sinne wie bei der ersten Gruppe besprochen wurde, nicht sezerniert.

Dass in der Tat bei Tetanus und Diphtherie das Krankheitsbild fast ausschliesslich durch ausgeschiedene Toxine hervorgerufen wird, während

die Bakterien selbst hierbei eine untergeordnete Rolle spielen, darf als eine feststehende Tatsache angenommen werden; wie jedoch die Krankheitssymptome und der Tod bei der zweiten Gruppe der Infektionskrankheiten verursacht werden, hierüber sind die Ansichten der Forscher noch verschieden, obwohl allmählich die Überzeugung, dass auch hierbei giftige Stoffe eine Hauptrolle spielen, immer mehr Boden gewinnt.

Die Giftstoffe sind, im Gegensatz zu den echten Toxinen, an den Zellkörper der Bakterien gebunden und zwar hauptsächlich hierin enthalten, weshalb man sie mit dem Namen »Endotoxine« bezeichnet.

PFEIFFER war es, der durch seine Forschungen über Cholera die Aufmerksamkeit der Forscher auf die grosse Giftigkeit der Zellkörper dieses Bakteriums lenkte; er entdeckte, dass diese gleichsam ein Depot von Giftsubstanz bildeten, die unter bestimmten Bedingungen auf den Organismus einen sehr grossen Einfluss ausüben konnte. Das Resultat seiner früheren und späteren Forschungen veröffentlichte er in einem im Jahre 1910 erschienenen Aufsatz (1), in dem er zugleich seinen Standpunkt betreffs der von ihm aufgestellten Endotoxin-Lehre deutlich auseinandersetzt. PFEIFFER sah, als er ganz frische, von löslichen Giften freie, Agarkulturen der Choleravibrionen vorsichtig abtötete und diese geeigneten Versuchstieren (*Caviae* von p. m. 200 g) injizierte, charakteristische Vergiftungserscheinungen auftreten: 3—4 Stunden nach der Injektion fing die Temperatur an zu sinken, während bei tödlichen Giftdosen durch Lähmung des regulatorischen Zentrums ein direkter Temperatursturz eintrat, so sogar, dass noch während des Lebens im Rektum Temperaturen von 25° C. und darunter gemessen werden konnten. War die Giftmenge nicht direkt letal, so erholten sich die Tiere wieder gewöhnlich auffallend rasch, die Temperatur stieg zur Norm und 24—36 Stunden nach der Injektion hatten sich die Tiere anscheinend wieder vollständig erholt. Häufig bemerkte er dann einen erheblichen Gewichtsverlust, der sich allmählich wieder ausglich.

Diese toxischen Substanzen wurden, in Kulturen wenigstens, nicht aktiv sezerniert, sondern gelangten erst zur Wirkung, als die Bakterien im Tierkörper aufgelöst und resorbiert wurden. Bei der Einführung kleinerer Dosen lebender und virulenter Vibrionen in die Bauchhöhle, konnte PFEIFFER mit einem mikroskopisch sterilen Peritoneum den Tod dieser Tiere herbeiführen; das paradoxe Phänomen zeigte sich, dass die Tiere zu grunde gingen, obwohl die bakterienfeindlichen Kräfte des Organismus den Sieg über die einverleibten Vibrionen davon getragen hatten. Untersuchte er die Vorgänge, die sich im Peritoneum des infizierten Tieres abspielten mit Hilfe der Kapillarröhrchenmethode, so sah er, dass auch wenn die Vermehrung der Vibrionen bis zum Tode anhielt, nebenbei eine deutliche Bakterienzer-

störung, ein granulärer Bakterienzerfall, stattfand sodass also stets zwei verschiedene Komponenten: Vibrionenwachstum einerseits, Vibrionolyse andererseits den Infektionsprozess zusammensetzten.

Aus diesen Wahrnehmungen folgerte PFEIFFER, dass bei der Infektion mit lebenden Vibrionen Bakteriensubstanzen resorbiert werden und dass die in ihnen enthaltenen Gifte, die Endotoxine, den letalen Ausgang zum mindesten mit verschulden.

Dass die hier tätigen Gifte nicht von den lebenden Bakterien im Tierkörper sezerniert wurden, sondern von den zerfallenden Bakterien selbst herrührten, konnte er durch den folgenden Versuch nachweisen:

Injizierte man nämlich eine an sich tödliche Dosis der Cholera-vibrionen in das Bauchfell, so blieben bis zur Dauer von 2—3 oder mehr Stunden die Versuchstiere, obwohl das Peritoneum von Vibrionen wimmelte, gesund und die Temperatur, dieses so empfindliche Merkmal bei der Choleravergiftung, blieb fast normal. Tötete man aber nun die Cholera-vibrionen durch nachinjiziertes Choleraserum rapide ab, so war ein ganz akut einsetzender, schneller Temperatursturz die Folge. Der Vergiftungseffekt hängt also ausschliesslich mit dem Bakterienzerfall und deren Resorption zusammen.

Auch bei der Choleravergiftung des Menschen muss, nach PFEIFFER, der Hauptnachdruck auf die Resorption der giftigen Vibrionensubstanz gelegt werden, welche durch Lysis der von der Dünndarmschleimhaut aus in den Körper eindringenden Vibrionen zur Wirkung gelangt. Wenn denn auch die aktive Immunisierung gegen Cholera — und auch gegen Typhus — noch nicht jene Verbreitung gefunden hat, als solche, nach den unleugbar günstigen Folgen, hätte erwartet werden können, so kommt dies durch die unangenehme Nebenwirkung welche die Injektion von Bakterienvakzins begleitet und welche bei sehr empfindlichen Individuen zuweilen bedrohlich werden kann. Wie empfindlich der Mensch gegen derartige Gifte ist, springt in die Augen, wenn wir wissen, dass 2 mg. subkutan injizierter toter Cholera-vibrionen bei erwachsenen Männern bereits eine erhebliche Lokalreaktion und sogar zuweilen nicht unbedeutende fieberhafte Allgemeinerscheinungen erzeugen. Noch sehr viel giftiger ist der Typhusbazillus, der von der Blutbahn aus in erstaunlich kleiner Menge die schwersten toxischen Erscheinungen auslösen kann.

Jedoch nicht nur bei Cholera und Typhus bilden die Endotoxine einen wichtigen Faktor, denn bei jedem Infektionsprozess müssen, nach der Auffassung PFEIFFER's, wenn überhaupt eine zur Heilung tendierende Gegenreaktion des Organismus zustande kommt, die endotoxischen Substanzen zur Wirkung gelangen und eine wichtige Rolle spielen; damit will er jedoch keineswegs sagen, dass ausser diesen nicht auch andere durch den Lebensprozess der Bakterien

erzeugten Produkte an dem Vergiftungsprozess sich beteiligen können, wie zum Beispiel das Leukozidin des Staphylokokkus und die bei so vielen Bakterienarten nachgewiesenen Hämolsine.

Wenn wirklich bei jedem Infektionsprozess diese Endotoxine eine mehr oder weniger grosse Rolle spielen, so muss jene inwendige Giftsubstanz allen Bakterien mehr oder weniger zukommen, also sowohl den Bakterien, welche durch ihre ausgeschiedenen Toxine hauptsächlich eine pathogene Wirkung ausüben, wie zum Beispiel Tetanus und Diphtherie, als auch den Bakterien, welche diese echten Toxine nicht besitzen. In der Tat ist es denn auch verschiedenen Forschern gelungen für Diphtheriebazillen diese endotoxischen Substanzen nachzuweisen.

MURILLO (2) u. A. trocknete das Präzipitat aus Diphtheriekulturen bei 38° C. und pulverisierte dieses in einem Achatmörser; nach dem Vermischen und Auslaugen mit wasserfreiem Glyzerin konnte er Caviae mit der Giftsubstanz aus dem Protoplasma töten; die Tiere gingen unter *starkem Gewichtsverlust* ein.

RIST (3) konnte durch Einführung getrockneter Diphtheriebazillen in die Bauchhöhle der Caviae, deren Tod herbeiführen; grosse Dosen wirkten rapide tödlich, während häufige kleinere Dosen einen langsameren Verlauf zufolge hatten, welche durch *Abmagerung* und *Paralyse* charakterisiert war.

BANDI (4) gewann durch Autolyse aus Diphtheriebazillen endotoxische Substanzen.

CRUVEILHIER (5) konnte Caviae durch subkutane, intraperitoneale und intracerebrale Injektion von Diphtherie-endotoxinen, die nach der Zerstörung der Toxine aus 24-stündigen Kulturen bereitet worden waren, innerhalb 18—24 Stunden unter motorischen Störungserscheinungen töten.

AVIRAGNET, BLOCH-MICHEL und DORLENCOURT (6) sahen mit getrockneten Diphtheriebazillen Caviae zwischen dem 6. und 10. Tage nach der Impfung eingehen und war der Tod hierbei von *sehr erheblicher Abmagerung* und *Kachexie* begleitet.

Auch SALUS (7) ist von dem Vorhandensein der Endotoxine bei dem Diphtheriebazillus überzeugt und ist gleichfalls der Ansicht, dass in dem Diphtherieserum auch Antikörper gegen diese intrazellulären Gifte vorkommen.

Was die übrigen, keine echten Toxine bildenden Bakterien betrifft, auch für sehr viele derselben haben eine grosse Anzahl Forscher inwendige Giftsubstanz nachweisen können.

AUCLAIR (8) konnte mit Hilfe ätherischer Extrakte aus abgetöteten Kulturen, welche Extrakte eingedampft wurden, aus Bac. typhosus, Staphylokokkus, Streptokokkus Erysipelatos, Gonokokkus, Pneumobazillus Friedländer und Actinomyces Giftsubstanz gewinnen.

Auch CARNEVALI (9) behandelte verschiedene pathogene Mikroorganismen und konnte aus den Bakterienkörpern Substanzen auslaugen, welche auf die Versuchstiere eine lokale und eine allgemeine Wirkung ausübten: die lokale Wirkung differierte von gewöhnlicher Infiltration bis zur Nekrose, während sich die *allgemeine stets durch erheblichen Gewichtsverlust und Marasmus* kennbar machte.

MACFADYEN und ROWLAND (10) stellten, nach der Einwirkung von intensiver Kälte, ein wässriges Extrakt von Strept. pyogenes, Staphyl. pyogen. aureus und Bac. enteritides (GÄRTNER) her, welche Extrakte Caviae nach einer intraperitonealen Injektion innerhalb $2\frac{1}{2}$ —8 Stunden töteten.

CENTANNI (11) extrahierte aus einer grossen Anzahl pathogener und nicht pathogener Bakterien Substanzen, welche bei den Versuchstieren eine gleiche Wirkung, in erster Linie Fieber, verursachten. Eine andere konstante Wirkung war die *sehr erhebliche Abmagerung* welche häufig in Marasmus und in den Tod überging.

Es ist selbstverständlich, dass man, nachdem diese inwendigen Zellgifte für die verschiedensten Bakterien nachgewiesen worden waren, zu erforschen suchte ob, und im bejahenden Fall, welchen Einfluss diese Substanzen im allgemeinen auf das Entstehen und den Verlauf einer Infektion ausübten. Auch hier ist es wieder PFEIFFER (1) der hierin Einsicht gewährt hat: Er weist darauf hin, dass durch Bakterienzerfall im tierischen Organismus die natürlichen Abwehrmittel des Körpers, zu denen er in erster Linie den bakteriziden Zustand der Gewebesäfte zählt, beeinflusst werden; im Kontakt mit denselben geht eine gewisse Anzahl eingedrungener Mikroorganismen zugrunde, wobei ihr Bakterienprotoplasma zur Resorption gelangt. Nun wirkt die Aufnahme der kleinsten Menge aufgelöster Bakterien als ein intensiver Reiz, der zur Aktivierung dieses Verteidigungsmittels Veranlassung gibt und so eine schwache Infektion im Keime erstickt.

Es liegt jedoch auf der Hand, dass Substanzen, welche in geringer Dosis reizend wirken, in grösseren Mengen lähmende und giftige Eigenschaften besitzen müssen, sodass, wenn grosse Mengen eingedrungener Bakterien abgebaut werden, schwere Endotoxinvergiftungen entstehen können, wobei das bakterizide Vermögen der Gewebssäfte beinahe völlig unwirksam gemacht wird.

Zu den Vergiftungserscheinungen, welche durch die Resorption von Endotoxinen zustande kommen, gehört in erster Linie das Fieber; dies ist ein allen Infektionskrankheiten gemeinsames Symptom, was sich durch die Endotoxinlehre, als sei es durch Reizung des thermoregulatorischen Zentrums entstanden, ausgezeichnet erklären lässt; wird dieser Reiz durch zu grosse Giftmengen zu stark, so sehen wir das Entgegengesetzte, eine Lähmung jenes Zentrums zustande kommen,

wodurch die Körpertemperatur weit unter die Norm zurückfällt. *In der Regel konnte PFEIFFER eine rapide Abnahme des Körpergewichts beobachten, was besonders bei chronischen Endotoxinvergiftungen in den Vordergrund trat; bei letzteren war manchmal auch ein fortschreitender Marasmus, mit einer Degeneration der inneren Organe, die Folge.*

Eine weitere Wirkung der Endotoxine im allgemeinen sah PFEIFFER in der positiven chemotaktischen Anlockung der Leukozyten. Überall wo Bakterienzellen im Organismus zugrunde gehen, finden wir eine Ansammlung von weissen Blutkörperchen, die unter Umständen zur Bildung von Abszessen Veranlassung geben. Dieser eitererregende Effekt ist nicht bei allen Bakterienarten ganz gleichmässig ausgebildet, fehlt aber anscheinend bei keiner vollständig. Sieht METSCHNIKOFF in den Leukozyten die Hauptschutzvorrichtung des Körpers, PFEIFFER betrachtet dies als ein sekundäres Moment und ein Zeichen dafür, das an einer bestimmten Stelle die Krankheitserreger von den infektionsfeindlichen Kräften zerstört werden, wodurch Bakterienbestandteile frei werden, welche als Schmeckstoffe die Leukozyten heranlocken.

Geht dieser Auflösungsprozess, wie dies bei einzelnen Bakterien der Fall ist, langsam von statten, so findet man in den Leukozyten häufig Bakterien, die erst im Beginn der Schädigung stehen und deshalb morphologisch intakt von den Leukozyten aufgenommen wurden.

Ist jedoch die lokale Bakterienresorption zu stark, oder das gelöste Bakterienprotoplasma übermässig konzentriert, so kann, weil dieser Reiz auf die Leukozyten zu stark wird, die positive Chemotaxis in eine negative umschlagen, sodass in diesem Fall die Leukozyten abgestossen werden, was von PFEIFFER bei manchen Formen der Intoxikation und der Infektion mit Cholera und Typhus an Tierversuchen beobachtet worden ist. Dass wirklich intrazelluläre Gifte die Phagozytose beeinflussen, wurde auch von DUDGEON, PANTON und WILSON (12) beobachtet, die bemerkten, dass Bakterienextrakte aus Verwandten der Typhuscoligruppe, Proteus, Friedländer und Staphylokokkus negativ-chemotaktisch wirkten, während LANGE (13) nach intravenöser Applikation der durch Pepsinverdauung gewonnenen Bakterienprodukte eine sehr rapide Abnahme der Anzahl Leukozyten, sogar wenn eine experimentell herbeigeführte Hyperleukozytose vorlag, eintreten sah; diese Leukozytenabnahme erholte sich nach einiger Zeit wieder, in manchen Fällen sogar bis über die Norm hinaus.

EISENBERG (14) nimmt an dass die Endotoxine nicht nur lokal gewebeschildigend und allgemein neurotoxisch, doch auch leukotoxisch, resp. negativ-chemotaktisch wirken. Nach seiner Ansicht sollten virulentere Bazillen eine grössere Menge dieser Zellgifte enthalten, sodass er also den höheren oder geringeren Grad der Virulenz von dem Gehalt an Endotoxinen abhängig macht.

Ist letztere Ansicht wenig wahrscheinlich zu nennen, auch die Erklärung BAILS für die Virulenz findet wenig Anhänger. BAIL (15) schrieb nämlich den Bakterien, ausser Toxine und Endotoxine, noch andere Substanzen zu, welche er »*Aggressinen*« nannte und welche Substanzen von den Bakterien im Tierkörper ausgeschieden werden würden, um sie in den Stand zu setzen, die natürliche Widerstandsfähigkeit des Individuums zu überwinden, m. a. W. die Infektion zu beschleunigen. Diese sogenannten »Angriffstoffe« sollten sich speziell in den Exsudaten der einer Infektion erlegenen Tiere befinden und, zusammen mit einer nicht letalen Dosis Bakterien injiziert, im Stande sein, diese nicht tödliche Infektion in eine tödliche zu verwandeln. Nach ihrer Auffassung müssten sie als ein Sekretionsprodukt der Bakterien im Tierkörper, und als wären sie nicht infolge der Reaktion des Körpers auf die Infektion entstanden, betrachtet werden. Die Virulenz des Bazillus hinge dann von dem grösseren oder geringeren Gehalt an diesen Substanzen ab.

Forschungen von WASSERMANN und CITRON (16), WOLFF-EISNER (17), DÖRR (18) — und von BALDWIN und PRICE (19) für Tuberkelbazillen — haben jedoch gezeigt, dass die vermeintlichen Aggressinen nichts mit dem lebenden Organismus zu tun haben, sondern nur aufgelöste Bakteriensubstanzen sind, welche man bequem auch *in vitro* erzeugen kann. Dass in der Tat auch die Ansicht EISENBERGS, welcher die Virulenz eines Bazillus von der Menge seiner Endotoxine abhängig macht, als unrichtig erachtet werden muss, ergibt sich aus der Erfahrung dass zwischen diesen beiden durchaus keine Parallele besteht. Im Gegenteil hat es vielfach den Anschein, als ob gerade die virulentesten Bakterien, welche den Tod unter massenhafter Vermehrung herbeiführen, nur in geringem Masse giftig, oder sogar ungiftig sind. So ist es längst bekannt, dass Versuchstiere durch abgetötete Milzbrandbazillen oder abgetötete Streptokokken kaum vergiftet werden können; auch Rotlaufbazillen hält man für sehr wenig giftig.

Ein grösserer Wert ist jedoch auf die Erklärung zu legen, welche PFEIFFER (20) gab, nämlich, dass höhere oder geringere Virulenz von der grösseren oder geringeren funktionellen Wirksamkeit der Bakterienrezeptoren abhängt: virulente Bakterien binden hierdurch alle Lysine des Organismus; einzelne Bakterien gehen durch diese Lysine zugrunde, werden aufgelöst, während die übrigen, da sie keine Lysine mehr vorfinden, danach freies Spiel haben. Höchstwahrscheinlich üben die aus den aufgelösten Bakterien resorbierten Endotoxine eine infektiionsbeschleunigende (aggressiv wirkende im Sinne BAILS) Funktion aus.

Fassen wir dasjenige, was im Vorstehenden mitgeteilt worden ist, in Kürze zusammen, so können wir sagen dass die Endotoxine im

allgemeinen eine gemeinschaftliche Wirkung im Tierkörper ausüben, welche sich hauptsächlich in der Temperatursteigerung resp. -sturz und in einer Beeinflussung der natürlichen Abwehrmittel des Körpers offenbart, während, vor allem auch bei mehr chronischer Vergiftung, eine erhebliche Abmagerung, resp. Marasmus, in den Vordergrund tritt.

Doch muss der Organismus, wie PFEIFFER (I) mit Recht bemerkte, über Vorrichtungen gebieten, durch welche diese Giftwirkung zerstört wird, welche Vorrichtungen nur dann versagen, wenn der Organismus plötzlich mit Giftsubstanzen überschwemmt wird, oder wenn die Menge toxischer Produkte im allgemeinen die Widerstandsfähigkeit des Tierkörpers übersteigt. Es fiel ihm jedesmal auf, dass bei durch subletale Dosen Typhus- oder Choleraendotoxine schwer vergifteten Meerschweinchen diese Tiere sich gewöhnlich auffällig schnell erholten: Meerschweinchen, die des Abends mit einem tiefen Temperatursturz einen sterbenden Eindruck machten, hatten häufig am folgenden Morgen bereits wieder eine normale Temperatur und schienen fast ganz munter. Diese Giftwirkung konnte nicht mit Hilfe gebildeter Antitoxine, wie solche bei Tetanus und Diphtherie bekannt sind, aufgehoben worden sein; durch seine Versuche konnte er nachweisen, dass eine echte aktive Immunisierung gegen die genannten Bakterienendotoxine nicht zustande kommt: In dem Serum vorbehandelter Tiere, zum Beispiel Ziegen, konnten nämlich nie Antitoxine, giftnutralisierende Substanzen, gefunden werden, obwohl diese Tiere unter Umständen Bakterienmengen vertrugen, welche die tödliche Dosis für nicht immunisierte Tiere weit überschritt.

Es befanden sich jedoch darin ganz anders geartete, bisher unbekannte Antikörper, welche bei infizierten Tieren eine auflösende Wirkung auf die betreffenden Bakterien ausübten und dadurch die Infektion beseitigten; m.a.W. enthielt dieses Serum Substanzen, welche mit bakteriolytischen Ambozeptoren zu vergleichen waren und, im Verein mit dem im normalen Körper vorhandenen Komplement, eingeführte Bakterien auflösten; es war also ein sogenanntes bakteriolytisches Serum.

Diese bakterienauflösende Wirkung war jedoch nicht die einzige die, wie PFEIFFER beobachtete, sein Serum ausübte, da es ihm überdies gelang nachzuweisen, dass Meerschweinchen, die intraperitoneal ein Gemisch von spezifischem Cholera- oder Typhusserum mit abgewogener Menge der vorsichtig abgetöteten Bakterien erhielten, das zwei-, ja dreifache der ohne das Serum letalen Endotoxindosis, vertrugen. Auch hierbei konnte von einer Antitoxinwirkung keine Rede sein, denn das für das Verhältnis echter Toxine zu ihren Antitoxinen so charakteristische „Gesetz der Multipla“ (d.h. dass eine grössere Dosis Toxin durch eine im Verhältnis gleich viel grössere Dosis Antitoxin neutralisiert werden kann, oder m. a. W. dass ein abgeglichenes Gemisch von Toxin und Antitoxin

physiologisch indifferent ist) hatte hier keine Geltung: auch die grösste verwendbare Serummenge war bei entsprechend höherer Dosis der abgetöteten Bakterien wirkungslos.

Aus diesem Versuche musste daher PFEIFFER schliessen dass, wenn im Tierkörper unter dem Einfluss von Typhusimmunserum eine sonst tödliche Endotoxindosis vertragen wird, dies bedingt sein muss durch einen *fermentativen Abbau des giftigen Bazillenprotoplasmas*, der unter bestimmten Bedingungen zur Bildung *ungiftiger, vom Tierkörper assimilierbarer, Bruchstücke* des ursprünglichen Moleküls fortschreitet. Durch von ihm, zusammen mit ISSAEFF, im Jahre 1893 angestellte Kontrollversuche wurde bestätigt, dass den bakteriolytischen Sera eine giftzerstörende Wirkung zuzuschreiben ist.

Übrigens, in den späteren Jahren hat auch die Praxis in dieser Angelegenheit entschieden: Wie könnte sonst die Behandlung mit bakteriziden Sera, welche speziell in der Tiermedizin einen solchen Aufschwung genommen hat, so erfolgreich angewendet werden, wenn nicht zugleich, ausser einer Abtötung und Auflösung der betreffenden Bakterien, wobei also viel Endotoxin freiwird, auch diese Giftsubstanzen unschädlich gemacht würden? In diesem Fall müsste nach jeder kurativen Seruminjektion eine schwerere Erkrankung eintreten.

Betrachten wir nun das was uns die Praxis lehrt, so sehen wir, wie bei verschiedenen ansteckenden Tierkrankheiten nach einer Einspritzung des betreffenden bakteriolytischen Immunserums gewöhnlich nach beträchtlich kurzer Zeit, wenn wenigstens der Krankheitsprozess noch nicht all zu weit vorgeschritten ist, eine erhebliche Besserung eintritt, deren erstes Kennzeichen, dadurch veranlasst dass die in dem Körper zirkulierenden resorbierten Endotoxine neutralisiert werden, ein Verschwinden oder eine erhebliche Abnahme des Fiebers ist.

Nachdem der Organismus durch die Serumeinspritzung von der gewebeschädigenden Giftwirkung befreit worden ist, welche das Verschwinden des Fiebers zu folge hat, können wir annehmen, dass die natürlichen Abwehrmittel wiederum in Stand gesetzt werden, die Serumwirkung in der Bekämpfung der eingedrungenen Krankheitserreger aktiv zu unterstützen, welche Unterstützung besonders in der Neubildung von Komplement zu suchen ist. Sind die Tiere schwer, oder bereits längere Zeit krank, sodass die Widerstandsfähigkeit völlig erschöpft ist, dann können wir häufig nach einer geringen Besserung durch Seruminjektion einen Rückfall und den Tod eintreten sehen: In diesen Fällen waren die zirkulierenden Endotoxine abgebaut worden, doch der Körper war zu sehr erschöpft, um die Serumwirkung aktiv zu unterstützen, sodass die Infektion die Oberhand behielt und das Individuum zugrunde ging.

Dieser giftzerstörende Einfluss der bakteriziden Immunsera ist, wie

bereits früher erwähnt worden, von der Aufhebung der Toxinwirkung durch antitoxische Sera wohl zu unterscheiden. Während ein abgeglichenes Gemisch von Diphtherietoxin und -antitoxin physiologisch indifferent ist, erzeugten bei den Forschungen PFEIFFERS Gemische von Typhusbazillen und Typhusserum fast ausnahmslos Krankheitserscheinungen; die Tiere, welche die Vergiftung überstanden, zeigten auch später noch durch mehr oder weniger ausgesprochene Gewichtsabnahme, dass die Endotoxine durch das Serum keineswegs neutralisiert worden waren. Allerdings stellte PFEIFFER fest, dass bei grösseren Serummengen im allgemeinen auch grössere Endotoxindosen vertragen werden, aber es gibt eine obere Grenze der Giftdosis, welche bei Cholera und Typhus bald erreicht ist und sogar durch die grössten Serumquantitäten nicht überschritten werden konnte; dies wird durch den folgenden Versuch deutlich gemacht:

Injizierte PFEIFFER bei Meerschweinchen eine letale Dosis Typhusbazillen in die Bauchhöhle, dann sah er dass die Tiere eingingen; injizierte er zugleich eine hinreichende Menge Typhusserum, so erkrankten die Tiere nicht; die Bazillen konnte er körnig zerfallen wiederfinden, diese waren also aufgelöst worden, während die freiwerdenden Endotoxine unwirksam gemacht wurden. Injizierte er jedoch eine sehr grosse Dosis Bazillen, so konnte die grösste Dosis Serum die Meerschweinchen nicht im Leben erhalten und gingen diese an Endotoxinvergiftung zugrunde: Hierbei wurde also eine *zu* grosse Menge Endotoxine frei, von denen nur ein Teil durch das Serum unwirksam gemacht werden konnte und die übrigen, nicht neutralisierten Giftsubstanzen, eine tödliche Wirkung ausübten.

Die Gefahr für jene Vergiftung ist es denn auch, die der aktiven Immunisierung gegen Cholera und Typhus im Wege steht und welche daher speziell besteht, wenn eine sehr starke Bakterienvermehrung stattgefunden hat.

Und doch werden in der Literatur einige günstige Resultate mit dieser Behandlung erwähnt: So hat SALEMBENI (21) eine unzweifelhaft günstige Wirksamkeit des Choleraserums auf die Cholerainfektion beobachtet, welche um so grösser war, je früher er das Serum anwenden konnte, also in einer Zeit in der noch keine zu starke Bakterienvermehrung stattgefunden hatte.

Was das Typhusserum betrifft, so berichtet ANDERS (22) über 8 Typhusfälle, dass die Krankheit in soweit beeinflusst wurde, dass der Rückgang der Abendtemperatur durch das Serum bedeutend grösser wurde. FOSTER (23) erwähnt, dass von 118 unter gleichen Verhältnissen lebenden Soldaten 92, bei 2 derselben war Typhus festgestellt worden, mit Antityphusserum geimpft wurden. Während der im Sommer 1910 abgehaltenen Manöver wurden von den Nichtgeimpften 25 Prozent

von Typhus befallen, während unter den Geimpften kein einziger Typhusfall vorkam.

Auch VARGAS (24) bekam den Gesamteindruck, dass das Serum günstig wirke, was in der Besserung des allgemeinen Wohlbefindens besonders deutlich hervortrete.

Obwohl also offenbar dem Cholera- und Typhusserum jeglicher Wert nicht abgeleugnet werden kann, scheint jedoch augenblicklich die Aussicht auf schlechte Erfolge noch zu gross zu sein, um in der Praxis allgemeine Anwendung zu finden.

STADELMANN und WOLFF-EISNER (25) teilen mit, dass sie Typhus als eine Sepsis betrachten, die speziell durch aufgelöste Bakterienkörper herbeigeführt wird, wogegen sie dem bakteriolytischen Serum eher einen schädigenden als einen heilenden Einfluss zuschreiben.

WOLFF (26) ging sogar so weit, überhaupt gegen eine Anwendung bakteriolytischer Sera zu warnen; er empfahl, diese nur dann anzuwenden wenn die Menge der bei der Bakterienauflösung freiwerdenden Substanzen an sich noch nicht zum Tode führt, also nur für präventive Zwecke oder im Beginn der Krankheit.

In der tierärztlichen Praxis fallen diese Bedenken, was die Ausübung eines schädlichen Einflusses auf den Krankheitsprozess betrifft, fast völlig weg: Bei einer so häufigen Anwendung von bakteriziden Sera, bei den so vielen Infektionskrankheiten der einzelnen Tierarten nicht nur als Präventiv-, sondern auch als Kurativmittel in den letzten Jahren, kann man sagen, dass es fast nie vorkommt, dass sich der Krankheitszustand nach der Verabreichung des betreffenden Serums verschlimmert, wenn auch nicht geleugnet werden kann, dass die Möglichkeit hierzu besteht. So beobachtete POELS, wie bei einem mit Streptokokken behandelten Pferde, das zur Gewinnung von Streptokokkenserum vorbereitet wurde und das infolge der Infektion heftig erkrankt war, nach Übertragung des Serums der Tod beschleunigt wurde.

Wie erwähnt, ist eine derartige ungünstige Wirkung in der tierärztlichen Praxis zu den höchst seltenen Ausnahmen zu zählen; auch sogar mit dem Coliserum bei der Colibacilliose der Kälber, erzielt man, obwohl der Colibacillus der sogenannten Typhus-gruppe angehört, ausgezeichnete Resultate: Laut des Berichtes des Reichsseruminstitutes zu Rotterdam wurden hiermit im Jahre 1910 in Holland 879 der Ansteckung verdächtige Kälber injiziert, von denen 872, oder gut 99 Prozent, von der Kälberdiarrhöe verschont blieben, während sich von den 243 hiermit behandelten kranken Tieren 184 oder 75,7 Prozent völlig erholten.

Wie bereits mitgeteilt worden ist, wird gegenwärtig allgemein angenommen dass es speziell die Giftigkeit des Zellprotoplasmas sei,

welche nächst der sehr starken Vermehrung in dem infekten Organismus, die Krankheitssymptome der einzelnen Infektionskrankheiten herbeiführt. Die Giftigkeit der einzelnen Bakterien ist jedoch sehr verschieden: sind Cholera- und Typhusbakterien augenscheinlich sehr stark giftig, sogar mit den grössten Dosen abgetöteter Milzbrand- oder Rotlaufbazillen kann man die diesen Krankheiten gegenüber empfänglichen Versuchstiere nicht vergiften. Einzelne Forscher glaubten daher, dass diese Bakterien entweder keine oder doch nur äusserst geringe Mengen Giftsubstanzen enthielten. Sogar PFEIFFER (1), der doch die Wirkung der Endotoxine so sehr in den Vordergrund stellt, sagt, dass gerade die höchst virulenten Bakterien (wobei er besonders den Milzbrand- und den Rotlaufbazillus im Auge hat) *recht oft auffällig geringe endotoxische Effekte zeigen, weshalb er annimmt, dass auch die toten Bakterien in solchen Fällen im Tierkörper nur sehr wenig giftig sind*. Er schreibt dies dem Umstande zu, dass die Auflösung und der Abbau sehr langsam stattfinden dürfte, weshalb es seiner Meinung nach gelingen könnte, durch Zusatz kleiner Mengen spezifischen Serums die toxische Wirksamkeit derartiger Bakterien zu erhöhen.

Da im allgemeinen der Milzbrand- und der Rotlaufbazillus, was die Toxicität betrifft, auf gleicher Linie gestellt werden, wollen wir zuerst an die Hand der Literatur untersuchen, ob in der Tat Giftwirkungen bei der Infektion durch Milzbrand angenommen werden müssen, um danach, gleichfalls an die Hand der Literatur und durch angestellte eigene Untersuchungen nachzuweisen zu suchen, dass auch der Rotlaufbazillus Giftsubstanzen enthält, welche bei dem Infektionsprozess eine Rolle spielen.

Verfolgen wir die Experimente, durch welche verschiedene Forscher die Giftfrage für den Milzbrandbazillus zu entscheiden suchten, so sehen wir, dass sich bereits PASTEUR (27) im Jahre 1877 hiermit beschäftigte: Er filtrierte Blut von Milzbrandkadavern und Milzbrandkulturen, worauf er diese keimfreien Filtrate Versuchstieren injizierte; eine Vergiftung hierdurch sah er nicht eintreten, woraus er schloss, dass diese Bazillen keine löslichen, giftigen Substanzen bildeten.

Nach ihm experimentierten auch LEVY und BECKMANN (28) mit Milzbrandblut: Sie entzogen infizierten Tieren in der Agonieperiode Blut und injizierten das Blutserum derselben ähnlichen Versuchstieren unter die Haut; eine Giftwirkung konnten sie durch diese Injektionen nicht erzielen, woraus sie die Folgerung zogen, dass Milzbrandbazillen keine giftigen Stoffwechselprodukte in dem gewöhnlichen Sinn des Wortes, welche in das Blutserum übergehen, bilden. KLEIN (29) sah, wie nach einer Injektion durch Hitze abgetöteter Milzbrandbazillen und Sporen für die Versuchstiere kein einziger Nachteil entstand,

woraus er folgerte, dass der Milzbrandbazillus keine intrazellulären Gifte enthalte.

Endlich sei erwähnt, dass auch CONRADI (30) vergeblich versucht hat bei diesen Mikroorganismen Endotoxine nachzuweisen: Er filtrierte die nach intraperitonealer Injektion von Milzbrandbazillen bei Meerschweinchen in der Bauchhöhle auftretende seröse Flüssigkeit und auch die Gewebesäfte ausgepresster Organe von Milzbrandkadavern durch Chamberland- und Kitasatofilter; lösliche Gifte konnten in diesen Flüssigkeiten nicht nachgewiesen werden. Ferner tötete er Bazillen mittels Toluol ab und zerrieb diese, nachdem er sie intensiver Kälte ausgesetzt hatte, mechanisch, doch auch auf diese Weise gelang es ihm nicht, Endotoxine zu gewinnen. Er gibt daher als seine Ansicht an, dass bei Anwendung der gegenwärtigen Methoden (1899) der Nachweis nicht erbracht werden kann, dass der Milzbrandbazillus ein extrazelluläres lösliches oder ein intrazelluläres Gift in dem Organismus empfänglicher Tiere bildet. Auf Grund seiner angestellten Untersuchungen nennt er es sogar höchstwahrscheinlich, dass der Milzbrand überhaupt keine giftigen Substanzen im Tierkörper erzeugt.

Wie die verschiedenen Symptome des Milzbrandes und der Tod in Folge des Milzbrandes herbeigeführt werden, wenn eine Giftwirkung auszuschliessen ist, sucht STRUEFF (31) zu erklären, wobei er die vornehmste Ursache in der Verstopfung der Blutgefäße zufolge der Bakterienanhäufung sucht. Er unterscheidet bei dem Krankheitsprozess zwei Perioden: die erste kennzeichnet sich durch die von den in die Lungenkapillaren eingedrungenen Bakterien erzeugten Reizungerscheinungen der Lungenäste des Nerv. Vagus; als solche Symptome betrachtet er die Verlangsamung des Pulses, der starke Fall des Blutdrucks und die beschleunigte Atmung. In der zweiten Periode verschwinden nach seiner Anschauung die Reflexerscheinungen und treten hauptsächlich die Folgen der mechanischen Störungen für die Blutzirkulation in dem kleinen Kreislauf, zufolge einer Verstopfung der Lungenkapillaren durch Bakterien, in den Vordergrund.

Diese Erklärung STRUEFFS war nicht neu, denn bereits im Jahre 1877 wurde von TOUSSAINT (32) geäußert, dass eine Verstopfung der Lungenkapillaren die Ursache des akuten Milzbrandtodes wäre; man kann jedoch wohl sagen dass, obwohl der Artikel STRUEFFS aus den letzten Jahren datiert (1909), diese Theorie fast keine Anhänger mehr findet.

Andern Forschern ist es nämlich auf verschiedene Weise gelungen, auch aus dem Milzbrandbazillus Giftsubstanzen zu gewinnen, obwohl man hiermit im allgemeinen auch nicht die heftigen Erscheinungen, durch welche sich der Infektionsprozess so sehr kennzeichnet, hat erzeugen können.

So erwähnt bereits MARTIN (33) im Jahre 1899, dass es ihm möglich war mittels Alkohol aus Milzbrandbazillen giftige Extrakte zu gewinnen, obwohl die Giftigkeit beträchtlich gering war; aus Kadavern herrührende Milzbrandbazillen enthielten stets mehr jener Giftsubstanzen als die aus Kulturen herrührenden.

BODIN (34) behandelte die Milzbrandbazillen nach der AUCLAIR'schen Methode mit Äther oder Chloroform und gewann hierdurch toxischwirkende Extrakte, welche den Tod der Versuchstiere unter *fortschreitender Abmagerung und Kachexie* herbeiführten.

MARMIER (35) züchtete den Milzbrand-bazillus in Pepton-Glycerinlösung bei 20° und 37° C. Nach Behandlung der filtrierten Kulturflüssigkeit mit Ammoniumsulfat, Glycerin, Alkohol resp. Äther und nach der Trocknung im Vakuum, konnte er in Wasser lösliche Giftsubstanzen gewinnen; die bei niedriger Temperatur gezüchteten Kulturen waren giftiger als die anderen. Durch eine Injektion dieser aufgelösten Gifte sank die Körpertemperatur stark und führte sie den Tod innerhalb 1 bis 19 Tagen herbei, wobei das Tier *sehr stark bis zu 1/3 seines Gewichts abmagerte*; bei der Autopsie ergab sich das Bestehen von Kachexie und konnte keine Spur von Milzbrandbazillen entdeckt werden. War der Zeitpunkt, als der Tod nach der Injektion eintrat, sehr variierend, auch die tödliche Dosis war sehr verschieden.

VAUGHAN (36) gewann, indem er Milzbrandbazillen mit 1 Proz. Schwefelsäure und Alkohol behandelte, giftige Substanzen.

GALTIER (37) bewahrte Milzbrandorgane 3—4 Monate lang in Glycerin; die Bazillen waren hierdurch völlig avirulent geworden, doch es gingen Substanzen in das Glycerin über, mit welchen er Ziegen und Kaninchen unter hämorrhagischen Erscheinungen töten konnte.

Alle diese Forschungen beweisen also zur Genüge, dass auch in dem Milzbrandbazillus Giftsubstanzen vorhanden sein müssen und weisen besonders die Beobachtungen BODINS und MARMIER'S, die bei ihren Versuchstieren starke Abmagerung und Kachexie eintreten sahen, auf den Tod infolge einer Endotoxinvergiftung hin. Gifte, welche im stande waren ein dem Milzbrand einigermaßen ähnliches Krankheitsbild hervorzurufen, wurden von TRINCAS (38) nachgewiesen: Durch die Einwirkung von Leukozyten auf sporenfreie Milzbrandbazillen konnte er eine toxische, in Wasser lösliche und durch Birkefeld filtrierbare Substanz gewinnen, die bei Meerschweinchen, intravenös oder subkutan injiziert, ein an Milzbrand erinnerndes pathologisch-anatomisches Bild zum Vorschein brachte.

Dass übrigens der Milzbrandbazillus im Tierkörper Giftsubstanzen entwickeln muss, wird niemand, der Gelegenheit hatte an Milzbrand leidende Rinder zu beobachten, bezweifeln: Wie müsste denn wohl

sonst das sehr heftige Fieber, die ab und zu auftretende Excitation, der später eine heftige Depression und Sopor folgt, die sensibeln und motorischen Lähmungserscheinungen, oder in andern Fällen der perakute Verlauf, als aus einer starken Vergiftung zufolge Endotoxinenwirkung erklärt werden?

Bereits ROBERT KOCH (39) dachte, nach der Beobachtung eines Infektionsprozesses im Jahre 1876 an eine Vergiftung und gibt der Vermutung Ausdruck, dass der Milzbrandtod entweder durch die Kohlensäure-entwicklung im Blute, die zufolge des intensiven Bakterienwachstums hervorgerufen wird, oder, was ihm wahrscheinlicher erscheint, durch giftig wirkende Spaltungsprodukte der Eiweisskörper, deren nach der damals herrschenden Auffassung die Parasiten als Nahrung bedürfen sollten, herbeigeführt wird.

Auch MENDEZ (40) betrachtet bei der Milzbrandinfektion des Menschen die schwere Allgemeinerkrankung, die Cyanosis, die auftretenden Delirien und die Dyspnoe als Intoxikationserscheinungen. Behandelte er diese Patienten mit spezifischem Serum, so sah er, wie als erstes Resultat 12—24 Stunden nach der Injektion die Temperatur fiel und das allgemeine Wohlbefinden sich besserte, was laut der Endotoxinenlehre durch die Neutralisierung der in dem kranken Körper zirkulierenden, aufgelösten Giftsubstanzen zu erklären ist. Erst nach 2 Tagen sah er, wie die Ödeme verschwanden und mit der Drüsenschwellung war dies noch später der Fall.

Auch für das Entstehen der zuweilen sehr ausgedehnten Hämorrhagien und der Hämolyse, die das pathologisch-anatomische Krankheitsbild des Milzbrandes kennzeichnen, muss ganz entschieden die Wirkung eines Giftes angenommen werden, durch welche die Kapillarwandung lädiert und permeabel gemacht wird und das zugleich die Fähigkeit besitzt den Blutfarbstoff aus den Blutkörperchen zu entfernen; es ist doch schon sehr unwahrscheinlich, dass die Verstopfung der Kapillargefäße durch Bakterienanhäufungen die Ursache all dieser Erscheinungen sein sollte, wie von einzelnen Forschern angenommen wird.

Dass in der Tat Geweblutungen bei verschiedenen Infektionskrankheiten durch Bakteriengifte verursacht werden können, wird durch die Forschungen HEYROVSKYS (41) bestätigt.

Dürfen wir auf Grund obengenannter Forschungen annehmen, dass, kann man auch Versuchstiere durch abgetötete Bazillen oder verschiedene Filtrate nicht vergiften, doch der Milzbrandbazillus, was die Anwesenheit toxischer Bakteriensubstanzen betrifft, keine Ausnahme bildet, so liegt die Annahme nahe, dass auch dem Rotlaufbazillus Giftsubstanzen zukommen müssen. In der Tat wird diese Voraussetzung durch die

wenigen Experimente, welche zu diesem Zweck mit diesen Bakterien angestellt worden sind, noch wahrscheinlicher: Im Jahre 1894 teilte DONATH (42) auf dem Internationalen Medizinischen Kongress zu Rom mit, dass es ihm gelungen sei, aus wässrigen Milzextrakten der an Rotlauf eingegangener Schweine Substanzen zu gewinnen, welche bei Kaninchen eine Temperatursteigerung bis zu 41° C. verursachten, während Extrakte aus der Milz gesunder Schweine diese Substanzen nicht enthielten; diese Giftwirkung schrieb er Giftsubstanzen zu, obwohl er diese in künstlichen Nährböden nicht nachweisen konnte.

VOGES (43) injizierte Mäusen und Tauben mit thermisch abgetöteten Rotlaufbouillonkulturen, sogar bis zu Dosen von 200 resp. 60 ccm., jedoch ohne dass er irgend welchen Nachteil für diese Versuchstiere eintreten sah. Dieses negative Resultat schieb er dem Umstande zu, dass etwaige Gifte zu stark verdünnt waren, weshalb er seine Versuche mit dem Präzipitat aus dergleichen Kulturen wiederholte. Mit diesen Präzipitaten konnte er, nach der Abtötung auf 60° C., Mäuse töten, aber hierzu brauchte er die ganze Bazillenmenge aus 300 ccm. Bouillonkultur; die Giftigkeit war also, obwohl sie bestand, jedenfalls sehr gering.

NATUSCH (44) filtrierte 1—2 Tage alte Rotlaufbouillonkulturen und injizierte diese Filtrate Mäusen, ohne eine Giftwirkung hierdurch zu erzielen. *Dampfte er jedoch die Filtrate in dem Vakuumapparate bis auf $1/3$, $1/5$ und $1/17$ des ursprünglichen Volums ein, so ergab sich, dass diese nach einer subkutanen und intraperitonealen Impfung Giftsubstanzen enthielten, welche in den meisten Fällen Mäuse zu töten imstande waren.* Bei Kontrollversuchen mit eingedampfter steriler Bouillon blieben die Versuchstiere gesund; *er nimmt daher an, dass der Rotlaufbazillus echte Toxine bildet*, in welcher Ansicht er besonders dadurch verstärkt wird, dass diese Giftsubstanzen bereits in 1—2 Tage alten Kulturen, in denen doch noch fast keine zerfallenen Bakterien vorkommen, vorhanden sind.

Aus angestellten eigenen Untersuchungen wird hervorgehen, dass der Rotlaufbazillus tatsächlich Giftsubstanzen, welche sich aussen an der Zellwand befinden und aller Wahrscheinlichkeit nach in die Kulturbouillon übergehen können, bilden muss.

Doch nicht nur diese Laboratoriumversuche, sondern auch die Praxis lehrt, ebenso wie dies bei dem Milzbrand der Fall ist, in überzeugender Weise, dass bei dem Schweinerotlauf toxische Substanzen zur Wirkung gelangen, denen die schweren Vergiftungserscheinungen bei dem klinischen Krankheitsbilde zuzuschreiben sind. Betrachten wir nun, was die Handbücher von FRIEDBERGER und FRÖHNER (45), von HUTYRA und MAREK (46) hierüber mitteilen, so sehen wir dass beide einstimmig das hohe Fieber, bis zu 43° C., die sehr heftigen

nervösen Störungen, die grosse Mattkeit und Sopor, die eintretende Lähmung des hinteren Körperteiles und schliesslich den Tod, auf Toxinwirkung zurückführen. Ob jedoch die Ansicht HUTYRA und MAREKS, dass es noch nicht gelungen sei weder in Kadavern eingegangener Tiere noch in Kulturen toxische Substanzen nachzuweisen, in diesem Augenblick als richtig zu erachten ist, darf ganz gewiss in Zweifel gezogen werden.

Auch die pathologische Anatomie des Rotfaufs liefert, ebenso wie bei dem Milzbrand, den Beweis einer Giftwirkung, da bei dieser Krankheit gleichfalls zahlreiche Hämorrhagien beobachtet werden können, welche nach POELS (47), der ausgedehnte Forschungen mit Rotlauf durchführte, zufolge Alterationen in der Wandung der kapillaren Blutgefässe infolge der Einwirkung toxischer Substanzen, entstehen, während bei dem Rotlauf erlegenen Schweinen, wie bei Milzbrandkadavern, die Trennung des Blutfarbstoffes von den Blutkörperchen, sogenannte Hämolyse, eine konstante Erscheinung ist.

EIGENE VERSUCHE.

Um die Frage, ob bei dem Rotlaufbazillus in der Tat Giftsubstanzen vorkommen, beantworten zu können, war vollständigshalber die Notwendigkeit geboten, diese Untersuchung nach drei Richtungen auszudehnen.

Erstens müsste nachzuweisen versucht werden, dass dieses Bakterium im Tierkörper endotoxische Effekte, im Sinne PFEIFFERS, zeigt. In zweiter Linie musste, im Zusammenhang mit den Versuchen NATUSCHS, nachgeforscht werden, ob für genannte Mikroorganismen auch extrazelluläre Giftsubstanzen, also gleichsam echte Toxine, anzunehmen sind, während endlich, sollten diese Resultate positiv ausfallen, versucht werden musste, diese Giftsubstanzen durch Einwirkung chemischer Mittel aus den Bakterienkörpern heraus zu lösen, eventuell zu sammeln.

Bei meinen Versuchen zur Lösung der ersten Frage: Endotoxine nachzuweisen, war mein Bestreben vor allem darauf gerichtet, um zu versuchen, nach einer Injektion grösserer Dosen Rotlaufbazillen, hieraus durch gleichzeitige Injektion des bakteriolytischen Immunserums event. Endotoxine im Tierkörper in Freiheit zu setzen.

Als Versuchstiere wurden hierzu ausschliesslich Tauben benutzt, weil diese Tiere dem Rotlauf gegenüber ausserordentlich empfänglich sind.

Dass es in dieser Weise möglich sein würde, endotoxische Wirkung nachzuweisen, durfte vor allem daher erwartet werden, weil auch PFEIFFER, wie in der Einleitung mitgeteilt worden ist, der Wahrscheinlichkeit Ausdruck verleiht, dass durch Zusatz kleiner Mengen spezifischen Serums die toxische Wirksamkeit der Bakterien erhöht werden könnte.

Die zu diesem Zweck angestellten Untersuchungen teilte ich in 2 Hälften ein: Mit der Kontrolle, wurden den ersten 5

Tauben gleiche Dosen (2 ccm) eintägiger virulenter Rotlaufbouillonkultur, und absteigende Mengen spezifischen Serums injiziert. Die übrigen Versuche wurden angestellt, um zu entscheiden, ob PFEIFFERS »Gesetz der Multipla" beim Rotlauf zutrifft. Hierzu wurden mehrere Tauben gleichzeitig mit Serum und Kultur in gleichmässig ansteigenden Dosen, und zwar anfangend mit 1 Gramm Serum und 0.5 Gramm Kultur, behandelt. Sind in dem Rotlaufbazillus in der Tat intrazelluläre Giftsubstanzen vorhanden, so müssten zwar, wie aus der Einleitung bei PFEIFFERS Versuchen mit Cholera und Typhus folgt, durch grössere Serummengen grössere Endotoxinmengen ohne Nachteil vertragen werden, aber es müsste eine Giftdosengrenze geben, bei Überschreitung wovon selbst die grösste Serummenge nicht im Stande sein würde, die Gifte unwirksam zu machen; m.a.W. es müsste gelingen, in solchen Fällen bei den Versuchstieren endotoxische Vergiftungserscheinungen zu bewirken. Allen Tauben wurde das Serum und die Kultur, getrennt, in die Brustmuskeln injiziert. Nach dem Tode des Versuchstieres wurde die Leber und das Blut stets auf das Vorhandensein von Rotlaufbazillen kulturell und mikroskopisch untersucht.

Der Verlauf dieser Injektionen war folgender:

Kontrolltaube: 0,1 g Kultur; an Rotlauf eingegangen nach $3\frac{1}{2}$ Tagen.

Taube 81: 4 „ Serum und 2 g Kultur

„ 82: 3 „ „ „ 2 „ „

„ 36: 2 „ „ „ 2 „ „

„ 28: 1 „ „ „ 2 „ „

„ 4: 0,5 „ „ „ 2 „ „

Taube 78: 1 g Serum und 0,5 g Kultur

„ 92: 3 „ „ „ 1,5 „ „

„ 49: 6 „ „ „ 3 „ „ kachektisch eingegangen
nach 13 Tagen; kein
Rotlauf.

„ 84: 8 „ „ „ 4 „ „

„ 85: 10 „ „ „ 5 „ „

„ 97: 12 „ „ „ 6 „ „

Von welcher ausgezeichneten Beschaffenheit das von mir benutzte Serum war, geht aus der Tatsache hervor, dass alle 5 Tauben der ersten Serie 14 Tage nach der Injektion noch am Leben

waren: 0.5 g desselben waren noch imstande gewesen, die Bazillen aus 2 g virulenter Bouillonkultur zu töten.

Von der zweiten Gruppe von Tauben ist nur eine, Nr. 49, eingegangen, welche *nach 13 Tagen sehr abgemagert und kachektisch zugrunde ging*. Die inneren Organe waren parenchymatös degeneriert und enthielten *keine Rotlaufbazillen*; *Rotlauf als Todesursache musste daher ausgeschlossen werden*.

Vierzehn Tage nach der Injektion wurden durch Versehen eines Angestellten die einzelnen Nummer von den Tauben entfernt, sodass hierdurch nicht mehr festgestellt werden konnte, mit welchen Dosen Serum und Kultur jede ins besondere behandelt worden war. Als an jenem Tage diese Versuchstiere das Institut verliessen, fiel es mir auf, dass mehrere sehr abgemagert waren; ich bin daher überzeugt, auch im Zusammenhang mit späteren Untersuchungen, dass später von diesen abgemagerten Tauben noch wohl einige unter denselben Erscheinungen wie Taube Nr. 49, eingingen.

Bei der Wiederholung dieser Versuche erschien es mir wünschenswert, die Dosen der Kultur grösser zu nehmen, weil hierdurch mehr Giftsubstanzen in Freiheit gesetzt werden könnten; auch wurden, anstatt wie das erste Mal gleiche Mengen Kultur und absteigende Dosen Serum anzuwenden, nun gleiche Dosen Serum doch ansteigende Mengen Kultur benutzt.

Die Injektionen mit gleichmässig ansteigenden Dosen Serum und Kultur begannen diesmal mit einer Anfangsdosis von 6 g Serum und 3 g Kultur.

Die benutzte Rotlaufbouillonkultur war wiederum ein Tag alt, und auch diesmal wurde das Serum und die Kultur, jede für sich, in die Brustmuskeln injiziert.

Zur besseren Kontrolle des Gewichtsverlustes wurden die Tauben vor der Injektion gewogen.

Das Resultat war folgendes:

Kontrolltaube 0,1 g Kultur: an Rotlauf eingegangen nach 3 Tagen.

Nummer der Tauben.	Behandelt mit	Gewicht vor der Injektion.	Gewicht nach dem Tod.	Gewichtsverlust.	Eintritt des Todes nach Injektion.	Gewicht nach 8 Wochen.	Bemerkungen.
36	1 g Serum 3 g Kultur	270 g	—	—	—	243 g	Nicht nennenswert abgemagert.
92	1 g Serum 4 g Kultur	262 g	—	—	—	335 g	Zugenommen.
22	1 g Serum 6 g Kultur	323 g	119 g	124 g	15 Tage	—	Sehr stark abgemagert; kachektisch eingegangen, doch nicht an Rotlauf.
78	6 g Serum 8 g Kultur	366 g	351 g	15 g	3 Tage	—	An Rotlauf ohne Gewichtsverlust eingegangen.
98	6 g Serum 3 g Kultur	365 g	214 g	151 g	46 Tage	—	Sehr stark abgemagert, kachektisch eingegangen, doch nicht an Rotlauf.
75	8 g Serum 4 g Kultur	375 g	233 g	142 g	15 Tage	—	Wie beim Taube N ^o . 98.
44	10 g Serum 5 g Kultur	438 g	—	—	—	397 g	Etwas abgemagert, übrigens gesund.
Kontrolltaube	10 g Serum 5 g Steriler Bouillon	310 g	—	—	—	391 g	Zugenommen.

Diese Versuche zeigen, dass ausser der Kontrolltaube, nur N^o. 78 an Rotlauf eingegangen ist; hierbei war offenbar die eingeführte Dosis Bazillen zu gross, um durch die geringe Menge spezifischen Serums abgetötet zu werden; es ergibt sich gleichzeitig hieraus, dass bei dem durch Rotlauf verursachten Tode keine Abmagerung und kein Gewichtsverlust von einiger Bedeutung in den Vordergrund tritt. Von den übrigen Tauben,

denen Serum und Kultur injiziert wurden, sind die No. 22, 98 und 75, also die Hälfte, unter sehr starken Abmagerungs- und Kachexie-erscheinungen zugrunde gegangen; von welcher Bedeutung der hierbei eintretende Gewichtsverlust war, springt deutlich in die Augen, wenn man die einzelnen Gewichtszahlen mit einander vergleicht. Die inneren Organe und das Blut dieser Tauben enthielten weder kulturell noch mikroskopisch Rotlaufbazillen; durch Rotlauf war demnach der Tod nicht herbeigeführt worden. Andere zur Kachexie führende Krankheiten, wie zum Beispiel Tuberkulose, konnten ebenso wenig wie bei der, bei dem ersten Versuche eingegangenen Taube 49, nachgewiesen werden.

Auf Grund dieser Beobachtungen darf meiner Ansicht nach als feststehend angenommen werden, dass es in vielen Fällen gelingt, Tauben bei der Anwendung grösserer Dosen Kultur und hinreichender Mengen Serum (um die darin enthaltenen Rotlaufbazillen aufzulösen) an Endotoxinvergiftung eingehen zu lassen.

Sind doch gerade der starke Gewichtsverlust und die Kachexie die Erscheinungen, welche von allen Forschern als die charakteristischsten für den durch Endotoxin verursachten Tod betrachtet werden. Dass die Seruminjektion mit der gleichzeitigen Injektion steriler Bouillon an sich unschädlich war und die beobachteten Erscheinungen nicht hervorrief, wurde durch die Kontrolltaube bewiesen, welche trotz dieser Behandlung ziemlich bedeutend an Gewicht zunahm.

Gleichfalls geht aus diesen Forschungen hervor, dass der Tod durch Endotoxin zu sehr verschiedenen Zeitpunkten nach der Bakterieninjektion eintreten kam:

Erfolgte dieser bei 3 Tauben nach 13 und 15 Tagen, bei No. 98 trat er erst 46 Tage danach ein. Diese Tatsachen müssen meines Erachtens, ebenso wie die Beobachtung dass die Nrn 36, 92 und 44 geringe oder keine Endotoxinwirkung zeigten, hauptsächlich dem Unterschied in der Empfänglichkeit zugeschrieben werden, welcher Unterschied nach den Forschungen STICKDORNS (48) bei Tauben ziemlich gross zu sein scheint. Auch ist es nicht unmöglich, dass die beträchtlich spät auftretende Vergiftung in der langsamen Zerstörung und dem langsamen Abbau der Rotlaufbazillen zu suchen ist; dass solches

bei diesen Mikroorganismen sehr langsam stattfindet, wenigstens im Körper der Schweine, wird durch die Versuche VOGES und SCHÜTZ (49) bestätigt.

Nachdem endotoxische Substanzen für den Rotlaufbazillus nachgewiesen worden waren, wurde in dem zweiten Teile meiner Forschungen versucht, die Frage zur Entscheidung zu bringen, ob ausser diesen Giftsubstanzen auch noch andre vorkommen, welche sich nicht in, sondern ausserhalb der Zellwandung der Bakterien befänden und mit dieser mehr oder weniger fest verbunden wären. Ist das der Fall, wie NATUSCH auf Grund seiner erwähnten Experimente vermutet, so könnte es vielleicht gelingen, die Bazillen durch wiederholtes Abwaschen von diesen Toxinen zu befreien und dadurch deren schädigenden Einfluss abzuschwächen.

Was die Methode betrifft, um von den Bakterien durch abwaschen die Toxine zu entfernen, in der Literatur finden wir hierüber nur eine ausführliche Mitteilung, nämlich von VAILLARD und VINCENT (50), welche diese bei Tetanussporen, Sporen eines echten toxinbildenden Mikroorganismus also, anwandten. Sie stellten fest dass wenn sie diese Sporen einer übermässigen und schnellen Abwaschung mit sterilisiertem Wasser unterzogen, mit ihnen kein Tetanus mehr erzeugt werden konnte, obwohl die Lebensfähigkeit der Sporen durch diese Behandlung nicht gelitten hatte.

Injizierten sie bei Versuchstieren abgewaschene Sporen, so beobachteten sie dass sehr reichlich Leukozyten auftraten, von denen einige eine oder mehr Sporen einverleibt hatten. In kurzer Zeit nahmen die Sporen, was Färbung und Volum betrifft, ab und begannen zu zerfallen, indem nach 5—6 Stunden sämtliche Sporen verschwunden waren. Dies kontrollierten sie, indem sie mit Sporen getränkte Wattepfropfen unter die Haut der Meerschweinchen einführten und diese zu bestimmten Zeiten untersuchten; bei späteren Versuchen wurden hierzu Kapillarröhrchen benutzt.

Führten sie mit den abgewaschenen Sporen Milchsäure- oder andere Bazillen, zum Beispiel *Bac. prodigiosus*, ein, so wurden die weissen Blutkörperchen in richtiger Entfernung gehalten, bzw. von andern Bazillen in Anspruch genommen. Die Folge war in beiden Fällen, dass die abgewaschenen Sporen vor den

Angriff der Leukozyten geschützt wurden und sich entwickeln konnten.

Wurden die Sporen mit ihren Toxinen eingeführt, so traten nur sehr wenig Leukozyten auf und es wurden diese durch die negativ chemotaktische Wirkung der Toxine in einer gewissen Entfernung gehalten. Zeigten sie durch diese Versuche, dass die von Toxinen befreiten Sporen durch die Abwehrmittel des normalen Organismus unschädlich gemacht wurden, so stellten sie auch fest, dass eine Grenze hierfür besteht: *Wenn sie ausserordentlich grosse Mengen abgewaschener Sporen bei Meer-schweinchen einführten, so war konstant der Tod durch Tetanus die Folge.*

Bei den eigenen Forschungen wurde mit dem Abwaschen folgendermassen verfahren ¹⁾:

Rotlaufbouillonkulturen wurden eine Viertelstunde lang mit etwa 3000—4000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Hierauf wurde die klar gewordene Bouillon vorsichtig abgehoben und das Präzipitat, das fast alle Bazillen enthielt, durch Schütteln in einer gleichen Menge des Abwaschmittels verteilt, als die ursprünglich zentrifugierte Bouillonkultur betrug. Weiter wurde aufs neue zentrifugiert, worauf die präzipitierten Bazillen als einmal abgewaschen betrachtet wurden.

Wenn nun nach dem Abheben der Flüssigkeit jenes Präzipitat wiederum mit einer gleichen Menge Abwaschmittel geschüttelt und hierauf zentrifugiert worden war, so waren die Bakterien zweimal abgewaschen u. s. w.

Die abgewaschenen Bazillen wurden bei jeder Injektion, nachdem die klare Flüssigkeit in der diese präzipitiert worden waren entfernt worden war, mit einer gleichen Menge des Abwaschmittels, die der ursprünglichen Menge Bouillonkultur entsprach, gemischt, und dann wurde von dieser Flüssigkeit die festgesetzte Dosis, zum Beispiel 0.1 g, injiziert. Hierdurch wurde erzielt, dass stets mit einer gleichen Menge Flüssigkeit ungefähr eine gleiche Dosis Bazillen eingeführt wurde.

¹⁾ Weil die Wahrscheinlichkeit vorlag, dass bei dieser Behandlung die Flüssigkeit keine Substanzen aus dem lebenden Plasma des Bakteriums, sondern nur die Stoffe aufnehme, welche aussen an der Bakterienwand anhaften nebst den, welche innerhalb der Wandsubstanz imbibiert sich vorfinden, nenne ich diese Behandlung hier stets: »Abwaschen«.

Abgewaschen wurden die Bazillen aus 24-stündiger Rotlaufbouillonkultur. Als Abwaschmittel wurde 0,9 prozentige physiologische Kochsalzlösung benutzt. Die Injektionen erfolgten stets in die Brustmuskulatur.

Nachstehende Tabelle gibt das Resultat dieser Untersuchung an:

Kontrolltaube	0,1 g Kultur;	nach 3 Tagen an Rotlauf	eingegangen.
Taube Nr. 5	0,1 „	erste Abwaschung;	nach 4 Tagen an Rotlauf [eingegangen.
„ „ 2	0,1 „	zweite „	; gesund geblieben.
„ „ 17	0,1 „	dritte „	; „ „
„ „ 29	0,1 „	vierte „	; „ „
„ „ 35	0,1 „	fünfte „	; „ „

Ausser der Kontrolltaube ist nur eine, die mit einmal abgewaschener Kultur behandelte Taube, eingegangen, und hatte die Virulenz derselben, wie sich aus dem späteren Eintritt des Todes ergibt, durch jenes Abwaschen bereits abgenommen. Die übrigen Tauben waren drei Wochen nach der Injektion noch völlig gesund, sodass *die Rotlaufbazillen bei diesem Versuche nach zweimaliger Abwaschung ihre infizierende Fähigkeit eingebüsst hatten.*

Dieses Ergebnis stimmte daher mit den von VAILLARD und VINCENT mit Tetanussporen erzielten Resultaten sehr viel überein; hatten diese die Sporen durch abwaschen von den Toxinen befreit, auch von den Rotlaufbazillen war etwas abgewaschen worden, was diese gegen die Abwehrmittel des Organismus schützt, sodass die Annahme nicht gewagt schien, dass auch in diesem Fall Giftsubstanzen von den Rotlaufbazillen abgewaschen worden waren. Wäre diese Auffassung richtig, so könnte es vielleicht gelingen, diese Giftsubstanzen in der Kulturbouillon oder in der Kochsalzlösung, mit der Bazillen zum ersten Mal abgewaschen worden waren, nachzuweisen, indem man diese Flüssigkeiten, nach der Filtrierung durch CHAMBERLAND-bougie, bei Tauben injiziert.

Der folgende Versuch, über den die nachstehende Tabelle eine Übersicht gibt, wurde daher etwas ausgedehnt.

Abgewaschen wurden die Bazillen aus 2-tägiger Bouillonkultur und als Abwaschmittel wurde wiederum 0,9 prozentige physiologische Kochsalzlösung benutzt:

Kontrolltaube: 0,1 g Kultur; nach 3 Tagen an Rotlauf eingegangen.

Taube Nr. 5: 0,1 „ erste Abwaschung; gesund geblieben.

„	„	31: 0,1 „	zweite	„	;	„	„	
„	„	88: 0,1 „	dritte	„	;	„	„	
„	„	89: 0,1 „	vierte	„	;	„	„	
„	„	98: 0,1 „	vierte	„	;	zusammen		
			mit 1 g des Abwaschmittels, in dem die Bazillen zum ersten Male abgewaschen worden sind, injiziert				gesund geblieben.	
„	„	58: 1 g	des Abwaschmittels, in dem die Bazillen zum ersten Male abgewaschen worden sind, filtriert, also ohne Bazillen				„	„
„	„	93: 1 g	filtrierte Bouillon aus zweitägiger Bouillonkultur;				„	„
„	„	90: 1 g	filtrierte Bouillon aus sechstägiger Bouillonkultur;				„	„

Sämtliche mit abgewaschenen Kulturen behandelten Tauben blieben gesund; *bereits nach einmaliger Abwaschung hatten die Rotlaufbazillen also diesmal ihre pathogene Wirkung eingebüsst.* Der Taube 98 wurden abgewaschene Bazillen injiziert, die mit 1 g der durch CHAMBERLAND-bougie filtrierten Flüssigkeit, in der sie zum ersten Male abgewaschen worden waren und in der event. abgewaschene Giftsubstanzen vielleicht vorhanden waren, gemischt worden waren; diese würden die Bakterienwirkung unterstützen und so vielleicht den Tod durch Rotlauf herbeiführen können.

Erwähnte Taube blieb am Leben, wie auch Taube Nr. 58, der 1 g derselben Flüssigkeit, nun jedoch ohne abgewaschene Bazillen, injiziert wurde.

Ferner wurde die Bouillon aus zwei- und aus sechstägigen Rotlaufkulturen durch CHAMBERLAND-bougie filtriert und 1 g dieser keimfreien Filtrate der Taube No. 93 resp. 90 injiziert, um, falls äusserliche Bakteriengiftsubstanzen in die Kultur übergingen, zu versuchen hiermit Krankheitserscheinungen hervorzurufen; diese blieben jedoch aus. Fünf Wochen nach der Injektion wurden die Tauben der Beobachtung enthoben. Durch diese Methode konnte also weder in dem Abwaschmittel, noch in

der Kulturbouillon, durch Injektion bei Versuchstieren Giftsubstanzen nachgewiesen werden.

Später ist dieser Versuch wiederholt worden und wurden einer Taube 15 g durch CHAMBERLAND-bougie filtrierte, aus während 7 Tage bei 37° C. gewachsener Rotlaufkultur herführende, Kulturbouillon injiziert. Obwohl diese ältere Kultur mehr Giftsubstanzen als die früher angewandte jüngere Kultur enthalten musste, wenn diese Substanzen in die Bouillon übergingen blieb die in dieser Weise behandelte Taube, trotz der grossen Dosis, während einer 3 Wochen dauernden Beobachtungszeit, völlig gesund.

Die Versuche NATUSCHS (44) waren mir zur Zeit dieser Forschungen noch nicht bekannt; wäre dies der Fall gewesen, so hätte mir damals eingeleuchtet, dass die Aussicht, auf diese Weise eine toxische Wirkung zu erzielen, äusserst gering war. NATUSCH wies nämlich nach, dass in der durch CHAMBERLAND-bougie filtrierten Rotlaufkulturbouillon tatsächlich Giftsubstanzen vorkommen, die jedoch zu sehr verdünnt sind, um bei Versuchstieren eine Giftwirkung ausüben zu können. Erst wenn er diese Bouillon eindampfte, konnte er Versuchstiere mit derselben töten.

Es musste also auf andere Weise als mit einfachen Kulturfiltraten experimentiert werden.

Eine Giftwirkung nachzuweisen wurde nun versucht, indem einer Serie Taube grosse Dosen Bakterien nicht nur in die Brustmuskeln, sondern auch intraperitoneal injiziert wurde, um hierdurch eine raschere Resorption event. eine schnellere Vergiftung zu stande bringen zu können.

Das Resultat war folgendes:

Die angewendete Kultur war 2 Tage alt.

Kontrolltaube:	0,1 g Kultur in die Brustmuskeln;	nach 2 1/2 Tagen an	
			[Rotlauf eingegangen.
Taube 38:	1,— » » » » »	nach 5 Tagen an Rot-	
			[lauf eingegangen.
» 29:	2,— » » » » »	nach 2 1/2 Tagen an	
			[Rotlauf eingegangen.
» 75:	0,5 » Kultur intraperitoneal;	nach 2 Tagen an Rotlauf ein-	
			[gegangen.
» 1:	1,— » » » » »	; nach 2 1/2 Tagen eingegangen.	
» 25:	2,— » » » » »	; » 2 1/2 » » »	

Aus diesem Versuche folgt also, dass der Verlauf der Infektion durch eine Injektion sehr grosser Dosen unbedeutend verkürzt wird, gleichgültig, ob diese in die Brustmuskel oder intraperitoneal erfolgt. Auch springt die auffällig geringe Empfänglichkeit der Taube 38, welche durch 1 g virulenter Rotlaufkultur erst nach 5 Tagen getötet wurde, in die Augen.

Konnte aber durch die grössere Bakterienmenge der Tod nicht beschleunigt werden, so wurde doch wirklich beobachtet, dass, wie auch POELS (47) in seinem Standardwerke angibt, nach der Impfung mit grossen Kulturmengen die Versuchstiere fast unmittelbar nach der Injektion Krankheitserscheinungen zeigten, welche von POELS einer Resorption der in der Bouillonkultur vorhandenen toxischen Substanzen zugeschrieben werden: Kurze Zeit nach der Injektion waren die Tauben weniger munter, sassen gewöhnlich mit gestäubten Federn und eingezogenem Kopf in der Ecke des Käfigs; waren gewöhnliche Dosen eingepfht worden, so zeigten die Versuchstiere nach 24—36 Stunden äusserlich wenig Veränderung; erst nach dieser Zeit wurden sie lustlos und zeigten dieselben Erscheinungen.

Durch diese Versuche wurden also die Beobachtungen POELS vollkommen bestätigt; später konnte gleichfalls gezeigt werden, dass auch seine Ansicht: dass bei Rotlauf Giftsubstanzen, welche nicht von dem Bakterienzerfall herrühren, in die Kulturbouillon übergehen, einen höheren Grad der Wahrscheinlichkeit hat.

Als nämlich meine Versuche beinahe beendet waren, erachtete es Professor POELS im Zusammenhang hiermit wünschenswert zu prüfen, ob Immuserum bereitet werden könnte, indem man Pferden nicht, wie gewöhnlich, Rotlaufbouillonkultur, sondern die in Bouillonkultur enthaltenen Substanzen getrennt: die vermittelst der Zentrifuge präzipitierten Bazillen einer- und die hierdurch gewonnene klare Kulturbouillon andererseits injizierte.

Gelänge dies, so würde die Lösung der Giftfrage für den Rotlaufbazillus ganz sicher bedeutend nähergerückt werden.

Zu meinem Bedauern war es mir nicht möglich solange in dem Seruminstitut zu verweilen, bis die Pferde hinreichend vorbereitet waren, um eine günstige Serumwirkung erwarten zu können (gewöhnlich erfordert dies mit Bouillonkultur ungefähr 2 Monate).

Ich hatte jedoch die Gelegenheit die ersten Injektionen zu

diesem Zweck beizuwohnen und konnte hierbei bereits sofort die merkwürdige Tatsache konstatieren, dass die klare Kulturbouillon ohne Bazillen bei den Pferden ungefähr eine gleiche Reaktion wie die Bazillen ohne die Bouillon, in der sie gewachsen waren, erzeugte. Bekanntlich reagieren die für die Gewinnung von Rotlaufserum in Vorbehandlung befindlichen Pferde auf jeder Kulturinjektion konstant mit Fiebererscheinungen und deren Folgen.

Es wurde 48-stündige bei Bruttemperatur gewachsene Rotlaufkultur, in der vor der Hand noch wenig aufgelöste Bakteriengiftsubstanzen vorkommen konnten, benutzt. Diese Kultur wurde zentrifugiert und von der klaren Bouillon bestimmte Dosen bei 2 Pferden intravenös injiziert. Die präzipitierten Bazillen wurden in einer der zentrifugierten Kultur gleich grossen Menge steriler Bouillon verteilt; von dieser Flüssigkeit wurden 2 andern Pferden gleich grosse Dosen intravenös eingeführt. Zur Kontrolle wurden zugleich 2 Pferde mit gleich grossen Dosen steriler Rinderbouillon derselben Zusammensetzung als die, in der die Rotlaufkultur angelegt worden war, intravenös behandelt.

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über den Verlauf dieser Injektionen:

13 Oktober, nachmittags um 4 Uhr.

Pferd	Behandelt mit:	Bemerkungen.
N ^o . 56	100 g Kulturbouillon	Abendfutter verweigert
» 58	100 » »	» »
» 59	Bazillen aus 100 g Kultur	Keine Reaktion.
» 60	» » 100 » »	» »
» 159	100 g steriler Rinderbouillon	Keine Reaktion.
» 549	100 » » »	» »

Bei den folgenden Injektionen wurde, weil zufolge der Kulturbouillon die Pferde reagiert hatten, diese Reaktion durch Messung der Körpertemperatur kontrolliert:

20 Oktober, nachmittags um 5 Uhr.

Pferd	Behandelt mit:	Temperatur während und nach der Injektion					Temperatursteigerung.	
		während der Inj.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.		5 St.
N°. 56	300 g Kulturbouillon	37.°4 C.	38.1	38.8	39.3	39.4	39.8	2.°4 C.
» 58	300 » »	37.°8	37.9	39.2	39.8	39.8	39.8	2.° C.
» 59	Bazillen aus 300 g Kultur	37.°6	37.6	39.0	39.9	40.0	40.0	2.°4 C.
» 60	Wegen einer Infektion am Halse nicht injiziert.							
» 159	300 g Rinderbouillon	37.°9	37.9	37.8	37.9	38.0	37.9	0.°1 C.
» 549	300 » »	37.°8	37.8	37.7	38.5	38.8	38.8	1.° C.

Das Ergebnis dieser ersten Injektionen bestärkt also bereits in hohem Grade die Vermutung, dass auch in der Kulturbouillon fiebererregende giftige Substanzen vorkommen, da hierbei, ebenso wie nach einer Injektion der präzipitierten Bazillen, eine ziemlich bedeutende Reaktion eintrat, welche in beiden Fällen die Körpertemperatur bis zu 2° C. und höher steigerte, während von den Kontrollpferden nur eins eine beträchtlich geringe Temperatursteigerung von 1° C. zeigte.

Wie gesagt, muss abgewartet werden inwieweit es gelingen wird von diesen mit Kulturbouillon vorbehandelten Pferden ein wirksames Rotlaufserum zu gewinnen.

Dass die Rotlaufbazillen durch Abwaschung nicht abgetötet, sondern nur abgeschwächt wurden, konnte kulturell nachgewiesen werden. Wurden nämlich von ihnen Bouillon-, Gelatine- oder Agarkulturen angelegt, so gingen alle gleich gut auf, gleichgültig ob die Bakterien 1, 2, 3, 4 oder 5 mal abgewaschen worden waren. Auch stellte sich die Pathogenität in den Kulturen bald wieder ein, so dass mit 0,1 g. zweitägiger, bei 37° C. gewachsener, aus fünfmal abgewaschenen Rotlaufbazillen angelegter Bouillon, eine Taube innerhalb drei Tagen getötet werden konnte.

Der Verlust an Giftsubstanzen infolge der Abwaschung wurde also in der Kultur wieder bald ausgeglichen.

Wurden die präzipitierten Bakterien nach jeder Abwaschung mikroskopisch untersucht, so ergab sich, dass die Farbstoffaufnahme durch diese Behandlung keineswegs gelitten hatte, im Gegenteil es hatte sogar den Anschein, als ob nach der Abwaschung die Bakterien mehr Farbstoff aufgenommen hätten; vielleicht ist dies daraus zu erklären, dass möglicherweise durch diese Behandlung die Bakterienwandung permeabler geworden war und dieses eine stärkere Farbstoffaufnahme zur Folge hatte. Es konnte diese Tatsache beobachtet werden, gleichgültig ob die Färbung mit unverdünntem und verdünntem Gentianaviolett-Anilinwasser, unverdünntem und verdünntem Karbolfuchsin oder mit Methylenblau erfolgte.

Für die Färbung nach GRAM zeigte sich eine Ausnahme weil die Intensität der Färbung nach der Abwaschung abnahm, obwohl auch nach 5-maligem Abwaschen die Bakterien noch gut Grampositiv waren.

Ergab sich aus den vorhergehenden Versuchen, dass die Rotlaufbazillen durch Abwaschen für Tauben in gewöhnlichen Dosen unschädlich gemacht wurden, so erschien es mir wünschenswert, zu untersuchen, ob auch grössere Mengen ohne Nachteil vertragen werden könnten.

Zu diesem Zweck wurde nachstehende Reihe Versuchstiere behandelt. Die benutzte Bouillonkultur war 24 Stunden alt und wurde wiederum mit 0,9 prozentiger physiologischer Kochsalzlösung abgewaschen.

Kontrolltaube : 0,1 g Kultur ; nach 3 Tagen an Rotlauf eingegangen.

Taube 96 : 0,1 » erste Abwaschung ; gesund geblieben.

» 86 : 0,1 » zweite » ; » »
 » 57 : 0,1 » dritte » ; » »
 » 95 : 1,0 » zweite » ; nach 18 Tagen stark abgemagert an Rotlauf eingegangen.

Das Ergebnis dieser Untersuchung stimmt auffällig mit der Beobachtung VAILLARD und VINCENTS mit Tetanussporen überein. Waren eingeführte abgewaschene Sporen für die Versuchstiere unschädlich, mit grossen Dosen konnten sie konstant den Tod an Tetanus herbeiführen. Dieselbe Tatsache sehen wir auch hier: obwohl die Rotlaufbazillen bereits nach einmaliger Abwaschung

in gewöhnlichen Dosen ihre Virulenz eingebüsst hatten, verursachte eine zehnfache Menge zweimal abgewaschener Bakterien den Tod des Versuchstieres an Rotlauf, welcher Tod sich zugleich durch das Auftreten einer sehr starken Abmagerung kennzeichnet. Zu meinem Bedauern kann ich dies nicht in Gewichtszahlen ausdrücken. Wie dieser Tod an Rotlauf nach 18 Tagen unter jenen Erscheinungen eingetreten ist, muss meiner Ansicht nach folgendermassen erklärt werden:

Von den eingeführten grossen Mengen abgewaschener Bakterien erlag ein grosser Teil den Abwehrmitteln des normalen Organismus; dass dies wirklich geschieht, beweist die Tatsache, dass gewöhnliche Dosen in gleicher Weise behandelte Bazillen unschädlich sind. Die hieraus frei werdenden intrazellulären Giftsubstanzen verursachen den grossen Gewichtsverlust (Endotoxinvergiftung). Nicht alle Bakterien konnten jedoch bei der bekannten langsamen Zerstörung der Rotlaufbazillen in hinreichend kurzer Zeit unschädlich gemacht werden, sodass die Übrigbleibenden Zeit fanden in dem Organismus ihre Virulenz zurückzuerhalten (*ihr extrazelluläres Gift neuzubilden*), wodurch sie in Stand gesetzt wurden, den durch Endotoxinvergiftung geschwächten Körper an Rotlauf zugrunde gehen zu lassen.

Durch dieses Resultat kann daher der Beweis der Existenz von Endotoxinen sowohl als von extrazellulären Giften als bestärkt angesehen werden.

Ein ähnliches Resultat wurde zufälligerweise nach der Injektion einer Taube mit 0,5 g. spezifischen Serums und 3 g. Rotlaufboillonkultur erzielt, mit der eine Kontrolltaube in 3 Tagen getötet wurde; das Serum und die Kultur wurden getrennt in einen Brustmuskel injiziert. Das Tier ging gleichfalls unter den Erscheinungen starker Abmagerung und Kachexie nach 10 Tagen an Rotlauf ein. *Auch hier muss meiner Ansicht nach wieder an eine Endotoxinvergiftung, nach der Auflösung eines gewissen Teiles der eingeführten Bakterien zufolge der Serumwirkung, gedacht werden, worauf die übrigen den Tod des vergifteten Tieres an Rotlauf verursachten.*

Bei diesen Versuchen fällt zugleich in die Augen, dass durch die Einführung einer kleinen Dosis spezifischen Serums und einer grossen Menge virulenter Bazillen dieselbe Wirkung, wie nach der Injektion einer grossen Dosis abgewaschener Bakterien

ohne Serum, erzielt wurde. Später wird sich die Gelegenheit bieten auf diese entsprechende Wirkung der Kultur und Serum einer- und abgewaschener Bazillen andererseits zurückzukommen.

Bisher erfolgte die Abwaschung stets mit 0,9 prozentiger physiologischer Kochsalzlösung; diese Flüssigkeit war absichtlich gewählt worden, weil erwartet werden durfte, dass sie die Bazillen möglichst wenig schädige. Nun erschien es mir wünschenswert als Abwaschmittel sterile Nährbouillon zu gebrauchen, um zu untersuchen ob auch hierdurch die Wirkung der Rotlaufbazillen abgeschwächt wurde.

Die Abwaschung erfolgte in der gleichen Weise wie früher für die physiologische Salzlösung angegeben worden ist.

Folgende Tabelle zeigt das Resultat der Injektionen, für welche 24-stündige, abgewaschene Bouillonkultur gebraucht wurde:

Kontrolltaube:	0,1 g Kultur;	nach 3 Tagen an Rotlauf eingegangen.
Taube 74:	0,1 g erste Abwaschung;	nach 3 Tagen an Rotlauf eingegangen.
» 76:	0,1 » zweite	» ; » 4 » » » »
» 89:	0,1 » dritte	» ; » 3 » » » »

Die Virulenz war also ungeschwächt erhalten geblieben, sodass man hieraus schliessen konnte, dass die Bouillon in diesem Falle von den Bakterien nichts abgewaschen hatte. Da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen war, dass irgend ein Zufall hierbei im Spiele war, beschloss ich diesen Versuch zu wiederholen und statt drei-, fünfmal abzuwaschen. Andererseits stieg die Vermutung auf, ob vielleicht in dem Kochsalzgehalt ein Unterschied bestanden haben könnte, der zu diesen abweichenden Resultaten führen konnte. Um dies zu entscheiden, wurde erst der Salzgehalt der zu der folgenden Abwaschung anzuwendenden Bouillon festgestellt, der 0,58 Prozent betrug. Ausser mit dieser Bouillon wurde nun im Zusammenhang damit dieselbe Kultur überdies mit 0,6 prozentiger physiologischer Kochsalzlösung und auch mit aqua destillata, in der also Kochsalz völlig fehlte, abgewaschen.

Wiederum wurde 24-stündige Rotlaufbouillonkultur abgewaschen.

Wie die Resultate dieser Abwaschungen ausfielen, folgt aus nachstehender Tabelle:

war von vornherein auch schwerlich anzunehmen, da doch von verschiedenen Forschern nachgewiesen worden ist, dass gerade der Rotlaufbazillus Kochsalz gegenüber so ungemein resistent ist.

FORSTER (51) bestreute Rotlaufreinkulturen auf festen Nährböden mit Kochsalz, sodass das in dem Nährmedium vorhandene Wasser hiermit übersättigt war und noch ungelöstes Salz die Kulturen bedeckte. Dessenungeachtet lebten die Bazillen wochenlang fort.

PETRI (52) beobachtete, dass Rotlaufbazillen in 24-prozentiger Kochsalzlösung nach 11 Tagen noch nicht abgetötet worden waren: in 14-prozentiger Lösung waren sie nach 26 Tagen noch lebensfähig und virulent. In gesalzenem Fleisch von Rotlaufschweinen hatte die Virulenz dieser Bakterien nach 30 Tagen noch nicht abgenommen.

SVENNEBY (53) packte Milzen und Nieren von Rotlaufschweinen in Kochsalz ein und konnte hierin bis 5 Wochen danach durch Impfung bei Mäusen virulente Bazillen nachweisen. Bei der Impfung nach 35 Tagen blieb die erste Maus am Leben; während dieser Zeit waren die Organe stark eingetrocknet, sodass sie sich völlig zerbröckeln liessen.

Kochsalz erweist sich also für Rotlaufbazillen als eine ganz harmlose Substanz.

Dass die Bouillon nicht, wie die physiologischen Kochsalzlösungen und das destillierte Wasser, die Giftsubstanzen dieser Bakterien abzuwaschen vermag, ist vielleicht darin zu suchen, dass die Bouillon dickflüssiger ist. Ist diese Ansicht richtig, so müssten die Bazillen nach dem Abwaschen mit Flüssigkeiten von ungefähr gleicher Beschaffenheit, wie zum Beispiel Öl, oder mit solchen von gleicher Viskosität, wie zum Beispiel Syr. simplex-lösungen, gleichfalls ihre Virulenz ungeschwächt behalten.

Derartige Kontrollabwaschungen sind von mir nicht vorgenommen worden, sodass augenblicklich nicht entschieden werden kann, ob diese Vermutung richtig sei.

Es besteht nämlich noch eine andere Möglichkeit: Nimmt doch Bouillon hinsichtlich der Bakterien im allgemeinen dadurch, dass sie wegen der gelösten Eiweissstoffe als eine sol-kolloide Flüssigkeit im Sinne GRAHAMS aufzufassen ist, eine besondere Stelle ein; durch diese Eigenschaft dringt sie nicht so leicht wie eine kristalloide Flüssigkeit, zum Beispiel physiologische

Kochsalzlösung, in die Bakterienwandung ein, aus welchem Grunde ihre Fähigkeit, etwas aus der Bakterienwand auszuwaschen, als viel geringer zu betrachten wäre.

Diese in der Bouillon gelösten Substanzen können vielmehr einen schützenden Einfluss auf die Bakterien im allgemeinen ausüben, was POELS (47) auch für den Rotlaufbazillus nachwies. Wenn POELS gleiche Mengen dieser Mikroorganismen zu einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und zu einem Tropfen Bouillon hinzufügte und beide Tropfen eintrocknen liess, so enthielt die eingetrocknete Bouillon noch lebende Rotlaufbazillen lange nachdem diese in der Kochsalzlösung abgetötet worden waren. Schliesslich starben auch die in der Bouillon getrockneten Bazillen ab, jedoch erst viel später.

Dies ist ganz bestimmt dem Umstande zuzuschreiben, dass Bouillonbestandteile, Eiweisstoffe u. s. w., auf den Rotlaufbazillus präzipitieren, welche an der Wandung eine schützende Schicht bilden und sie in dieser Weise längere Zeit gegen Austrocknen schützen.

Es könnte vielleicht auch sein, dass beim Abwaschen sich derartige Bouillonsubstanzen mehr oder weniger fest an den Bakterienkörpern haften und dadurch eine Abwaschung der Bakterienbestandteile behindern.

Nachdem die früheren Forschungen entscheidend bewiesen hatten, dass die Rotlaufbazillen durch Abwaschung derart abgeschwächt werden können, dass sie in gewöhnlichen Dosen für die Versuchstiere unschädlich geworden sind, war es wünschenswert zu untersuchen, welcher Prozess im Tierkörper stattfindet, nachdem diese abgewaschenen Bakterien eingeführt wurden. Zum Vergleich musste gleichfalls untersucht werden, wie virulente Bakterien sich verhalten, wenn sie, um die Versuchstiere vor einer Infektion zu behüten, mit einer genügenden Menge spezifischen Serums injiziert werden. In beiden Fällen ist jedoch dasselbe Resultat: das Gesundbleiben der Versuchstiere, erzielt worden, welches Resultat nur durch die Abtötung der eingeführten Bazillen zustande kommen kann. Ausser diesen vergleichenden Versuchen war es von Interesse gleichfalls zu untersuchen, was in dem Organismus vorgeht, wenn dieselben Versuchstieren mit tödlichen Dosen virulenter Rotlaufbazillen, ohne Serum, infiziert

werden. Weil doch in diesem Falle die Infektion fortschreitet, ist es selbstretend dass hierbei andere Vorgänge stattfinden müssen.

Als Versuchstiere wurden für diese Untersuchungen Kaninchen gewählt, weil diese dem Rotlauf gegenüber viel weniger empfänglich sind, nach KITT (54) häufig sogar unempfindlich; bei diesen Tieren konnte daher der Verlauf, wegen der langsameren Entwicklung des Infektionsprozesses, während längerer Zeit als bei Tauben beobachtet werden, da Tauben gewöhnlich 3 Tage nach der Impfung an Rotlauf zugrunde gehen.

Die behandelten Kaninchen wurden in 3 Gruppen, jede zu 4 Stück, geteilt; der ersten Gruppe wurde 1 g virulenter Rotlaufbouillonkultur (welche Kultur die Kontrolltaube nach einer Dosis von 0,1 g nach 2 $\frac{1}{2}$ Tagen tötete) intraperitoneal injiziert; bei der zweiten Gruppe wurde die gleiche Dosis dieser Kultur in derselben Weise eingeführt, doch waren diese Tiere 24 Stunden zuvor, durch eine subkutane Injektion von 5 g Rotlaufserum an der Innenseite des Schenkels, passiv immunisiert worden. Der letzten Gruppe wurde, gleichfalls in die Bauchhöhle, 1 g einer Suspension zweimal in 0,9 prozentiger physiologischer Kochsalzlösung abgewaschener Rotlaufbazillen, ohne Serum, injiziert.

Jeden Tag, zum erstenmal 24 Stunden nach den Bakterieninjektionen, wurde von jeder Gruppe ein Kaninchen getötet und untersucht; diese Untersuchung bestand in der Anfertigung mikroskopischer Präparate aus der Bauchhöhlenflüssigkeit, welche nach der Gramschen Methode gefärbt wurden, während aus dieser Flüssigkeit gleichfalls Kulturen in Bouillon, auf Agar und auf Gelatine angelegt wurden; auch aus Leber und Milz wurden diese Kulturen angelegt. Das Verhalten der unter diesen verschiedenen Umständen eingeführten Rotlaufbazillen konnte daher während 4 Tage beobachtet werden. Dieser Zeitraum wurde als hinreichend erachtet, da angenommen werden durfte, dass in dieser Zeit bei der Einführung von Serum und Kultur, oder zweimal abgewaschener Bakterien, die sich in nicht zu grossen Dosen für Tauben als unschädlich erwiesen hatten, der Vernichtungsprozess der injizierten Mikroorganismen beendet sei.

Nachstehende Übersicht gibt die hierbei erzielten Resultaten an:

1. *Mit virulenter Kultur behandelte Kaninchen.*

Nach 24 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch einzelne Rotlaufbazillen; ziemlich zahlreiche Leukozyten, von denen vereinzelte zerfallene Bazillen enthielten.

Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit gut gewachsen.

Leber und Milz normales Äussere; hieraus angelegte Kulturen nicht gewachsen.

Nach 48 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch einzelne Bazillen; Anzahl Leukozyten ungefähr wie nach 24 Stunden, weniger Phagocytose.

Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit gut aufgegangen.

Leber und Milz normales Äussere; kulturell keine Bazillen.

Nach 3 Tagen:

Bauchhöhle: Mikroskopisch Bazillen, mehr als nach 1 und 2 Tagen; weniger Leukozyten; sehr schwache Phagocytose.

Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit sehr gut gewachsen.

Leber und Milz geschwollen; angelegte Kulturen wenig gewachsen.

Nach 4 Tagen:

Bauchhöhle: Mikroskopisch Bazillen, ihre Anzahl ungefähr wie nach 3 Tagen; Peritoneum injiziert. Anzahl Leukozyten grösser als nach 3 Tagen, Phagocytose etwas stärker.

Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit gut gewachsen.

Leber und Milz stärker geschwollen; angelegte Kulturen gewachsen, obwohl nicht so stark wie nach der Organschwellung erwartet wurde.

Es fiel bei der Untersuchung der Bauchhöhlenflüssigkeit auf, dass im Verhältnis zu der Menge der eingeführten Bakterien, Rotlaufbazillen mikroskopisch nur sehr spärlich vorgefunden wurden; erst nach 3 Tagen nahm diese Anzahl in jenen Präparaten etwas zu. Auch bei Tauben, die nach intraperitonealer Infektion zu verschiedenen Zeiten untersucht wurden, schien es, als ob die Anzahl eingeführter Bazillen in der ersten Zeit abnähme; erst später, beträchtlich kurz vor dem Tode, konnte eine sehr starke Bakterienvermehrung in der Bauchhöhle und in den inneren Organen konstatiert werden.

Während der ganzen Beobachtungszeit fand eine schwache Phagocytose statt; einige der aufgetretenen Leukozyten enthielten zerfallene Rotlaufbazillen, welche sich nach der Färbung nach der Gramschen Methode meist als mehr oder weniger dunkelblaue Körner in den weissen Blutkörperchen kenntlich machten.

Dass die Körner als von zerfallenen Rotlaufbazillen herrührend erachtet werden müssen, ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Auch PAMPOUKIS (55) der an Rotlauf eingegangene Schweine untersuchte, fand diese Körner manchmal in weissen Blutkörperchen vor und betrachtete sie gleichfalls als von zu zerfallen beginnenden Rotlaufbazillen herrührend, während JAROTZKY (56) bei seinen Studien über Phagocytose, gleichfalls die violetten Punkte, welche er bei Rotlauf in den polynukleären Leukozyten wahrnahm, derselben Ursache zuschrieb.

Wie langsam die Verbreitung der Rotlaufbazillen bei dem Kaninchen stattfindet, geht aus der Beobachtung hervor, dass erst 3 Tage nach der Injektion in den inneren Organen Bazillen kulturell nachgewiesen werden konnten.

II. Mit Serum und Kultur behandelte Kaninchen.

Nach 24 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch *keine* Rotlaufbazillen, grosse Menge Leukozyten, welche fast alle zerfallene Bazillen aufgenommen hatten.

Aus der Bauchhöhlenflüssigkeit angelegte Kulturen nach 24 Stunden schwach gewachsen.

Leber und Milz normales Äussere; Kulturen hieraus nicht gewachsen.

Nach 48 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch keine Bazillen; Anzahl Leukozyten und Phagocytose wie nach 24 Stunden. Aus der Bauchhöhlenflüssigkeit angelegte Kulturen schwach gewachsen.

Leber und Milz normales Äussere; Kulturen hieraus nicht gewachsen.

Nach 3 Tagen:

Bauchhöhle: Mikroskopisch keine Bazillen; Anzahl Leukozyten abgenommen; keine blauen Körner mehr, doch in einigen Leukozyten nur noch farblose, stark lichtbrechende Körner vorhanden. Aus der Bauchhöhlenflüssigkeit angelegte Kulturen nicht mehr gewachsen.

Leber und Milz normales Aussehen; kulturell hieraus keine Bazillen gewachsen.

Nach 4 Tagen:

Bauchhöhle: Mikroskopisch noch kulturell in der Bauchhöhlenflüssigkeit Bazillen nachgewiesen. Phagocytose beendet, Anzahl Leukozyten bedeutend abgenommen.

Leber und Milz normales Aussehen; angelegte Kulturen nicht gewachsen.

III. Mit abgewaschenen Bazillen behandelte Kaninchen.

Nach 24 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch keine Rotlaufbazillen; sehr zahlreiche Leukozyten, starke Phagocytose. Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit nach 24 Stunden schwach gewachsen.

Leber und Milz normales Aussehen; kulturell keine Bazillen gefunden.

Nach 48 Stunden:

Bauchhöhle: Mikroskopisch keine Bazillen; Anzahl Leukozyten und Phagocytose etwas abgenommen. Kulturen aus der Bauchhöhlenflüssigkeit nicht gewachsen.

Leber und Milz normales Aussehen; in den Kulturen keine Bazillen gewachsen.

Nach 3 und nach 4 Tagen:

Bauchhöhle: Weder mikroskopisch noch kulturell in der Bauchhöhlenflüssigkeit Bazillen nachgewiesen. Anzahl Leukozyten bedeutend abgenommen; Phagocytose nicht mehr wahrgenommen.

Leber und Milz normales Aussehen; kulturell keine Bazillen gefunden.

Wenn wir die Resultate dieser vergleichenden Untersuchungen betrachten, so sehen wir, dass bei den mit Serum und Kultur sowohl als bei den mit abgewaschenen Bazillen injizierten Kaninchen, 24 Stunden nach der Injektion eine sehr grosse Anzahl Leukozyten aufgetreten ist, erheblich grösser als dies nach der Injektion virulenter Kulturen der Fall war. Die weissen Blutkörperchen enthielten, der grössten Mehrzahl nach, in verschiedenen Stadien des Zerfalls befindliche Rotlaufbazillen, z. w. von gleichsam unbeschädigten Bazillen bis zu stark lichtbrechenden Körnern.

Die Leukozytose trat daher erheblich stärker als nach einer Injektion virulenter Kultur in den Vordergrund, wo sie zwar auch bestand, doch prozentweise nur bis auf einen sehr kleinen Teil der weissen Blutkörperchen beschränkt blieb, während gleichzeitig das Vorhandensein lebender Bazillen stets nachgewiesen werden konnte.

Wurden 3 Tage nach der Kulturinjektion in den innern Organen Rotlaufbazillen angetroffen, bei einer Serum- und Kultur-, oder abgewaschener Kulturinjektion blieben diese, wie die kulturelle Untersuchung ergab, von einer Bakterieninvasion verschont; hieraus ist zu schliessen, dass in beiden Fällen alle

intraperitoneal eingeführte Bazillen an dortiger Stelle abgetötet wurden.

Jedoch abgesehen von den zerfallenen Mikroorganismen in den weissen Blutkörperchen wurden in einigen mikroskopischen Präparaten der Bauchhöhlenflüssigkeit, speziell der mit Serum und Kultur injizierten Kaninchen ausser den Leukozyten, dunkelgefärbte Körner angetroffen, welche Körner einen gewissen Grad von Gramfestigkeit behalten hatten. Farbstoffniederschlag ist als sehr unwahrscheinlich zu erachten, weshalb hierbei vielleicht an zufolge Bakterizidie zerfallene Rotlaufbazillen gedacht werden muss. Auch nach der Injektion der abgewaschenen Bazillen wurden diese Körner, obwohl weniger zahlreich, angetroffen, während sie in den Präparaten der Bauchhöhlenflüssigkeit der mit virulenter Kultur behandelten Kaninchen nicht nachgewiesen werden konnten.

Nach der mikroskopischen Beobachtung besteht also, was die Zerstörung der eingeführten Bazillen betrifft, ob diese mit Serum eingeführt wurden, oder ob sie vorher abgewaschen worden waren, eine grosse Übereinstimmung. Andererseits bestand in dem Abtötungsprozess geringer Unterschied; nämlich die Zeit der Abtötung war verschieden: Während bei der Einführung bei dem immunisierten Kaninchen 2 Tage nachher in der Bauchhöhle noch lebende Rotlaufbazillen vorhanden waren und nach 3 Tagen noch eine, obschon stark abgenommene, Leukozytose bestand, waren solche bei der Injektion abgewaschener Bakterien bereits nach 48 Stunden abgetötet und hatte die Aufnahme in die Leukozyten schon nach 3 Tagen völlig aufgehört.

Hieraus folgt also, dass die abgewaschenen Bakterien rascher unschädlich gemacht worden waren, als wenn die Abtötung mittels Immunserums erfolgt war.

Auch hier fällt der langsame Verlauf des Prozesses bei dem Kaninchen in die Augen; findet dieser doch bei andern Versuchstieren viel schneller statt: JAROTZKY (56) konstatierte dass, wenn er weissen Mäusen, die er zuvor passiv immunisiert hatte, Rotlaufbazillen injizierte, der ganze Prozess der Phagocytose bereits nach 44 Stunden vollständig beendet war, während dies bei Tauben, nach den Forschungen VOGES (43), schon nach 18 Stunden der Fall war.

Dass die abgewaschenen Bazillen im Tierkörper rascher als

die nicht abgewaschenen mit Hilfe der Serumwirkung zerstört werden, liegt vielleicht an dem eigentümlichen Bau des Rotlaufbazillus, dessen Protoplasma von einer sehr resistenten, wächsernen, schützenden Membran wie von einem Panzer umgeben ist. Wie bereits früher bei der Färbung der abgewaschenen Bakterien erwähnt worden ist, besteht die Wahrscheinlichkeit dass durch diese Behandlung die Bakterienwandung permeabler gemacht wird; durch diese veränderte Eigenschaft ist die Möglichkeit vorhanden, dass die Bakterien durch die bakteriziden Flüssigkeiten rascher angegriffen werden. Diese Annahme schliesst sich völlig der Ansicht VOGES und SCHUTZ (49) an, nach welcher der Tierkörper über bestimmte Mittel verfügt, um die Entpanzerung der Rotlaufbazillen hervorzurufen, wonach erst die Zerstörung des Bakteriumprotoplasmas zustande kommt.

Wird die Bakterienwandung durch das Abwaschen permeabler gemacht, so muss eine raschere Auflösung des Bazillus von selbst die Folge sein.

Fassen wir die Resultate der zweiten Hälfte meiner Forschungen zusammen, so folgt hieraus, dass der Rotlaufbazillus eine äusserliche Giftsubstanz bildet, welche mehr oder weniger fest mit der Bakterienwandung verbunden ist und durch Abwaschung, ebenso wie das Toxin der Tetanussporen, entfernt werden kann, während es sehr wahrscheinlich ist dass diese extrazellulären Giftsubstanzen, wie sich aus der Reaktion der Pferde ergibt, in die Kulturbouillon übergehen können.

Hämolsinbildung durch Rotlaufbazillen.

Wie am Schlusse der Einleitung mitgeteilt worden ist, kann in dem Tierkörper unter dem Einfluss der Rotlaufbazillen häufig eine Hämolyse beobachtet werden, welche auf der Bildung bestimmter Giftstoffe, Hämolsine genannt, beruhen muss. Ich hielt es für wünschenswert zu untersuchen, ob diese Hämolyse, ebenso wie für den Milzbrandbazillus, auch in vitro nachgewiesen werden könnte, speziell weil in der Literatur über diesen Punkt, insoweit sie den Rotlaufbazillus betrifft, überhaupt keine Mitteilungen angetroffen werden.

Was den Milzbrandbazillus betrifft, hat VON WUNSCHHEIM

(57) die Hämolyse in dem Tierkörper und im Reagenzglase untersucht und kam zu dem Resultat, dass das bei dieser Infektion den roten Blutkörperchen schädigende Agens, das Bakteriohämolsin, von den Bakterien nur im Tierkörper erzeugt wird und in vitro nicht nachgewiesen werden kann.

Jedoch kam nach ihm VON KROGH (58) zu einem entgegengesetzten Resultat. Dieser benutzte zu seinen Forschungen Agarplatten, denen er 10 Prozent defibriniertes Kaninchen-, Hammel- und Pferdeblut zusetzte, oder auch 5 Prozent der aus diesen Blutarten abgewaschenen Blutkörperchen, in welche Platten er mit der Platinnadel 15 verschiedene Milzbrandstämme impfte. Es stellte sich heraus, dass durch alle Stämme eine mehr oder weniger starke Hämolyse erzeugt wurde, welcher Blutfarbstoffaustritt etwas stärker war, wenn er defibriniertes Blut als wenn er abgewaschene Blutkörperchen den Agarplatten zugesetzt hatte.

Die auftretende Hämolyse machte sich dadurch kenntlich, dass nach 24—48 Stunden um die Milzbrandkolonien ein deutlicher durchsichtiger Hof entstand, der mit dem Koloniewachstum mehr und mehr vorgeschoben wurde.

Nach diesen günstigen Resultaten, welche VON KROGH mit dem Milzbrandbazillus erreichte, beschloss ich auch für den Rotlaufbazillus in derselben Weise mit Hilfe von Blutagarplatten zu experimentieren. Als Blutart wurde hierzu das Blut von Schweinen benutzt, eine Tierart also, bei welcher der Rotlaufbazillus imstande ist, in vivo Hämolyse zu erzeugen. Dem flüssigen Agar-Agar wurden 10 Prozent defibriniertes Schweineblut zugesetzt und dieses Gemisch in ein wenig vorgewärmte Petrischale gegossen, um eine zu schnelle Gerinnung vorzubeugen und also eine möglichst dünne Platte zu erzielen. Hatte doch VON KROGH wahrgenommen, dass bei dünneren Platten die Hämolyse früher auftrat und deutlicher sichtbar wurde. Auf diese Nährböden wurden an sechs verschiedene Stellen mittelst der Platinnadel aus 1—8-tägigen Strichagarkulturen herrührende Rotlaufbazillen durch einfaches Berühren der Platte geimpft. Diese verschieden alten Kulturen wurden benutzt, nachdem mir Professor POELS mitgeteilt hatte, dass bei einigen andern Bakterien, zum Beispiel bei Cholera vibrionen beobachtet worden sei, dass diese in der ersten Periode ihres Wachstums Hämolyse

herbeiführen können und nachher diese Fähigkeit zuweilen während einiger Zeit einbüßen, um sich danach wieder einzustellen.

Nach ein und zwei Tagen hatten sich gewöhnlich auf den Blutagarplatten ziemlich deutlich Kolonien entwickelt, doch blieb die rotbraune Farbe jener Platten über der gesamten Oberfläche gleich, und ein durchsichtiger Hof in der Umgebung der Kolonien, wie von KROGH bei Milzbrand beobachtete, war auch mit der Lupe nicht zu sehen.

Nach diesem mit Schweineblut erzielten negativen Resultate wurden die Forschungen mit anderen Blutarten und auf andere Weise fortgesetzt:

Den Gläschen Nährbouillon wurden steriles Rinder-, Kaninchen- und Taubenblut zugesetzt und diese verschiedenen Gemische Blutbouillon mit Rotlaufbazillen geimpft, welche, wie bei den Untersuchungen mit Blutagarplatten, aus 1—8 Tage alten Strichagarkulturen genommen wurden. Hierin wuchsen die Bazillen im allgemeinen gut, die Bouillon wurde etwas trübe, doch blieb das eingeführte Blut während der viertägigen Beobachtungszeit stets als eine Masse unten in den Bouillongläschen liegen, ohne dass irgendwelche Hämolyseerscheinung wahrgenommen werden konnte. Wenn die Rotlaufbazillen in diesen Nährböden Hämolysine gebildet hätten, so wäre der Farbstoff aus den Blutkörperchen ausgetreten und hätte die Kulturflüssigkeit innerhalb beträchtlich kurzer Zeit diffus rot gefärbt. Zwar erfolgte nach 4 Tagen ein geringes Austreten des Blutfarbstoffs, doch konnte hierbei an eine Hämolysinbildung nicht gedacht werden, weil bei längerem Stehen dieser Austritt gewöhnlich spontan stattfindet.

Da nun auch auf diese Weise keine Hämolyse stattfand, wurden diese Untersuchungen etwas anders angestellt und wurden bestimmte Mengen ein- bis achttägiger Rotlaufbouillonkulturen denselben Gemischen Blutbouillon, wie bei dem vorigen Versuch, zugesetzt. Auch bei diesen Versuchen waren die Resultaten völlig die gleichen und blieb die Hämolyse vollständig aus. *Auf Grund dieser Versuche muss man also annehmen, dass, obschon eine Hämolyse in vivo bei an Rotlauf leidenden Schweinen ganz bestimmt auftritt, diese in vitro nicht nachgewiesen werden kann,*

Waren bisher alle Untersuchungen zu dem Zweck angestellt nachzuweisen, dass auch für den Rotlaufbazillus toxische Substanzen anzunehmen sind, schliesslich musste es versucht werden diese Giftsubstanzen zu gewinnen, indem man die Bakterienkörper der Einwirkung von Substanzen, welche die Zellwand angreifen und den Inhalt zur Auflösung bringen, aussetzt, um hierauf die Giftwirkung dieser Substanz, durch Injektion bei Versuchstieren zu prüfen. Von den gewöhnlichen Extraktionsmitteln, die zur Auflösung von Endotoxinen bei verschiedenen Bakterien erfolgreich angewendet werden, wie Äther, Alkohol, Glycerin und andere, musste bei dem Rotlaufbazillus jedoch abgesehen werden, weil dieser, wie bereits erwähnt, eine sehr widerstandsfähige, wächsartige Hülle besitzt, die das Bakterium gegen eine Auslaugung mit jenen Flüssigkeiten vollkommen schützt.

Verschiedene Forscher haben die Einwirkung vielen dieser Mittel auf Rotlaufbazillen untersucht:

STADIE (59) behandelte das Präzipitat aus Rotlaufbouillonkulturen sechs Tage lang ununterbrochen mit Äther; trotz dieser Auslaugung hatten die Bazillen ihre Form gut behalten, allein die Gramfestigkeit war verschwunden.

Auch VOGES und SCHÜTZ (49) suchten die Rotlaufbazillen nach der Trocknung, unter Anwendung von Alkohol, Chloroform, Äther, Benzin und Xylol, zur Auflösung zu bringen, gleichfalls ohne Resultat. Diese getrockneten Bazillen, welche in grosser Menge zusammen das Aussehen von Bienenwachs hatten, konnten auch auf mechanischem Wege durch stundenlanges Zerreiben nicht vernichtet werden, während solches doch bei Tuberkelbazillen, deren Wandung ebenfalls sehr stark ist, gelang.

Der einzige Stoff der, wie VOGES und SCHÜTZ beobachteten, diese wachsartige Bakterienwandung angreift, ist Lauge.

Diese Mitteilungen gaben den Fingerzeig, Rotlaufbazillen mit der sehr stark laugenhaltigen Flüssigkeit »Antiformin'' zu behandeln, um zu versuchen hiermit Bakterienextrakte zu gewinnen und die Bakterien völlig zur Auflösung zu bringen.

Diese Flüssigkeit, welche besteht aus: Calcium hypochlorit. 10, sol. hydrat. natric. 100 und aq. destillata 100, ist als das wohlbekannte Eau de Javelle mit einem Zusatz freien Alkalis zu betrachten und wurde die ersten Jahre nach der Erfindung von FÖRNELL und SJOÖ in Stockholm im Jahre 1900, wegen

ihrer reinigenden und schleimlösenden Wirkung ausschliesslich im Braugewerbe zur Reinigung und Desinfizierung von Bierleitungen angewendet; erst später wurde sie in die Bakteriologie eingeführt.

UHLENHUTH und XYLANDER (60), welche die Wirkung derselben untersuchten, fanden dass bereits 2—5-prozentige Antiforminlösungen die Fähigkeit besitzen, die meisten Bakterien, in Wasser verteilt, in 5—20 Minuten vollständig aufzulösen (wie Zucker in Wasser) sodass die Flüssigkeit völlig klar wird; Milzbrandbazillen und -sporen waren von den von ihnen untersuchten Bakterien am meisten resistent.

Tuberkelbazillen und andere säurefeste Stäbchen bildeten jedoch eine Ausnahme und verhielten sich sogar konzentrierten Lösungen gegenüber vollkommen refraktär; wohl ballten sich die Tuberkelbazillen zu Klümpchen zusammen, doch fand eine Auflösung nicht statt.

Antiforminlösungen von 15—20 Prozent töteten sogar Aufschwemmungen von Tuberkelbazillen nicht ab; erst in 50-prozentiger Lösung konnte dies konstatiert, werden. Diese Eigenschaft schreiben jene Untersucher der biochemischen Konstitution der Tuberkelbazillen, z.w. dem Vorhandensein einer Fettwachshülle, zu, welche diese Bakterien wie ein resistenter Panzer umgibt.

Wegen dieses besonderen Verhältnisses hinsichtlich der Tuberkelbazillen wird das Antiformin bei der Sputumuntersuchung allgemein angewandt: Werden die zu untersuchenden Sputa oder anderes tuberkulöses Material mit einer Antiforminlösung behandelt, so werden die Tuberkelbazillen von andern sie begleitenden Bakterien befreit und von dem sie umgebenden Schleime gelöst, wodurch die mikroskopische Untersuchung vereinfacht wird.

TUCHLER (61) untersuchte die Wirkung der Antiformins auf Milzbrandbazillen und -sporen etwas genauer und stellte fest dass 2½-prozentige Lösungen bereits nach 5 Minuten die Bakterien zur Schwellung bringen, während nach 30 Minuten ein körniger Zerfall eintritt und nach 50—60 Minuten die Bazillen vollständig gelöst sind. Nach 5 Minuten waren in dieser Lösung die Milzbrandbazillen bereits abgetötet.

Was die Milzbrandsporen betrifft, diese wurden in 24 Stunden weder durch eine 2½-prozentige noch durch eine 5-prozentige Antiforminlösung abgetötet,

ALTMANN und SCHULTZ (62) behandelten Typhusagarkulturen mit 2-prozentigen Antiformin und diese wurden in 30 Minuten bereits mit 10 ccm. dieser Flüssigkeit vollständig gelöst.

In dem Antiformin haben wir also ein besonders kräftiges Lösungsmittel, von dem erwartet werden durfte, dass es wegen seines freien Alkali-gehalts im stande wäre die Rotlaufbazillen anzugreifen, bezw. nach kürzer oder längerer Zeit zur vollständigen Auflösung zu bringen.

Um eine Giftwirkung zu erzielen, würde man jedoch keine Bakterienlösungen benutzen können, weil UHLENHUTH und XYLANDER (60) durch ihre Untersuchung bewiesen hatten, dass, wenn Bakterien durch Antiformin aufgelöst werden, die Bakteriengifte — die Toxine sowie die Endotoxine — abgebaut und unschädlich gemacht werden; durch eine Injektion dieser aufgelösten Giftsubstanzen würde also keine Giftwirkung erzielt werden können.

Daher müsste angestrebt werden, die Wächshülle der Rotlaufbazillen durch Antiforminlösungen einer bestimmten Konzentration nur wenig zu schwächen, sodass jene im Tierkörper leicht aufgelöst werden und die hierdurch rascher und in größeren Mengen freiwerdenden Endotoxine ihre Giftwirkung im Organismus der Versuchstiere ausüben könnten; die Antiforminlösungen müssten m.a.W. so stark gemacht werden, dass die Bakterienwandung angegriffen würde, ohne dass eine Resorption des Bakterienprotoplasmas zustande kommen könnte.

Zu diesem Zweck wurde zuerst die Wirkung einer 5-prozentigen Lösung auf die Form und die Gramfestigkeit der Rotlaufbazillen untersucht und zugleich nachgeforscht, innerhalb welcher Zeit sie in einer derartigen Lösung abgetötet werden.

Wurden Präzipitate aus zentrifugierten Rotlaufbouillonkulturen mit 5-prozentiger Antiforminlösung behandelt, so wurde diese Flüssigkeit durch die darin enthaltenen Bazillen nicht getrübt, wie solches geschieht, wenn diese Bakterien in Wasser oder physiologische Kochsalzlösungen gebracht werden, sondern sanken sie als flockige Massen zu Boden. Es wurde also hierbei dieselbe Beobachtung gemacht, wie auch UHLENHUTH und XYLANDER für Tuberkelbazillen wahrnahmen, welche Bazillen ungefähr in der gleichen Weise gebaut, nämlich auch mit einer wachsartigen, resistenten Bakterienhaut versehen sind.

Nach ein Verweilen von 3 Stunden in dieser Lösung schienen die Bazillen, nachdem sie nach der Gramschen Methode gefärbt worden waren, etwas geschwollen zu sein und waren die Enden mehr abgerundet; von einer Auflösung oder einem Bakterienzerfall war jedoch keine Rede: nach 10 Tagen hatten die Bazillen noch stets dasselbe Aussehen und waren sie noch ebenso Gramfest wie vor der Antiforminbehandlung.

In einer 5-prozentigen Lösung werden die Bakterien ziemlich schnell abgetötet; um dies zu untersuchen, wurden von den in der Antiforminlösung liegenden flockigen Bakterienmassen während einer halben Stunde jede 5 Minuten Bouillon-, Agar- und Gelatinekulturen angelegt. Von den nach 10 Minuten geimpften gingen noch einige Bouillonkulturen auf, während von nach 15 Minuten geimpften alle Nährböden steriel blieben.

Fassen wir diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich, dass eine 5-prozentige Antiforminlösung erst nach 15 Minuten alle Rotlaufbazillen abzutöten vermag, während diese hierin nach 10 Tagen nicht aufgelöst werden und sogar ihre Gramfestigkeit behalten.

Nach dieser Untersuchung erschien es mir wünschenswert diese Antiforminlösung anzuwenden, um die Bakterienwandung einigermaßen zu schwächen; obwohl dies nach der Färbung unter dem Mikroskop auch nicht sichtbar war, mussten in dieser Lösung die Bakterien doch etwas gelitten haben: Sehen die aus einer Kultur sedimentierten Rotlaufbazillen fettig aus, nachdem sie einige Stunden der Einwirkung einer 5-prozentigen Antiforminlösung ausgesetzt wurden, war dieses fettwachsartige Aussehen verschwunden und waren die Bakterienklümpchen loser, als körnige Massen mit einander verbunden. Würden stärkere Lösungen gebraucht, so gingen vielleicht Bakteriensubstanzen in Auflösung über und würden dabei durch Abbau ihre Giftwirkung einbüßen.

Für diese Untersuchungen mittels Injektion bei Versuchstieren wurde 3-tägige Rotlaufbouillonkultur, deren präzipitierte Bazillen bestimmte Zeiten der Einwirkung eines Überschusses 5-prozentiger frisch hergestellter Antiforminlösung ausgesetzt wurden, verwendet. Nach Neutralisierung des Antiformins wurden die Bazillen mittels Zentrifuge gesammelt und diese mit steriler Rinderbouillon bei Tauben in die Brustmuskeln eingeführt. Jeder Taube wurden die Bazillen aus 100 g Kultur, mit 2 g Bouillon gemischt, injiziert.

Die Neutralisierung des Antiformins erfolgte durch Zusatz von 5-Prozent Schwefelsäure — um das Alkali zu binden — und 5-Prozent Natrium-sulfit um die Chlorwirkung unschädlich zu machen. Lackmus- und Jodkaliumstärkepapier dienten hierbei als Indikatoren.

Die Resultate dieser Injektionen waren folgende:

Tauben Nr.	Zeit der Einwirkung des Antiformins		Bemerkungen.
1	30 Minuten	keine Reaktion.	
16	1 Stunde	„ „	
20	2 „	„ „	
21	3 „	„ „	
22	4 „	„ „	
81	5 „	„ „	
17	6 „	nach 13 Tagen eingegangen, nicht an Rotlauf doch stark abgemagert.	
23	7 „	keine Reaktion.	
25	8 „	„ „	
28	24 „	„ „	
35	30 „	„ „	

Mit den Bazillen aus 100 g Rotlaufbouillonkultur, nach 6-stündiger Einwirkung von 5-Prozent Antiformin, gelang es also tatsächlich die Taube Nr. 17 unter den typischen Erscheinungen der Endotoxinvergiftung, nach 13 Tagen zu töten. Von Rotlaufbazillen konnte in den inneren Organen genannter Taube keine Spur entdeckt werden, sodass der Tod an Rotlauf ausgeschlossen werden muss. Dass die übrigen Tauben während der Beobachtungszeit, 6 Wochen lang gesund geblieben sind, ist vielleicht auf eine zu schwache, bzw. zu starke Einwirkung des Antiformins zurückzuführen, während im Zusammenhang hiermit ein Unterschied betreffs der rascheren Resorption der eingeführten Bazillen bei den verschiedenen Tauben auch eine Rolle gespielt haben kann.

Ausser diesen Untersuchungen wurden noch Versuche angestellt um Rotlaufbazillen durch Antiformin zur Auflösung zu bringen. Da sich herausgestellt hatte, dass 5-prozentige Lösungen hierzu

nicht im stande waren, so wurden die Versuche mit stärkeren Konzentrationen wiederholt, indem die präzipitierten Bakterien aus zweitägiger Bouillonkultur mit reichlichen Mengen einer frisch hergestellten Antiforminlösung von 10, 15 resp. 25 Prozent gemischt wurden. Auch in diesen Lösungen verteilten die Bazillen sich nicht in der Flüssigkeit, sondern ballten sich zu kleinen Klümpchen zusammen.

Hierbei zeigte sich erst recht, wie äusserst resistent die wachsartige Haut dieser Bakterien ist, da auch eine 25-prozentige Solution die Rotlaufbazillen nicht aufzulösen vermochte. Wohl zeigte sich dass ein kleiner Teil der Bazillen nach einiger Zeit körnig wurde, während bei einem andern Teil das Protoplasma austrat, sodass hiervon nur noch leere Bakterienhüllen übrig blieben, welche Hüllen sich schliesslich auch auflösten; dies wurde sowohl bei der Behandlung mit 10-, als auch mit 15- und 25-prozentigen Lösungen wahrgenommen. Nach einer bestimmten Zeit, bei stärkeren Lösungen früher als bei schwächeren, hörte der Auflösungsprozess jedoch auf und war dieser zum Beispiel bei einer 25-prozentiger Solution nach 3 Tagen beendet. Die übrigen Bazillen, welche die grösste Masse der ursprünglichen Menge bildeten, wurden auch in dieser starken Konzentration durch das Antiformin nicht angegriffen, sodass sie nach 12 Tagen noch unversehrt und gut Gramfest nachgewiesen werden konnten. Es stellte sich heraus, dass erst eine 50-prozentige Lösung die Rotlauf-bazillen stark angriff und die Bazillen hierin nach 4 Stunden fast alle aufgelöst waren: die Flüssigkeit war klar geworden und der Bodensatz verschwunden; wurden diese jedoch filtriert und wurde der auf dem Filtrierpapier zurückgebliebene geringe Niederschlag mikroskopisch untersucht, so ergab sich, dass dieser noch im Zerfallen begriffene Rotlaufbazillen enthielt; einige waren stark geschwollen, körnig und nahmen die Gramfärbung noch an, andere stellten sich als gelbliche, stark lichtbrechende Körner dar, wie solche auch bei im tierischen Organismus sehr stark zerfallenen Rotlaufbazillen wahrgenommen worden waren.

Als letzter Versuch wurde die Einwirkung des Antiformins auf in 0,9-prozentiger physiologischer Kochsalzlösung abgewaschene Rotlaufbazillen untersucht.

Aus den Resultaten bei früheren Versuchen, die mit abge-

waschenen Bazillen angestellt worden waren — durch die stärkere Farbstoffaufnahme und bei der raschen Bakterienzerstörung abgewaschener Bazillen — wurde die Möglichkeit angenommen, dass die Bakterienwandung durch diese Behandlung permeabler geworden sei; vielleicht könnte diese grössere Permeabilität, falls sie wirklich zustande kommt, zur Folge haben, dass die Bazillen durch die Antiforminlösung rascher angegriffen werden.

In der Tat wurde dieses Vermuten in überraschender Weise bestätigt: Löste doch eine 15-prozentige Lösung dreimal abgewaschener Rotlaufbazillen aus zweitägiger Bouillonkultur innerhalb 4 Stunden vollständig auf. Der Bodensatz in dem Antiformin war völlig verschwunden und nach Filtrierung konnte in dem Rückstand auf dem Papier auch mikroskopisch keine Spur von Rotlaufbazillen wahrgenommen werden.

Was also eine 25-prozentige Lösung nach 12 Tagen auf Rotlaufbazillen nicht vermochte, wurde nach der Abwaschung von einer 15-prozentigen Solution innerhalb 4 Stunden vollbracht. Durch diese Tatsache wurde die Wahrscheinlichkeit einer grösseren Permeabilität durch Abwaschung, durch welche Permeabilität das osmotische Äquivalent der Bakterien erhöht, wird, noch erheblich gesteigert.

Fassen wir zum Schlusse dasjenige, was diese letzten Versuche gelehrt haben, zusammen, so zeigen diese dass die Rotlaufbazillen durch ihre Wachshaut eine sehr grosse Widerstandsfähigkeit auch gegen Antiformin besitzen, welche Widerstandsfähigkeit durch Abwaschen in physiologischer Kochsalzlösung sehr stark beeinträchtigt wird. Ferner zeigen sie dass es, nach Einwirkung schwächerer Antiforminlösungen, welche die Bakterienwandung schwächen ohne etwas von dem Protoplasma zur Auflösung zu bringen, gelingen kann Versuchstiere mit Rotlaufbazillen unter Endotoxinvergiftungserscheinungen zu töten.

Schlussfolgerungen:

1. Wie die übrigen Bakterien, enthält auch der Rotlaufbazillus Endotoxine.
2. Ausser diesen, sind für diese Art noch extrazelluläre Giftsubstanzen anzunehmen, welche mehr oder weniger fest mit

der Bakterienwandung verbunden sind und aller Wahrscheinlichkeit nach in die Kulturbouillon übergehen können. Durch Abwaschen können diese Substanzen von dem Bazillus getrennt werden, worauf dieser in gewöhnlichen Dosen seine Pathogenität einbüsst. Dieser Verlust an Giftsubstanzen, zufolge der Abwaschung, wird bei weiterer Kultur bald wieder ausgeglichen.

3. Durch Abwaschung wird die Bakterienwandung permeabler gemacht, wodurch Flüssigkeiten leichter in dieselbe eindringen können.
4. Hamolysinbildung kann in vitro für den Rotlaufbazillus nicht nachgewiesen werden.
5. Wegen der wachsartigen Hülle besitzt dieses Bakterium eine grosse Resistenz gegen Auslaugung und Auflösung mittels Antiformins und ist somit erst eine sehr starke Konzentration hierzu imstande.
6. Durch Abwaschung mit physiologischer Kochsalzlösung wird diese Widerstandsfähigkeit erheblich beeinträchtigt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, dem Direktor des Reichseruminstituts, Herrn Prof. Dr. J. POELS, für die Ueberlassung des Themas und für die grosse Bereitwilligkeit, mit der er mir bei meinen Untersuchungen Hilfe geleistet, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

L I T E R A T U R.

-
- (1) PFEIFFER: Über Bakterien-Endotoxine und ihre Antikörper.
Jahresber. über die Erg. der Immunitätsforsch., VI Band 1910,
Abt. I, S. 13.
- (2) MURILLO: Über die Diphtherietoxinkurve.
Centralbl. für Bakt., I Abt. Orig., Bd. 35, S. 209.
- (3) RIST: Sur la toxicité des corps des bacilles diphtériques.
Soc. de biol. 1903, Nr. 25.
- (4) BANDI: Contribuzione allo studio dell' endotossino del bacillo di
Löffler.
Ref. Centralbl. für Bakt., I Abt., Band 41, S. 169.
- (5) CRUVEILHIER: Compt. rend. de Soc. de Biol., T. 66, 1909, Nr. 22.
- (6) AVIRAGNET, BLOCH-MICHEL et DORLENCOURT: Les Poisons endo-
cellulaires du bacille diphtérique.
Compt. rend. de Soc. de Biol., T. 70, 1911, p. 325.
- (7) SALUS: Zur Kenntnis der Diphtherie.
Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 1455.
- (8) AUCLAIR: Recherches sur les poisons microbiens.
Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol., T. 15, 1903.
- (9) CARNEVALI: Sull' azione locale e generale degli estratti dei corpi
batterici.
Ref. Baumg. Jahresber. 1902, S. 1014.
- (10) MACFADYEN und ROWLAND: Über die intracellulären Toxine gewisser
Mikroorganismen.
Centralbl. für Bakt., I Abt. Orig., Bd. 35, S. 415.
- (11) CENTANNI: Studio sulla febbre infettiva.
Ref. Baumg. Jahresber., IX Jahrg., S. 605.
- (12) DUDGEON, PANTON and WILSON:
Proc. R. Soc., Ser. B, Vol. 82, 1910, p. 406.
- (13) LANGE: Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten der
Leukocyten nach Injektion von Bakterienextrakten.
Deutsch. Arch. für klin. Med., Bd. 94, 1908, H. 5—6.

- (14) EISENBERG: Über neue Wege und neue Probleme.
Centralbl. für Bakt., I. Abt., Orig., Bd. 45, S. 146.
- (15) BAIL: Beziehungen zwischen Aggressivität und Leibessubstanz.
Münch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 39—40.
- (16) WASSERMANN und CITRON: Zur Frage der Bildung von Bakteriellen
Angriffstoffen im lebenden Organismus.
Deutsch. med. Wochenschr., 1905, Nr. 28.
- (17) WOLFF-EISNER: Die Aggressinlehre.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 38, S. 641.
- (18) DÖRR: Über Aggressine.
Wiener klin. Wochenschrift, 1906, Nr. 25.
- (19) BALDWIN und WOODS PRICE: Die Aggressine der Tuberkelbazillen.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 38, S. 751.
- (20) PFEIFFER: Zur Theorie der Virulenz.
Festschrift zum 60. Geburtstag von R. KOCH, Jena 1904.
- (21) SALEMBENI: Le choléra à St. Petersbourg; quelques essais de
sérothérapie anticholérique.
Ann. de l'Inst., Past., T. 24, 1910, Nr. 1, p. 34.
- (22) ANDERS: The use of typhoid vaccines in typhoid fever.
Journ. of the Am. Med. Ass., Vol. 55, 1910, p. 2013.
- (23) FOSTER: Antityphoid fever, Ibid. p. 1808.
- (24) VARGAS: Weitere mit Serum behandelte Typhusfälle.
Ref. Centralbl. für Bakt., Bd. 49, 1910, S. 258.
- (25) STADELMANN und WOLFF-EISNER: Ueber Typhus als Endotoxinen-
krankheit.
Münch. med. Wochenschr., 1907, S. 1237.
- (26) WOLFF: Die Endotoxinlehre.
Münch. med. Wochenschr., 1906, S. 66.
- (27) PASTEUR: Compt. rend. de l'Acad. des Sciences, 1877, T. 84, p. 905.
- (28) LEVY und BECKMANN: Sind im Blutserum von mit Schweinepest
und Milzbrandbazillen tödlich infizierten Kaninchen wirksame
oder giftige Stoffwechselprodukte nachweisbar?
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 43, S. 43.
- (29) KLEIN: Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der intracellulären
Bakteriengifte.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 15, S. 598.
- (30) CONRADI: Zur Frage der Toxinbildung bei den Milzbrandbakterien.
Zeitschr. für Hyg. und Infekt. Krankh., I Abt., Bd. 31, S. 287.
- (31) STRUEFF: Ursache des Todes bei dem akuten Milzbrande.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 50, S. 156.
- (32) TOUSSAINT: Du mécanisme de la mort consécutive à l'inoculation
du charbon au lapin.
Compt. rend. de l'Acad., 1877.

- (33) MARTIN: Ref. Proc. Royal Soc., 1890, p. 235.
- (34) BOIDIN: Recherches sur les poisons de la bactériidie charbonneuse.
Arch. de méd. exp. et d'anat. pathol., T. 17, p. 695.
- (35) MARMIER: Sur la toxine charbonneuse.
Ann. de l'Inst. Pasteur, 1895, T. 9, p. 533.
- (36) VAUGHAN: The intracellular toxins of some of the pathogenic bacteria.
Journ. of the Am. med. Assoc., 1903.
- (37) GALTIER. Pouvoir toxique et immunisant des matières charbonneuses conservées dans la glycérine.
Journ. de Méd. vétérin., 1903, p. 654.
- (38) TRINCAS: Dei prodotti solubili e filtrabili ottenuti in vivo nelle mescolanze di Bacillo del carbonchio ed essudati sterili.
Ref. Centralbl. für Bakt., I Abt., Bd. 44, S. 193.
- (39) KOCH: Die Aetiologie der Milzbrandkrankheit.
Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II, 1876.
- (40) MENDEZ: Ueber Milzbrandantitoxin.
Centralbl. für Bakt., 1 Abt., Orig., Bd. 37, S. 405.
- (41) HEYROVSKY: Durch Bakteriengifte erzeugte Purpura haemorrhagica.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 51, S. 501.
- (42) DONATH: Ueber fiebererregende Stoffe.
Verhandl. des XI Intern. med. Congr. in Rom, 1894, Abt. für allg. Path. und path. Anat., Bd. II, p. 19.
- (43) VOGES: Praxis und Theorie der Rotlaufschutzimpfungen und Rotlaufimmunität.
Zeitschr. für Hyg. und Inf. Krankh., Bd. 22, 1896, S. 522.
- (44) NATUSCH: Beiträge zur Kenntnis des Schweinerotlaufs.
Vet. med. inaug. Dissert. Giessen, 1910.
- (45) FRIEDBERGER und FRÖHNER: Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie der Haustiere.
II Bd., 1908, S. 219.
- (46) HUTYRA und MAREK: Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere.
II Auflage, 1909, S. 65.
- (47) POELS: De varkensziekten in Nederland.
's Gravenhage 1905, S. 124.
- (48) STICKDORN: Beitrag zur Biologie des Rotlaufbazillus.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 50, S. 5.
- (49) VOGES und SCHÜTZ: Ueber die Ergebnisse von Immunisierungsversuchen beim Rotlauf der Schweine.
Deutsche Med. Wochenschr., 1898, S. 49.
- (50) VAILLARD et VINCENT: Contribution à l'étude du Tétanos.
Ann. de l'Inst. Pasteur, 1891, p. 1.
- (51) FORSTER: Münch. med. Wochenschr., 1889.

- (52) PETRI: Arb. aus dem Kaiserl. Ges. Amt., Bd. 6, S. 266.
- (53) SVENNEBY: Beiträge zur Biologie des Rotlauf bazillus unter besonderer Berücksichtigung seines Verhaltens in faulenden Organen.
Vet. med. inaug. Diss., Hannover, 1911.
- (54) KITT: Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie für Tierärzte.
Wien 1908, S. 315.
- (55) PAMPOUKIS: Les bacilles du Rouget.
Arch. de Physiologie normale et pathologique, 1886, p. 89.
- (56) JAROTZKY: Lokale Erscheinungen bei passiver Immunität gegen Schweinerotlauf und Infektion.
Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 44, S. 76.
- (57) VON WÜNSCHHEIM: Ueber Hämolyse im Reagenzglase und im Tierkörper.
Arch. für Hyg., Bd. 54, 1905, S. 185.
- (58) VON KROGH: Das Verhalten des Milzbrandbazillus auf bluthaltigen Nährböden Centralbl. für Bakt., I Abt., Orig., Bd. 54, 1910, S. 188.
- (59) STADIE: Beiträge zur Biologie des Rotlaufbazillus.
Vet. med. inaug. Dissert., Berlin, 1904.
- (60) UHLENHUT und XYLANDER: Berl. Klin. Wochenschr., 45 Jahrg., 1908, Nr. 29, S. 1346, und Arb. aus dem Kaiserl. Ges. Amt., Bd. 31, 1909, S. 156.
- (61) TUCHLER: Der Einfluss des Antiformins auf Milzbrandbazillen und Sporen.
Vet. med. inaug. Dissert., Bern, 1910.
- (62) ALTMANN und SCHULTZE: Zeitschr. für Immunitätsforschung Bd. 3, 1909, S. 98.
-

ÜBER TETANUSBAZILLEN UND TETANUSTOXIN *)

VON

DR. H. E. REESER.

(Aus dem Reichsseruminstitut in Rotterdam).

Für die Bereitung eines hochwertigen Tetanusserums ist der Besitz eines sehr toxischen Tetanusstammes ein Hauptfordernis. Als denn auch vor etwa 5 Jahren mit der Bereitung von Tetanusserum im Reichsseruminstitut angefangen wurde, war es notwendig einen solchen Stamm zu bekommen.

Nun wird als Ausgangsmaterial zum Isolieren von Tetanusbazillen oft Gartenerde oder Pferdefaeces benutzt. Das letzte Material hat den Vorzug, dasz der Tetanusbazil (wenigstens nach mehreren Untersuchern) ein Parasit der Tiere, besonders des Pferdes, ist und dasz er sich nur im tierischen Körper vermehren und seine Lebensfähigkeit behalten oder erhöhen sollte. In Bezug hierauf benutzte ich als Ausgangsmaterial Pferdefaeces, mit dem mehrere weisse Mäuse subkutan geimpft wurden. Nach einigen erfolglosen Versuchen gelang es bei einigen Mäusen Tetanuserscheinungen, auf welche der Tod folgte, zu erregen.

Die Impfstelle dieser Mäuse wurde entfernt und danach versucht eine Reinkultur von Tetanusbazillen zu bekommen, wobei sowohl die Methode KITASATO, welche zur Entfernung der nicht-sporenbildenden Bakterien eine Erhitzung des Materials angibt von ungefähr 1 Stunde auf 80° C, als die Methode NICOLAIER, welche eine Temperatur von 100° C benutzt und diese drei Minuten einwirken lässt, gebraucht wurde. Durch keine dieser beiden Methoden konnten direkt Reinkulturen gezüchtet werden, weil andere, anaerobe sporenbildende Bakterien

*) Vorlesung gehalten auf der Versammlung des mikrobiologischen Vereins in Rotterdam am 19 Dezember 1912.

ein Hindernis bildeten. Darum wurde entschlossen zum Gelatineplattenverfahren, welche Platten in ein großes speziell dazu angefertigtes Apparat nach BOTKIN hingestellt wurden; darauf wurde mehrere Stunden hintereinander Wasserstoff durchgeführt und schliesslich der ganze Apparat während 10 Tage in den Brutapparat (22° C) gestellt. Auf diese Weise gelang es einen Tetanusstamm zu bekommen, welcher endständige, grosse, runde Sporen bildete. Das Ganze, Bazil und Spore, hatte die bekannte Trommelschlägelform, wobei die Spore 2—3 mal dicker war als der Bazil. Die Sporen färbten sich sehr schön bei Erhitzung mit Carbofuchsin.

Was die Sporenfärbung nach MÖLLER betrifft, teile ich mit, dass an dieser Methode 2 Fehler haften, wodurch man gewöhnlich negative Erfolge bekommt. Erstens ist die Erhitzung mit Carbofuchsin zu kurz angegeben. MÖLLER spricht von 1—5 Minuten, während für eine schöne Sporenfärbung mit Carbofuchsin eine Erhitzung von $\frac{1}{2}$ —1 Stunde nötig ist. Gebraucht man Anilinwasserfuchsin, dann genügt eine Erhitzung von ungefähr 20 Minuten schon. Der zweite Fehler liegt in der Entfärbung mit 5 % Schwefelsäure; durch diese Konzentration nimmt man oft eine ganze oder teilweise Entfärbung wahr (auch bei sehr kurzer Einwirkung). Durch eine Entfärbung mit $\frac{1}{2}$ —1 % Schwefelsäure behält man schöne, rote Sporen. In dem neuen Artikel über Tetanus in WASSERMANN & KOLLE von VON LINGELSHEIM (1912) ist noch die Rede von einer Entfärbung mit 25 % H_2SO_4 .

Auch wird die Sporenfärbung durch die Art der Sporen bedingt; so färben z.B. Tetanussporen sich meistens schwerer als Milzbrandsporen. Was die Toxinbildung des von mir aus Pferdefaeces isolierten Stammes betrifft, kann ich Sie auf die B Kurve verweisen in beigefügter Zeichnung. Der Kultur, die sich unter Wasserstoff bei 37° C befand, wurde jedesmal, auf sterile Weise, etwas abgenommen; dies wurde durch einen kleinen Filter nach MAASSEN filtriert und danach wurde wieder aufs neue Wasserstoff durchgeführt.

Nach	4 Tagen	tötete	1/10	c.M ³ .	Toxin	Mäuse;
»	6	»	1/100	»	»	» ;
»	8	»	1/100	»	»	» ;
»	9	»	1/1000	»	»	» ;

Nach 11 Tagen tötete	1/10.000	c.M ³ .	Toxin	Mäuse;
» 12 » »	1/100.000	»	»	» ;
» 14 » »	1/100.000	»	»	» ;
» 16 » »	1/100.000	»	»	» ;
» 20 » »	1/100.000	»	»	» ;
» 24 » »	1/100.000	»	»	» ;
» 26 » »	1/10.000	»	»	» ;
» 28 » »	1/10.000	»	»	» ;

Aus der Kurve stellt sich heraus, dass der Stamm sein Toxin langsam bildete, weil erst am 12^{ten} Tage das Maximum der Toxizität erreicht war, dass die Toxizität 12 Tage auf ihrem Maximum blieb und darauf nur langsam abnahm.

Die Kurve ist nicht weiter fortgesetzt worden bis an den fünfzigsten Tag, an welchem Tage es sich herausstellte, dass die Toxizität noch 1/10.000 c.M³. war.

Tetanus bei Mäusen, auch die experimentelle durch die subkutane Injektion von Toxin, tritt auf in der Form von tetanus ascendens. Zuerst nimmt man die Erscheinungen wahr an den Stellen, welche am dichtesten bei der Injektionsstelle gelegen sind und weil die Mäuse von mir eingespritzt werden am Rückfell nahe dem Schwanz, ist immer die erste Erscheinung, welche an den Mäusen zu konstatieren ist, das senkrecht hinauf Gehen des Schwanzes, welche Erscheinung sofort auftritt wenn man an das Mäuseglas klopft. Wenn die Tiere sich in Bewegung setzen so sieht man dass sie von hinten weit gehen und eine oder beide Hinterbeine hinter sich anschleppen, die Fuszsohlen nach oben und die Zehen gespreizt (Seehundehaltung).

Nach und nach schreiten die Erscheinungen auch auf die Vorderbeine und das Zwerchfell fort, das Atmen wird erschwert, sodass der Tod hauptsächlich durch Erstickung eintritt. Geräume Zeit können die Mäuse denn noch liegen, scheinbar tot, meistens auf dem Rücken, indem nur durch klopfen an das Glas kann wahrgenommen werden, an einem tiefen Atemzug oder einer plötzlichen Bewegung mit dem Schwanz oder einer Hinterpfote dass das Leben noch nicht entflohen ist.

Bei den Toxininjektionen bei Mäusen wurde immer wahrgenommen, dass die Mäuse, welche 1/10 und 1/100 c.M.³ empfangen hatten, innerhalb eines Tages starben und zwar die mit

der grössten Dosis am ersten. Darauf starben hintereinander, gewöhnlich nach 2 Tagen, die Mäuse welche mit $1/1000$ c.M.³ und $1/10.000$ c.M.³ eingespritzt waren. Die Mäuse, welche $1/100.000$ c.M.³ empfangen, starben nach Verlauf von 3 Tagen. Je grösser die Dosis Toxin war die eingespritzt wurde, je geringer war die Inkubationsperiode. Dennoch kann man diese nicht, indem man grosse Dosen Toxin nimmt, so klein wie möglich machen. Nie sah ich die ersten Erscheinungen schneller auftreten als 5 Stunden nach der Toxin-injektion und sah ich Mäuse früher sterben als 8 Stunden nach dieser Injektion. Es stellte sich heraus, bei genaueren Versuchen, dass die kleinste Dosis Toxin, welche Mäuse noch tötete, gerade lag bei $1/100.000$ c.M.³ (wie auch in der Kurve B ist angegeben). Bei $1/200.000$ c.M.³ blieben die Mäuse am Leben.

Welche war nun die minimale krankmachende Dosis?

Bei diesem Stamme lag dieselbe bei $1/1000.000$ c.M.³, sodass also die tödliche Dosis 10 mal grösser war als die krankmachende. Bei einem anderen Stamme, wovon ich bald reden werde, war diese 20 mal grösser. Der Differentzwert, d.i. der Unterschied zwischen der minimalen krankmachenden und tödlichen Dosis, wird also auch durch den gebrauchten Stamm bedingt und kann deshalb nicht für eine bestimmte Tiergattung durch eine konstante Ziffer angegeben werden. So liest man in Handbüchern, dass bei Mäusen die tödliche Dosis dreimal grösser ist als die krankmachende, während meine Ziffern viel grösser sind und mit dem Stamme wechseln. Ich teile noch mit, dass das gebrauchte Toxin durch Filtration bekommen war und kein Antisepticum beigefügt war.

Dieser Stamm, besonders dessen Toxin, wurde benutzt für die Immunisation von Pferden. Es musste also dafür gesorgt werden, dass der Stamm im Laboratorium nicht abschwächte, weil es eine bekannte Tatsache ist, dass bei fortgesetzter Züchtung, auf kunstlichen Nährboden die Virulenz aller pathogenen Anaëroben bedeutend abnimmt. Für das Virulenthalt von Tetanusbazillen sind verschiedene Methoden angegeben (Milchsäure 1 : 1000; Ca SO₄ u.s.w.). Die Methode, welche mir am besten gefiel und welche auch am leichtesten ist, ist das jede 7 Tage Übersetzen der Kultur in hohen Stichelagar. Auf diese Weise nimmt die Virulenz nur äusserst langsam ab;

dennoch war die Abnahme der Art, dasz nach einem Aufenthalt von 4 Jahren im Laboratorium die minimale tödliche Dosis Toxin von $1/100.000$ c.M.³ auf $1/1000$ c.M.³ gefallen war.

Alle Versuche, dem Stamme seine ursprüngliche Virulenz wiederzugeben, miszlangen. Auch das Züchten auf frischem Kaninchenblut, welche Methode von TIZZONI und CATHANI angegeben war und das Züchten auf Pferdeserum und Kaninchen-serum, Methode von HIBLER, gaben ein negatives Resultat.

Es wurde alsdann ein neuer Stamm angefragt an das von KRAUS fortgeführte Laboratorium von KRAL in Wien und darauf empfangen eine Stichkultur, woraus sich, nach Impfung auf gewöhnlichen schrägen Agar an die Luft eine Reinkultur von Bazillen entwickelte, welche keine runde, sondern ovale Sporen bildeten, welche wohl endständig waren, aber bei weitem so schön nicht als dies bei einer gewöhnlichen Tetanuskultur der Fall ist. Oft konnte man sogar jenseits der Spore noch einen Teil des Bazillus wahrnehmen. Das Ganze sah denn auch auch mehr wie Rauschbrand denn wie Tetanus aus. In Bezug auf den Umstand, dasz die Spore bei dieser Kultur nicht viel breiter war als der Bazil und der Bazil an der Spore bald degenerierte, konnte von einer schönen Trommelschlägelform nicht die Rede sein. Auch machte das ärober Wachsen der zugesandten Kultur (schon nach 18 Stunden entwickelte sich auf der schrägen Agaroberfläche eine tüchtige Kultur) mich fragen ob hier vielleicht ein Irrtum vorlag.

Um dies zu entscheiden, wurde ein Kolben Bouillon geimpft mit diesem Bazil und dieser aërob 7 Tage bei 37° C gestellt, darauf wurde ein Teil filtriert durch einen Filter nach Maassen und mit diesem Filtrat wurden Mäuse subkutan geimpft. Schon innerhalb eines Tages waren die Mäuse, welche $1/10$, $1/100$, $1/1000$ und $1/10.000$ c.M.³. Filtrat empfangen hatten an typischem Tetanus gestorben. Die Mäuse, welche mit $1/100.000$ und $1/1.000.000$ c.M.³. eingespritzt waren, starben nach 2 Tagen, während sogar die Maus, welche $1/10.000.000$ c.M.³. empfangen hatte, noch am 3^{ten} Tage starb. Dies ist wohl ein Beweis für die grosze Toxizität der empfangenen Kultur.

Dennoch wurde, ehe die Serumpferde mit diesem Stamme behandelt wurden, der Versuch noch ausgebreitet, indem ein Versuchspferd intravenös mit 30 c.M.³. eines auf dieselbe Weise

erhaltenen Filtrat eingespritzt wurde. Die ersten Erscheinungen, welche man gewöhnlich beim Pferde auf Prädilektionsstellen wahrnimmt, traten auf nach 50 Stunden; es bestand alsdann geringer Krampf der Kaumuskeln und ein steifer Hals; das Tier bewegte den Hals weder rechts noch links. Das eigentümliche Verhalten der Nickhaut, die beim Emporheben des Kopfes den Bulbus über die Hälfte bedeckt hält, war nicht wahrzunehmen. Nach einigen Stunden nahm die Starre immer zu, während auch das Atmen eine große Abweichung zeigte; es war sehr erschwert, was immer verschlimmerte. Innerhalb 24 Stunden nach der ersten Erscheinung war das Tier schon an Asphyxie gestorben. Das Blut dieses Pferdes wurde aufgefangen und mit dem Serum Mäuse geimpft. Die Mäuse, welche subkutan 1 cM³. empfangen hatten, starben schon innerhalb eines Tages an Tetanus, während die, welche 0.5 und 0.3 cM³. nach 1 1/2, die welche 0.1 cM³. nach 2 Tagen und die, welche 0.01 cM³. empfangen hatten nach 4 Tagen an Tetanus starben. Die mit kleineren Dosen behandelten Mäuse blieben alle am Leben. Das Serum des Tetanuspatienten enthielt also in einer Quantität von 0.01 cM³. noch Tetanustoxin.

Agglutinationsversuche mit Serum von Tetanuspatienten, womit COURMONT schon Versuche gemacht hatte mit negativem Resultat, wurden auch von mir angestellt.

Zu diesem Zweck wurden mehreren Tetanusbouillonkulturen fallende Quantitäten destoxischen Serums des Tetanuspatienten beigelegt. In kein einzigem Gläschen, auch nicht in dem mit 1/2 cM³. Serum, war Agglutination zu bemerken. Ohnehin konnte ich, auch mit einem hochwertigen Immuserum, sogar mit Quantitäten von 1/2 c.M³. in Tetanusbouillonkulturen keine Spur von Agglutination erzeugen.

Kann also, wie die Widal bei Typhus, bei Tetanus in dieser Hinsicht von einer Serodiagnose nicht die Rede sein, dies ist wohl der Fall, wenn man die Resultate betrachtet, die man bekommt durch Injektion von Serum von Tetanuspatienten bei Mäusen.

Was der Komplementbindungsreaktion anbetrifft, hiermit bekam ich ebenso mit dem Serum des Tetanuspatienten als mit dem Immuserum negative Resultate.

Neben dem krampferregenden Stoffe »Tetanospasmin« stellte sich heraus, dass auch »Tetanolysin« in der Kultur anwesend war. Versuche mit einer 5 % Emulsion roter Blutkörperchen des Schafes entschieden dies genügend.

Mit vollem Vertrauen konnten, hinsichtlich der gemachten Versuche, unsere hoch immunisierten Tetanuspferde mit dieser Kultur, besonders mit dem Toxin, behandelt werden. Die Pferde, welche früher intravenös 500 cM³. Toxin des von mir selbst kultivierten Stammes empfangen hatten, ertrugen nun 500 cM³. des neuen Toxins ohne auffallende Reaktionserscheinungen.

Der empfangene Stamm war also ein aërober, sehr toxischer Tetanusstamm, welcher sich kennzeichnete durch seine ovalen, nicht vollkommen endständigen Sporen.

Was die Formveränderung der Sporen betrifft kann bemerkt werden, dasz von HIBLER zeigte, dasz man durch Zusatz von Zucker und Glycerine (über 1%) an die Nährboden die Form der Tetanus-sporen ändern kann, wodurch die Kugelform in die elliptische Form verwandelt. Sehr plötzlich soll diese Formveränderung statt finden in einem NaCl-Reis-Lakmuswasser-Peptonnährboden. Hierauf sollten alle pathogenen Anaëroben sehr lang gestreckte elliptische Sporen bilden, wenigstens in den ersten Tagen. Später als der Säuregrad des Nährbodens stark zugenommen hat und demzufolge die Farbe von blau in rot verwandelt ist, hört die Sporenbildung auf und nimmt die Virulenz stark ab.

Bezüglich eines Glycerinezusatzes über 1% kann ich Folgendes mitteilen:

In Stichagarkulturen mit 1½ % Glycerine war die Form der Sporen des von mir isolierten Stammes ganz ähnlich mit denen in den Nährboden ohne Glycerine. Dasselbe beobachtete ich in Stichagarkulturen mit 2% und mit 3% Glycerine; die Sporen blieben vollkommen rund und von eine Veränderung in ovale Form konnte nicht die Rede sein. Mit dem Reiskulturboden nach von HIBLER, wo die Veränderung der Sporen in ovale Form plötzlich geschehen sollte, bekam ich auch keine positive Resultate. Die Sporenbildung geschah darin nicht normal und auch die Bazillen zeigten degenerative Veränderungen. Wohl musz anerkannt werden, dasz sich in diesem Nährboden einige Sporen bildeten, welche nicht vollkommen rund und auch nicht vollkommen endständig waren, aber bei Überimpfung von der Reiskultur in gewöhnlichen Stichagar, fand wieder die normale Sporenbildung ganz runder, vollkommen endständiger Sporen statt. Es ist mir also auf diese Weise nicht gelungen runde Sporen in elliptische Sporen zu verwandeln. Dies kann, was

dem Reissnährboden anbetrifft, vielleicht seine Ursache finden in der Bereitung, welche von von HIBLER sehr ungenau mitgeteilt wird. So spricht er über „ein wenig Reis,“ aber die Quantität gibt er nicht an; auch spricht er über stark alkalisches Lakmuswasser, aber wie stark das ist wird nicht mitgeteilt. Wohl habe ich beobachtet, dass der Nährboden durch den Wachstum der Tetanusbazillen von blau in rot verwandelt wurde, wie auch von von HIBLER angegeben war.

Was die Toxinbildung betrifft wird allgemein angegeben, dass zur Erlangung eines starken Tetanusgiftes nur Kulturen gebraucht werden müssen, welche sich unter strengen anaëroben Umständen befunden haben und dass die aërob bekommenen Gifte minderwertig sind. (Das Gift sollte von dem O. der Luft vernichtet werden). In Bezug auf unsere aërobe Tetanuskultur, welche ein Toxin lieferte, welches durch Einspritzung von $1/10.000.000$ cM³. weisse Mäuse innerhalb 3 Tage tötete, mag hier gewisz ein Fragezeichen aufgestellt werden. Es kann noch bemerkt werden, dass die minimale tödliche Dosis jetzt $1/100.000.000$ cM³. beträgt. Vielleicht ist die Zunahme der Toxizität zurückzuführen auf das wöchentlich Übersetzen der Kultur.

Der Verlauf der Toxinbildung ist in die Kurve A angegeben: 6 Stunden nach der Impfung, als die Bouillon noch ganz klar war, wurde eine geringe Quantität filtriert und mit diesem Filtrat Mäuse eingespritzt.

Die Maus, welche 0.1 cM³. empfangen hatte, zeigte einige Tage ziemlich heftige, lokale Tetanuserscheinungen (Schwanz und rechtes Hinterbein), aber genas, während die Maus, welche 0.05 cM³. empfangen hatte nach 3 Tagen an Tetanus starb. Schon nach 6 Stunden, als noch absolut keine Trübung an die Bouillon zu bemerken war, war die Bouillon schon toxisch.

Nach 1 Tage tötete $1/1000$ cM³. noch Mäuse

» 4 Tagen » $1/1000.000$ » » »

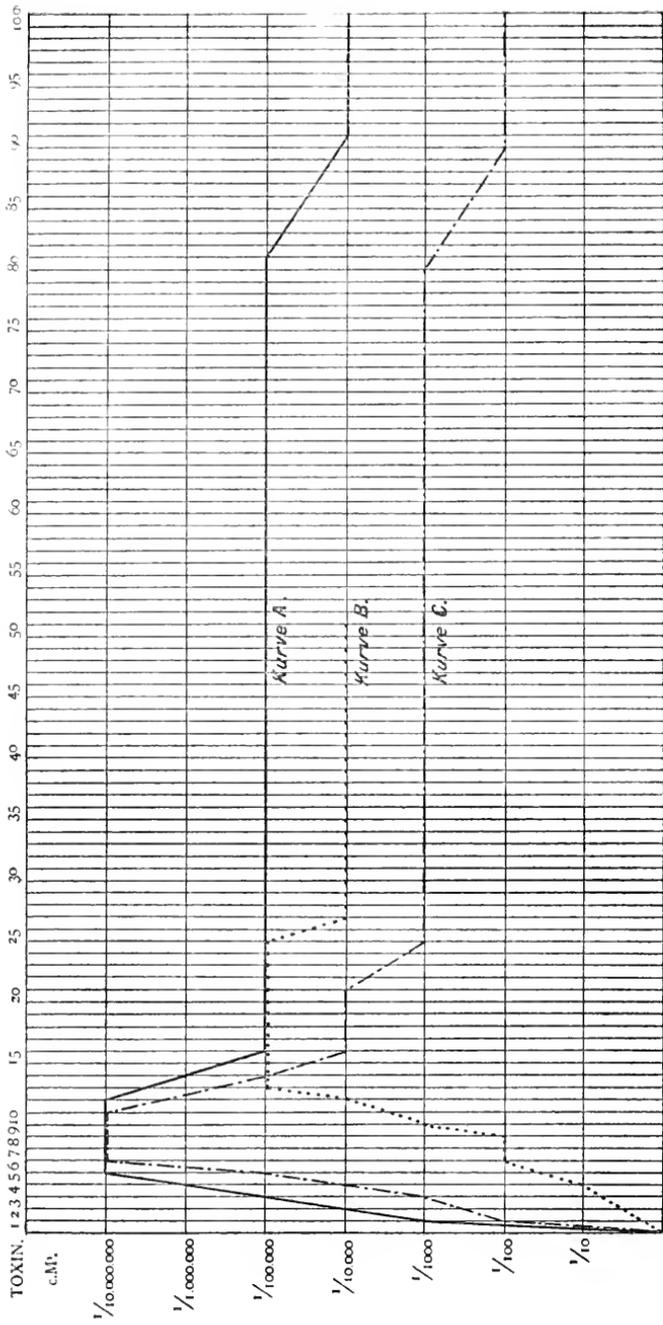
» 5 » » $1/10.000.000$ » » »

Es stellte sich heraus, dass mit der letzten Dosis das Maximum der Toxizität erreicht war. Dies blieb dasselbe vom 6^{ten} bis an den 11^{ten} Tag.

Nach 11 Tagen tötete $1/10.000.000$ cM³. noch Mäuse

» 13 » » $1/1.000.000$ » » »

TAGE



Nach 15 Tagen tötete	1/100.000	cM ³ .	noch Mäuse
» 18 » »	1/100.000	» »	»
» 24 » »	1/100.000	» »	»
» 30 » »	1/100.000	» »	»
» 40 » »	1/100.000	» »	»
» 50 » »	1/100.000	» »	»
» 60 » »	1/100.000	» »	»
» 70 » »	1/100.000	» »	»
» 80 » »	1/100.000	» »	»
» 90 » »	1/10.000	» »	»
» 100 » »	1/10.000	» »	»

Um zu entscheiden ob andere Bakterien, welche an die Luft wachsen, die Toxizität der Kultur noch steigern würden und vielleicht das Maximum der Toxizität mit einigen Tagen verlängern würden, wurde ein Kolben Bouillon geimpft mit dem aëroben Tetanusstamme und mit einem Streptokokkenstamme. Es stellte sich heraus, dass beide Bakterien sich ausgezeichnet zusammen entwickeln konnten.

Der Verlauf der Toxinbildung in dieser Mischkultur ist in der Kurve C sichtbar.

Nach 1 Tage tötete	1/100	c.M ³ .	noch Mäuse.
» 3 Tagen »	1/1000	» »	»
» 5 » »	1/100.000	» »	»
» 6 » »	1/10.000.000	» »	»

Mit der letzten Dosis war das Maximum erreicht. Dieses Maximum war also dasselbe als das der Reinkultur. Zwar wurde dieses Maximum einen Tag später erreicht, aber dies kann auf zufällige Umstände zurückgeführt werden.

Nach 8 Tagen tötete noch	1/10.000.000	c.M ³ .	Mäuse.
» 10 » » »	1/10.000.000	» »	»
» 13 » » »	1/100.000	» »	»
» 15 » » »	1/10.000	» »	»
» 18 » » »	1/10.000	» »	»
» 20 » » »	1/10.000	» »	»
» 24 » » »	1/1000	» »	»
» 28 » » »	1/1000	» »	»
» 30 » » »	1/1000	» »	»
» 40 » » »	1/1000	» »	»
» 50 » » »	1/1000	» »	»

Nach 60 Tagen tötete noch	1/1000	cM ³ . Mäuse.
» 70 » » »	1/1000	» »
» 80 » » »	1/1000	» »
» 90 » » »	1/100	» »
» 100 » » »	1/100	» »

Um zu entscheiden ob durch den O. der Luft bei fortwährender Einwirkung die Toxizität des Stammes abnehmen würde, wurde der Stamm, ausser in Stichagar auch auf schrägen Agar weitergezüchtet und beide Kulturen während 4 Monate wöchentlich übergeimpft. Was stellte sich jetzt heraus? Der Stichagarstamm war nach 4 Monaten noch ebenso toxisch wie zuvor (1/10.000.000 c.M³. Toxin tötete noch Mäuse). Aber sehr interessant war die Tatsache, dasz der schräge Agarstamm ganz avirulent geworden war. Selbst mit 0.5 c.M³. Kulturfiltrat konnte ich subkutan bei Mäusen keinen Tetanus mehr erzeugen. Durch das fortwährende Züchten an die Luft war der Stamm atoxisch geworden. Wir besitzen also in diesem schrägen Agarstamme eine Tetanuskultur, welche in 3 Hinsichten von einer gewöhnlichen Tetanuskultur abweicht:

- a. Er ist atoxisch;
- b. Er ist aërob.
- c. Er weicht morphologisch ab.

In der Literatur sind öfters aërobe, atoxische Tetanusbazillen beschrieben. So züchteten u.a. CARBONE und PERRERO einen solchen aëroben, avirulenten Tetanusbazil aus dem Bronchialsekret eines Tetanuskadavers, während VON TAVEL solch einen Bazil kultivierte aus einem entfernten Blinddarmfortsatz.

Auch Kruse gelang es in einem Fall einen avirulenten, atoxischen Bazil zu kultivieren, welcher morphologisch mit dem Tetanusbazil übereinstimmte.

Wo nun derartige Bazillen in der Literatur öfters als »Pseudotetanusbazillen« bezeichnet werden, so haben wir in unsrem schrägen Agarstamm den Beweis, dasz diese sogenannten »Pseudotetanusbazillen« in direktem Bezug stehen können mit *echten* Tetanusbazillen.

Weil die Tätigkeit von Serum in flüssigem Zustande nach einiger Zeit abnimmt, ist es empfehlenswert, wenn z.B. Sera

mehrere Jahre aufbewahrt werden müssen, das flüssige Serum in Pulverform zu verwandeln, weil der Titer der getrockneten Sera viel weniger abnimmt.

Für das Trocknen der Sera folgt man hauptsächlich 2 Herstellungsweisen, die Methode nach BRIEGER und FRÄNKEL mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und die Methode nach COURMONT und DOYON durch das Eindampfen in Vacuum. Diese letzte Methode verwendete Dr. SINNIGE, Chemiker am Reichsseruminstitut, beim Eintrocknen von Tetanusserum. Das Eintrocknen fand statt um zu entscheiden, ob das Serum durch das Trocknen vielleicht Schaden litt, m. a. W., ob der Titer des Serums vor und nach dem Trocknen derselbe war. Es ist selbstverständlich, dass alle Vorsorgen getroffen wurden um das Serum so wenig wie möglich zu schaden. Es wurde eingedampft bei einem Luftdruck von ungefähr 10 m.M. bei einer Temperatur von 25°C . (für höhere Temperatur musz man beim Eindampfen vorsichtig sein).

Das auf diese Weise bekommene Pulver wurde nun im Vacuum exsiccator über H_2SO_4 getrocknet. 100 c.M.³ Serum lieferte gerade 7 Gramme Pulver.

Mit diesem Pulver und dem flüssigen Serum (das aus derselben Versuchsflasche herrührte als das Serum, welches das Pulver geliefert hatte und welches während das Trocknen kühl und dunkel aufbewahrt war) wurden Versuche mit Mäusen angestellt. Als Toxindosis (die minimale tödliche Dosis war zuvor auf $1/1000.000$ c.M. bestimmt), wurde gebraucht $1/10.000$ c.M.; das ist hundertmal die letzte Dosis und diese Dosis wurde jedesmal gemischt mit fallenden Quantitäten Serum und Pulver und zwar von jedem Stoffe $1/10$, $1/100$, $1/1000$, $1/10.000$, $1/100.000$, $1/1000.000$ c.M.³. Das Pulver stimmte in Gewichtseinheiten mit dem Serumvolumen überein. Das Auflösen des Pulvers fand langsam und äusserst vorsichtig statt, während die Verdünnungen gemacht wurden mit destilliertem Wasser, weil in Na Cl Auflösungen das Neutralisierungsvermögen erhöht wird. Die Bindung von Toxin und Antitoxin fand statt in kleinen spitzigen Gläschen während einer halben Stunde bei 37°C ., worauf weisse Mäuse subkutan eingespritzt wurden. Dieser Versuch fiel soweit negativ aus, dass nur die Kontrolle Maus, welche $1/10.000$ c.M.³ Toxin empfangen hatte, nach 2 Tagen starb. Alle andere Mäuse

blieben am Leben, obgleich die Maus, welche $1/1000.000$ c.M.³ Pulver empfangen hatte, einen Tag krank war und tetanische Erscheinungen zeigte, aber schliesslich ganz wieder genes.

Dieser Versuch spricht aber wohl für den hohen Wert des Tetanusserums, weil $1/1000.000$ c.M.³ Serum noch im Stande war hundertmal die letale Dosis Toxin zu neutralisieren.

Der Versuch wurde nun auf dieselbe Weise wiederholt mit einer grösseren Quantität Toxin und zwar mit $1/1000$ c.M.³ oder tausendmal die letale Dosis.

Die Kontrolle Maus starb nach 2 Tagen, ebenso wie die Mäuse, welche zu gleicher Zeit $1/1000.000$ c.M.³ Serum und $1/1000.000$ c.M.³ Pulver empfangen hatten. Die Maus, welche eingespritzt wurde mit $1/100.000$ c.M.³ Pulver starb nach 3 Tagen und die Maus, welche $1/100.000$ c.M.³ Serum empfing, nach 4 Tagen. Alle anderen Mäuse blieben am Leben.

Obgleich sich also bei beiden Versuchen eine äusserst geringe Differenz in Tätigkeit, zum Nachteil des Pulvers, nicht leugnen lässt, ist diese Differenz so klein, dass praktisch angenommen werden mag, dass bei der Bereitung von Pulver aus flüssigem Serum, vorausgesetzt dass es geschieht mit Beobachtung aller Vorsorgen, die Tätigkeit des Serums nicht leidet.

TRYPANOSOMEN.

VON

Dr. Vet. A. VRIJBURG.

Die Geschichte der Trypanosomen datiert von den letzten 40 Jahren. Wohl waren vor dieser Zeit schon Trypanosomen entdeckt, so durch VALENTIN in 1841 bei Fischen (Forelle) und durch GLUGE in 1842 beim Frosch. Sie wurden anfangs als Amöben betitelt, in 1843 wurde durch GRUBY der Name Trypanosomen an diesen Protozoen gegeben.

Erst in 1845 wurde durch GROS in Russland bei den Säugtieren im Blut von einer Feldmaus u. eines Maulwurfes, Trypanosomen gefunden. CHAUSSAT sah in 1850 bei der Ratte (*mus ratus*) Trypanosomen, die er für junge Nematoden hielt.

In 1877 sah LEWIS in Calcutta bei ratten (*mus decumanus*) derselbe Parasit, der damals nach ihm Tryp.-Lewisi genannt wurde.

In den 80-ger Jahren wurden in Russland durch DANILEWSKY Trypanosomen im Blut von Eulen und andern Vogelsorten angetroffen. Der Eulentrypanosom wurde durch ihn Tryp-avium genannt. In späteren Jahren wurden in Deutschland bei Finken, in Frankreich bei Eulen in Afrika bei Finken und andern Vögeln, in Englisch-Indien bei Tauben, Trypanosomen gefunden. Bei Hühnern im Sudan, in Tonkin und unlängst, durch DE HAAN auf Java.

Bis hierher sind bei Vögeln 3 verschiedene Arten gefunden, sie kommen gewöhnlich sporadisch im Blute vor; die Art der Ansteckung ist noch unbekannt. Die meisten Vögel zeigten keine Krankheitserscheinungen u. im Allgemeinen ist der Trypanosoma kein Vogelparasit. Die hohe Körpertemperatur der Tiere scheint

für die Trypanosomen nicht günstig zu sein. Ein paar Mal gelang es, Hühner mit Säugetiertrypanosomen zu infizieren. (nagana). Mit Surraparasiten gelang mir die Infektion nicht.

In 1880 wurden zum ersten Mal bei grösseren Säugetieren Tryp. entdeckt und zwar durch EVANS in Englisch-Indien, der im Blute von an *Surra* leidenden Pferden der Parasit fand, der nach ihm *Tryp.-Evansi* genannt wurde und die Ursache der *Surra* ist. — In 1894 entdeckte BRUCE in Süd-Afrika bei einer genau auf *Surra* gleichenden Krankheit, der *Nagana*, ein Trypanosom, der seither *Tryp. Brucei* heisst. Im selben Jahre wurde durch ROUGET in Algier der *Tryp.-equiperdum* gefunden, die Ursache der *Dourine*, die auch in Europa vorkommende Beschälkrankheit der Pferde.

Seither wurden von verschiedenen Seiten Entdeckungen von Trypanosomen gemeldet bei verschiedenen Tierarten, hauptsächlich in Afrika. In 1901 wurden zum ersten Mal beim Menschen Trypanosomen gefunden, damals entdeckten FORDE und DUTTON in Gambia (Afrika) die Ursache der *Schlafkrankheit*, der *Trypanosoma-Gambiense*.

Die meisten Entdecker beeilten sich an den durch sie gefundenen Trypanosomen einen Namen zu geben. Es geschah daher mehrmals, dass derselbe Parasit verschiedene Namen bekam, dies Anleitung zu vielem Irrtum gab. Das Schwierigste ist, dass die meisten Trypanosomen einander sehr gleichen und auch die Biologie öfters wenig Unterschied zeigt.

Morphologie. Die Meisten haben einen langgestreckten einzelliger, weicher Protoplasmakörper, meistens an beiden Enden zugespitzt und von einer festeren Schichte, die *Pellicula* umgeben. Zwei Kernen; der eigentliche Kern ist gross, rund oder oval, liegt meistens ungefähr in der Mitte des Körpers und enthält ein Kernkörperchen.

Der zweite Kern, *Blepharoplast*, ist kleiner, rund, oval oder stäbchenförmig und liegt zwischen Hauptkern und Hinterende des Körpers. Die Lage differirt bei den verschiedenen Sorten und sie ist auch bei derselben Art nicht immer die Gleiche.

Der Protoplasma enthält öfters Körner (granula) die sich ebenfalls wie Kern und Blepharoplast mit Giemsa violettrot färben.

Bei einigen Sorten ist im Protoplasma noch ein linienförmiges Gebilde gesehen, das im ungefärbten Präparat als ein dunkler

Streifen in der Längsrichtung des Körpers läuft (Axialfaden—blackline).

Die Trypanosomen besitzen eine Geissel, *Flagella*, die am Blepharoplast anfängt, am Rande des Körpers entlang nach vorn läuft und bei den meisten Sorten als freie Flagella endet. Sie besteht aus einem Centrifaden, der von der Stelle, wo es aus dem Körper tritt, von einer Plasmahülle umgeben ist. Der Protoplasmasaum, zwischen Flagella und Körper, ist sehr dünn und wird der *undulierende Membran* genannt, weil er bei der Bewegung des Tieres, eine wellenförmige Bewegung macht. Flagella und undulierender Membran sind die Bewegungsorgane. Einige Forscher nehmen an, dass kontraktile Fibrillen unterhalb der Pellicula zur Bewegung beitragen.

Der Blepharoplast wird für das Bewegungscentrum gehalten und von *Laveran Centrosom* genannt. Es gelang aber, blepharoplastlose Tryp-stämme zu züchten; diese waren in ihren *Bewegungen* von den andern Sorten nicht zu unterscheiden. Die Bewegung ist eigenartig, schlangenförmig und etwas drehend und bohrend, gewöhnlich mit der Flagella voran, Rückwärtsbewegung ist jedoch auch möglich. Die Schnelligkeit der Bewegung ist bei den verschiedenen Arten nicht die gleiche, wahrscheinlich abhängig von der Länge der Flagella und undulierenden Membran.

Die *Ernährung* geschieht durch Osmose.

Die *Körperform* wird durch Flagella und Pellicula angegeben. Wird durch diese oder jene Ursache die Pellicula weich, dann gleitet der weiche Protoplasma von der Flagella ab und man bekommt allerlei ründliche Degenerations-Formen, die man oft in Culturen und unter Umstände auch im Blut vorfindet. Die *Grösse* der Trypanosomensorten ist sehr verschieden. Der kleinste, der bis hieher gefundene, der Tryp. Lewisi (Rattentryp.) ist nur 7—20 micron lang. Der Tryp. Theileri kann eine Länge von 75 μ erreichen. Bei Fischen sind noch grössere Sorten gefunden.

Die Form und die Grösse von einer und derselben Sorte kann einigermassen variieren, je nach der Tiersorte, wo sie parasitirt, so ist z. B. der Tryp. Brucei des Pferdes etwas länger, als dieselbe Sorte beim Meerschweinchen.

Die *Vermehrung* der Trypanosomen geschieht hauptsächlich durch *Längsteilung*. Der Blepharoplast und Kern teilen sich zuerst, hernach folgt der weitere Körper.

Beim Tryp. Lewisi beginnen öfters die Töchtertrypanosomen sich wieder zu teilen, bevor die erste Teilung abgelaufen ist. Man bekommt dadurch machmal allerlei Teilungsformen zu sehen. Ausser dieser *ungeschlechtlichen Vermehrung* (durch Teilung) wird allgemein eine *geschlechtliche Vermehrung* angenommen. Letztere soll sich in Körper der Zwischenwirte (Insekte) abspielen, wie dies auch bei den Haemosporidien (Malaria-plasmodien) der Fall ist. PROWAZEK beschrieb solche Entwicklungsformen der Tryp. Lewisi im Körper der Rattenlaus, und KLEINE, u. a. sahen Entwicklungsstadien der Tryp. Brucei und Tryp. Gambiense im Darmkanal von Glossinafliegen.

DOFLEIN hält es jedoch nicht für bewiesen, wohl aber für wahrscheinlich, dass man hier mit Geschlechtsformen zu tun hat.

Im Insektenkörper und auch bisweilen im Säugetiereblut sind hauptsächlich *drei* Typen gefunden: 1^e lange, schlanke Formen mit grossen Blepharoplast, 2^e breitere, mit vielen Granula, grosser Kern, kleinen Blepharoplast, kurzer Flagella, schmale undulir-Membran; erstere werden für männliche, die zweiten für weibliche Parasiten gehalten, 3^e neutrale Formen, welche den männlichen gleichen.

Bei dem *Schizotrypanum Cruzi* sind von CHAGAS und HARTMANN eigentümliche Formen gefunden in den Blutkapillaren und in Endothelzellen der Lunge und auch in andern Organen der infizierten Säugetiere.

Das Trypanosoma rundet sich nl. ab und zerfällt durch Schizogonie in kleinere Sprösslinge, welche Ähnlichkeit mit Leishmania-parasiten haben. Sie dringen in die roten Blutkörperchen ein, wachsen aus zu flagellaten Formen und kommen schliesslich als Trypanosomen frei, im Blutplasma.

SALVIN-MOORE und BREINL fanden bei Ratten, welche mit Tryp. Gambiense infiziert waren, während den Trypanosomenfreier Stadien der Krankheit, in Lungen, Knochenmark und Milz, kleine, runde Parasiten, durch Abrundung der Trypanosomen- und Abstossung der Flagella entstanden. Diese, von ihnen »latent bodies« genannten Gebilden, wachsen wieder zu Trypanosomen aus. Weitere Studien in dieser Richtung sind noch notwendig.

In den Fällen, wo Morphologie und Biologie im Stich lassen

beim Bestimmen der Trypanosomensorten, hält LAVERAN die Tier-immunität für das zuverlässigste Kriterium. Wenn z.B. ein Tier, immunisiert mit Stamm A, auch Stamm B gegenüber immun ist, und umgekehrt, dann sind A und B die gleiche Sorte. Das stimmt schon, aber bei Stämmen derselben Sorte aber verschiedener Virulenz, würde man mit dem LAVERAN'schen Kriterium geneigt sein, zwei verschiedene Sorten anzunehmen.

Die bei Bakterien üblichen Laboratoriumreaktionen, *Aglutination*, *Präcipitation-* und *Komplementablenkung*, sind für die Differential-diagnose der Trypanosen unter sich nahezu unbrauchbar — höchstens ist man im Stande durch die Komplementbindungsmethode verschiedene Gruppen verwandter Trypanosomen von einander zu trennen. Weiter ist durch diese Reaktionen zu bestimmen, ob eine gewisse Krankheit überhaupt durch Trypanosomen verursacht wird; auch latente Trypanosen kann man auf diese Weise diagnostizieren.

Meistens kommt man in diesen Fällen auch mit einfacheren Mitteln aus.

Ueber die *Zoologische Einteilung* der Trypanosomen und ihrer Verwandtschaft mit den anderen Blutparasiten, speziell mit den Malariaplasmodien und Piroplasmen, besteht noch Meinungsverschiedenheit. HARTMANN nimmt eine nahe Verwandtschaft an. DOFLEIN bringt Malariaparasiten und Piroplasmen näher bei den Coccidien.

Jedenfalls bestehen Uebergangsformen zwischen den verschiedenen Blutprotozoen; MAYER züchtete Halteridien aus Eulenblut, auf Blutagar und sah Kulturformen auftreten mit *Flagella*. Die bei Mensch, Affe und Hund vorkommenden *Leishmania*, die Ursache der *Kala-azar* und *Aleppo-beule* haben im Wirttier Aehnlichkeit mit gewissen Piroplasmen. In der Kultur (Novy-Agar) besitzen sie eine Flagella (jedoch ohne undulirender Membran). Zwischen den *Leishmania*-parasiten und den eigentlichen Trypanosomen steht die *Schizotrypanum Cruzi*, welche im Säugtierblut flagellate Formen zeigt und auch runde Formen ohne Flagella.

Zoologisch sind die Trypanosomen auch nahe verwant mit den Gattungen *Crithidia*, *Leptomonas* und *Herpetomonas*, welche als Darmparasiten bei Insekten (speziell Fliegen) vorkommen.

Entwicklungsstadien der Trypanosomen in Kulturen und im Fliegendarm sind von diesen Gattungen oft nicht zu unterscheiden.

DOLFEIN rechnet die drei genannten Gattungen auch zu der Familie der *Trypanosomidae*. Unter den *Flagellaten*, wozu diese Parasiten gehören, trifft man verschiedene freilebende Gattungen an, und andere welche in Körperhöhlen oder auf Schleimhäute leben, ohne unter normalen Umstände ihrem Gastwirt zu schaden. Es ist nun sehr gut denkbar, dass die Trypanosomen durch zufällige Umstände zu *Blutparasiten* geworden sind und sich allmählich an diese Lebensart angepasst haben.

Die Einteilung der Trypanosomen

ist provisorisch. MARTIN MAYER hat vom praktischen Gesichtspunkt aus folgende Einteilung vorgeschlagen:

Trypanosomen der Kaltblüter,

Trypanosomen der Vögel- und

Trypanosomen der Säugetiere. Letztere werden unterschieden in *Nicht-pathogene* (wozu *Tryp. Lewisi* und *Tryp. Theileri* gehören) und *pathogene*. Diese sind in zwei Gruppen einzureihen:

1^e welche bei natürlicher Infektion nur bei einer Tierart vorkommen, aber auf andere Tierarten übertragbar sind (hierzu gehören das *Tryp. Gambiense* der Schlafkrankheit, und die Trypanosomen der verschiedenen Pferdeseuchen. *Tryp. equiperdum* der Dourine, *Tryp. equinum* der Mal de caderas.

2^e die welche spontan bei verschiedenen Tierarten vorkommen: *Tryp. Evansi* (der Surra), *Tryp. brucei* (der Nagana) und verschiedene afrikanische Trypanosomen.

Im Ganzen sind bis jetzt ungefähr 16 verschiedene pathogene Sorten bekannt -- während einige noch ungenügend untersucht sind.

Die Uebertragung der Trypanosomenkrankheiten

von einem Tier auf das andere findet in der Natur meistens durch Insekten statt welche auf den betreffenden Tieren parasitieren; in den meisten Fällen sind das bestimmte Fliegenarten.

BRUCE zeigte, dass die *Glossina Morsitans* (Tsetse fliege) der Ueberträger der *Nagana* ist. Die Schlafkrankheit wird

gewöhnlich durch *Glossina-palpalis* verbreitet — die Surra durch *Tabanus*-arten. Die Uebertragung kann auf zwei Weisen stattfinden: erstens kann die Fliege einfach als Impfnadel dienen — dieses geschieht, wenn sie ein krankes, und bald darauf ein gesundes Tier sticht.

Zweitens kann das Trypanosoma im Fliegenkörper einen Entwicklungszyklus durchmachen, und der Stich der Fliege ist dann erst infektiös, sobald der Zyklus abgelaufen ist — das ist bei *Glossina* cirka 17 Tage.

Die Glossinen können auf beide obengenannten Weisen infizieren. Bei Tabaniden sind bis jetzt keine Entwicklungsstadien von Trypanosomen gefunden. Versuche mit Tabaniden sind gewöhnlich misslungen: wegen der Schwierigkeit, diese Fliege in der Gefangenschaft am Leben zu erhalten. Vorläufig glaubt man, dass die Tabaniden bei der Infektion nur als Impfnadel dienen. Ist das wirklich der Fall dann vereinfacht das die Bekämpfung der betreffenden Seuche. Eine infizierte *Tabanus* ist dann nach einem Tage schon nicht mehr infektiös, während eine infizierte *Glossina* wahrscheinlich lebenslang infektiös bleibt. (KLEINE in Deutsch-Ost-Afrika, konnte ein Tier Naganakrank machen, durch den Stich einer *Glossina*, welche 81 Tage vorher infiziert war).

Im Glossinenkörper hat höchstwahrscheinlich eine geschlechtliche Entwicklung des Trypanosoma statt: KLEINE fand bei *Glossina palpalis*, welche mit *Tryp. Gambiense* infiziert war, im Darm grosse, breite Trypanosomen mit vielen Granula im Protoplasma und mit *einem* oder mehreren Kernen und kurzem (bisweilen auch ohne) Flagella — er hält diese für weibliche (Macro) Gameten — Auch sah er schlankere, mit Giemsa rötlich-blaue gefärbte Formen mit langem, compactem intensiv rot gefärbtem Kerne welche er für männliche Gameten hält. Bei den schon infektiösen Fliegen waren die weiblichen Gameten am zahlreichsten.

Bei Fliegen, welche nur einmal trypanosomenhaltiges Blut gesogen hatten wurden nach einigen Wochen im Darm und Proboscis Parasiten gefunden, welche den Bluttrypanosomen ähnlich waren — diese bildeten wohl das End-stadium des Zyklus. Auch in den Speicheldrüsen wurden 25 Tage nach der Infektion ähnliche Formen angetroffen,

Die Trypanosomen gelangen zuletzt in den Rüssel der Fliege und werden mit dem Stich in das Warmblutige Tier geimpft.

BRUCE gelang es auch ein Tier zu infizieren mittels Einspritzung von trypanosomenhaltiger Darmflüssigkeit einer Fliege.

Nicht alle Glossinen, welche trypanosomenhaltiges Blut saugen, infizieren sich — nur ungefähr 10 % (nach Versuche von BRUCE und KLEINE). In einer Gegend Afrikas wo Nagana einheimisch war wurden eine grosse Zahl Glossinamorsitans gefangen — die meisten enthielten keine Trypanosomen — unter den infiziert gefundenen Exemplaren wurden dreimal die Parasiten im Rüssel gefunden gegen einmal im Darm.

Ausser Glossinen und Tabaniden können auch andere Fliegenarten gelegentlich Trypanosen übertragen; so z.B. *Stomoxys*-arten. Diese dienen dann einfach als Impfnadel.

Bei einigen Trypanosomen findet die Uebertragung durch andere Insekte statt: das Tryp. Lewisi der Ratte wird durch eine Rattenfloh und eine Rattenlaus übertragen — im Insektenkörper findet ein Entwicklungszyclus statt.

Das von CHAGAS und CRUZ in Brasilien entdeckte *Schizotrypanum-Cruzi* (das eine eigentümliche mit Fieber Drüenschwellungen Thyroïdeitis einhergehende Krankheit beim Menschen verursacht) hat als Zwischenwirt eine Wandlaus (*Comorrhinus Megistus*) und macht in diesem Insekt einen Zyclus durch, welcher 8 Tage dauert.

Bei einer Trypanose spielen die Insekten keine Rolle bei der Verbreitung, nl. bei der Beschälkrankheit der Pferde (Dourine) welche durch den Koitus übertragen wird. Sperma und Vaginalschleim enthalten die Trypanosomen, welche durch die intakte Genitalmucosa in den Körper des neuen Wirtes dringen. Der Grund, dass diese Krankheit nicht durch Insekten übertragen wird, liegt wohl in dem Umstand, dass die Parasiten in peripheren Blute in einer so geringen Zahl vorhanden sind, dass die Insekten nur wenig Gelegenheit haben sich zu infizieren.

Experimentel ist es gelungen die Dourine mittels Fliegenstich zu übertragen.

Die Eigenschaft, durch intakte Schleimhäute zu gehen, besitzen auch andere Trypanosomen. Es gelang mir eine Stute mit Surra zu infizieren indem ich mit einem Glasstäbchen ein wenig Schleim vom Penis eines Surrakranken Hengstes, auf die

intakte Vaginaschleimhaut der Stute übertrug (ohne einreiben).

Andere Trypanosen, z.B. Surra und Nagana, können ohne Zweifel gelegentlich durch den Koïtus übertragen werden, zumal bei Rindern. Die an diesen Krankheiten leidenden Pferde sind meistens zu schwach. Beim Menschen konstatierte KUDICKE Fälle von Schlafkrankheit bei Negerfrauen, welche höchstwahrscheinlich infiziert waren durch den Koïtus mit kranken Männern.

In der Natur ist jedoch die Infektion mittels Fliege die Regel.

Durch Impfung mit virulentem Blute kann man empfängliche Tiere inner infizieren. Die Virulenz der Trypanosomen schwächt nicht ab, wenn man den Zwischen-wirt, das Insekt, ausfallen lässt. Nur das Schizotrypanum Cruzi wird durch Tierpassagen weniger virulent.

Man nimmt gewöhnlich an, dass die Trypanosomen nicht durch die Placenta dringen. Ich infizierte ungefähr zehn schwangere Meerschweinchen mit Surra. In zwei Fällen hatten die neugeborenen Jungen Surra, waren also intra-uterin infiziert.

Die Trypanosomen sind *Parasiten der Körpersäfte* und hauptsächlich des *Blutplasma*. Einige Forscher behaupten Trypanosomen innerhalb der roten Blutkörperchen gesehen zu haben. Diese Beobachtungen sind zum Teil irrhümlich. CARINI sah aber in 1910 bei einem Trypanosome des Frosches in Brasilien, einige Male das Trypanosoma innerhalb der Erythrozyten. Auch vermutet CARINI, dass Tryp. Lewisi bisweilen in die roten Blutkörperchen dringt.

MESNIL und BRIMONT fanden in den Erythrozyten eines Faultieres (*Cholaepus didactylus*) trypanosomenähnliche Parasiten, welche sie *Endo-trypanum Schaudini* nannten. HÖHNEL will *Tryp. Congolense* innerhalb den roten Blutkörperchen gesehen haben. CHAGAS beschrieb *endo-globuläre* Formen seiner Schizotrypanum Cruzi (zumal im Anfang der Infektion) und BUCHANAN nahm auch dergleiche Entwicklungsstadien wahr bei Springmäusen infiziert mit Tryp. Brucei.

Man muss also heute annehmen, dass bestimmte Trypanosomen-arten unter gewissen Umständen in die roten Blutkörperchen eindringen können.

Die Krankheitssymptome

welche die verschiedenen Trypanosomen bei den höheren Tier-

arten veranlassen, sind hauptsächlich dieselben. Es sind: Fieber (meistens intermittierend). Anaemie, Oedeme und Milzschwellung. Dazu Symptome von der Seite des zentralen und peripheren Nervensystems. Die Anaemie wird nicht durch direkte Zerstörung der Erythrozyten hervorgerufen, wie bei Malaria und Piroplasmose, sondern die blutbildenden Organe (Knochenmark) werden wahrscheinlich durch die Toxinen der Parasiten geschädigt. Die Krankheitssymptome beruhen auf Toxinwirkung; wahrscheinlich auch hie und da auf Embolbildung in Kapillaren.

Die von einer Trypanose geheilten Tiere besitzen *Immunität*.

Diese Immunität dauert gewöhnlich nicht sehr lange. Es ist wahrscheinlich eine *Sterile Immunität*, im Gegensatz zu der Immunität bei verschiedenen anderen Protozöenkrankheiten (Piroplasmose z.B.) wo die immunen Tiere *nicht parasitenfrei* sind. Nach LAVERAN haben Ziegen (welche Tierart alle bekannte Trypanosen leicht durchsteht) eine Immunität von verschiedenen Jahren. Ich konnte in Niederl. Indien durch Versuche ermitteln, dass beim Rind die Immunität (gegen Surra) ungefähr ein Jahr dauert. Nach MANTEUFFEL währt die Immunität bei der Ratte (Tryp. Lewisi) durchschnittlich 3 Monate, und bei hyperimmunen Tieren höchstens ein Jahr.

Bei der Beurteilung, ob ein Tier geheilt ist, muss man vorsichtig sein, da oft parasitenfreie Perioden vorkommen ohne Krankheitssymptome. Blutimpfungen auf empfängliche Tierarten und biologische Reaktionen sind dann die Hilfsmittel.

Behandlung

der Trypanosen mit Therapeutica ist nicht immer notwendig. Bei verschiedenen Tierarten, zumal Rind, Ziege und Schwein, ist bei günstigen hygienischen Verhältnissen, Naturheilung die Regel. Bei Mensch, Pferd und Hund verlaufen die Trypanosen meistens tödlich.

In den letzten Jahren hat man bei der Behandlung guten Erfolg gehabt mit Arsenikumpräparate (As_2O_3 und Atoxyl), Tact-emeticus, und Stibium sulphuratum. Bei Surra werden gewöhnlich zwei dieser Mittel abwechselnd gegeben. Hohe Dosen sind notwendig, und Vergiftungen sind dadurch bisweilen nicht zu vermeiden. Bei niedrigen Dosen werden nicht alle Parasiten

abgetötet. Man nimmt gewöhnlich an, dass die Ueberlebenden sich an das Mittel gewöhnt haben, *giftfest* geworden sind. Vielleicht sind es einfach die kräftigsten Individuen, welche am Leben bleiben.

Auch mit *Salversan*-behandlung hat man bei der Surra Erfolg gehabt.

Serumbehandlung, mit Immunserum, hat in der Praxis Fiasko gemacht. Es hat keine kurative Wirkung. Einige Forscher haben eine kurze prophylaktische Wirkung beobachtet. Man würde während dieser passiven Serumimmunität, activ immunisieren können, mit virulentem Blut, z.B. Aber noch davon abgesehen dass man auf diese Weise viele neue Infektionsherden schafft, ist diese Methode in der Praxis oft nicht lohnend wegen der kurzen Dauer der aktiven Immunität.

MANTEUFFEL fand dass bei Tryp. Lewisi das Immunserum sogar 24 Stunden vor oder nach der Infektion eine schützende Wirkung hatte — jedoch trat oft trotz des Serums eine leichte Infektion auf — *blieb letztere aus, so war das betreffende Tier nachher nicht activ-immun.*

Ein von SURRA geheiltes Rind (Zebu) wurde durch wiederholter Injektionen mit virulentem Blut hyperimmun gemacht. Als ich nachher mit diesem Immunserum Pferde und Meerschweinchen behandelte, war *durchaus keine schützende oder heilende Wirkung* zu konstatiren.

Man hat wiederholt versucht die Trypanosomen durch *Tierpassagen* weniger virulent zu machen, in der Hoffnung auf diese Weise eine Immunisierungsmethode zu finden. Bis jetzt ohne *praktischen* Erfolg. MARTINI gelang es, einen virulenten Naganastamm durch über 100 Passagen durch weisse Mäuse, so zu mitigieren, dass er ein Esel nur noch leicht krank machte und nicht tötete (wie dies die Regel ist). Als diese Esel nachher mit einem virulenteren Stamm geimpft wurden, erkrankten sie wieder, blieben jedoch am Leben.

Ich versuchte das Surra-trypanosoma zu mitigieren durch Zebupassagen. (Das Zebu ist zwar empfänglich für Surra, heilt aber leicht bei guter Pflege). Ein Surra-Stamm der in zwei Jahren elf Zebu-passagen durchgemacht hatte, war für Pferde noch gleich virulent geblieben. Ein mitigierter Stamm auf andere, empfänglichere Tierarten übergeimpft, erlangt bald wieder seine alte Virulenz.

Weiters sind Tiere, welche mit einem mitigierten Stamme immunisirt sind, nicht unempfindlich geworden für anderen virulentere Stämme desselben Trypanosomas.

Auch hat man probirt Tiere zu immunisiren mittels *in Vitro*-gezüchteten Trypanosomen. [Die meisten pathogen Trypanosomen lassen sich nicht *in Vitro* züchten. Nur mit Tryp. Brucei gelingt es dann und wann (im condens wasser von NOVY'schen Blutagar). Den Surraparazit konnte LAVERAN nur einmal während kurzer Zeit züchten. Das Schizotrypanum Cruzi wächst auf NOVY-agar. Von den anderen Blutprotozoen wachsen auch die Leishmania's auf NOVY-agar. Die Malariaplasmodien sind neulich zum ersten Mal *in vitro* Kultivirt durch BASS und JOHNS in Amerika und zwar in defibrinirtem Blut wobei Dextrose zugefügt wurde. Ich probirte nach den BASS und JOHNS'sche Methode Piroplasma bigeminum zu züchten. Die Parasiten vermehren sich während den ersten Tagen, dann gingen sie ein.]

Impfung mit jungen bei *Zimmertemperatur* gezüchteten Tryp. Brucei-Kulturen (bis zu ± 22 Tage) verursacht die ungeschwächte Krankheitsform; ältere abgeschwächte Kulturen ebenfalls, nur mit längerer Inkubation. Alte, avirulente Kulturen (± 100 Tage) oder abgestorbene Kulturen veranlassen keine Krankheit, aber auch keine Immunität.

Bei 37° gezüchtet verlieren die Naganatrypanosomen schon nach 2 Tagen ihre Virulenz.

Immunisieren mittels abgetöteter Trypanosomen ist mehrmals versucht worden, meistens mit wenig Resultat.

SCHILLING berichtete neulich, dass er kleinere Versuchstiere und auch ein paar Hunde und Pferde gegen Nagana immunisirt hat, indem er sie Trypanosomen aus Rattenblut, durch Centrifugiren gesammelt und durch hinzufügen von Tart. emeticus getötet, den Tieren einspritzte. BRAUN und TEICHMANN immunisirten mit *Nagana-trypanosomen aus Rattenblut*, centrifugirt, gewaschen und bei *Zimmertemperatur getrocknet*.

Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen waren, nach Vorbehandlung mit diesem Antigen, immun gegenüber der Infektion mit virulentem Blut. Man brauchte jedoch grosse Dosen Antigen (und verhältnissmässig für Mäuse grössere als für Kaninchen). *Auch dauerte die Immunität nur kurze Zeit* bei den Mäusen

von 3 Wochen bis \pm 5 Monate. Von 8 Meerschweinchen konnten nach 85 Tagen 6 wieder infiziert werden. Nur verlief die Infektion viel langsamer als bei den Kontrolltieren. Beim *Rind* glückte eine derartige Immunisierung *nicht*; vielleicht waren die Antigendosen zu niedrig:

Zwei Rinder (von circa 200 K.G.) bekamen, jedesmal mit einer Woche Zwischenzeit, vier Einspritzungen von je 0,5 Gram. Nagana-trypanosomen Stamm. 4 + 0,5 gram. Stamm. S. Eine Woche nach der letzten Injektion infizierte man die Tiere (jedes bekam $\frac{1}{4}$ der Blutmenge, welche man erhielt durch Verblutung einer Naganakranken Ratte). *Die Rinder erkrankten, waren also nicht immun.* Bevor der Infektion hatte man ihr Blutserum auf Anti-Körper untersucht. Nur das Serum von einem der Rinder schützte nach Einspritzung einer Maus, diese einigermassen (unvollkommen) gegen nachherige Infizierung mit Stamm 4. Gegen Stamm S. waren also keine Antikörper gebildet und gegen Stamm 4 nur wenige bei einem der Rinder.

Die nachherige Infizierung der Rinder mit virulentem Rattenblut war gewiss viel stärker als die natürliche Infektion (durch Fliegenstich), aber dennoch ist es *sehr fraglich*, ob *Immunisierung mittels abgetöteten Trypanosomen* praktisch brauchbar sein wird. Bis jetzt sind die Methoden zu unsicher und zu umständlich.

Die *nicht-pathogenen Trypanosomen der grösseren Haustiere* und speziell die des Rindes, bilden wahrscheinlich *eine* Sorte das *Trypanosoma Theileri*.

Dieses wurde in 1903 zuerst von THEILER in Süd-Afrika gesehen. Es unterscheidet sich morphologisch von den anderen Säugetier-trypanosomen durch seine Grösse, 30—70 u. zu 2—5 u. Ausserdem liegt der Blepharoplast gewöhnlich nicht in der Nähe des Hinterendes, sondern mehr in der Mitte des Körpers und in der Nähe des Kernes.

Biologisch ist auffallend dass es sich, ebenso wie das wenig pathogene Tryp. Lewisi leicht in Vitro kultiviren lässt.

In Englisch-Indien fand LINGARD und in Kaukasien LUIIS ähnliche Trypanosomen bei Rindern.

Miyajima in Manila mischte Blut von Rindern, welche am Piroplasmose litten, mit Bouillon, und stellte es in den Brutkasten, mit den Absicht Piroplasmen zu züchten. Nach einigen

Tagen sah er in den Röhrchen Flagellaten, welche er für Entwicklungsstadien seiner Piroplasmen hielt und als solche beschrieb. MARTINI, der diese Versuche nachprüfte, kam zum Schluss, dass die Piroplasmen in der Kulturflüssigkeit abgestorben waren, und dass die Flagellaten Trypanosomen waren, welche aus dem Rinderblut stammten. Sie waren wahrscheinlich im kreisenden Blute in so geringer Zahl vorhanden, dass sie bei der directen Blutuntersuchung nicht gefunden wurden.

Seitdem sind in vielen Ländern durch diese »Kulturmethode« Trypanosomen im Rinderblut gefunden. Bei direkter Blutuntersuchung ist der Parasit meistens nicht zu finden, wohl aber ausnahmsweise, und es handelt sich dann gewöhnlich um Fälle, wobei die Thieren zugleich zeit an einer andern (akuten und schweren) Krankheit leiden, z.B. Piroplasmose, Milzbrand, Rinderpest. Das Vermuten liegt nahe, dass in diesen Fällen die Trypanosomen von der verminderten Resistenz des Gastwirthes profitieren, um sich zu vermehren.

(Ich schwächte ein mit Tryp. Theileri infiziertes Rind, durch wiederholte schwere Aderlässe. Auf den Trypanosomengehalt des Blutes blieb dieses Verfahren ohne Einfluss).

KNUTH und BEHN (Deutschland) sahen bei einem Kalb das mit Trypanosomenhaltiges Blut geimpft war, die Parasiten während einigen Tagen bei direkter Blutuntersuchung. Das Kalb hatte auch Fieber.

PETERS (Uruguay) traf auch einige Male bei direkter Blutuntersuchung die Trypanosomen. Die betreffenden Thiere hatten keine Krankheitssymptome, nur Milzschwellung. Neulich erwähnte KNUTH einige Fälle von Milzschwellung bei Schlachtochsen. In einem der Milze, wie auch in Leber und Niere desselben Rindes wurden in Objektglasausstrichen Trypanosomen gefunden. Die Thiere zeigten beim Leben keine Krankheitssymptome. *Subjektive* Symptome vielleicht schon, und es ist nicht unwahrscheinlich, dass das Trypanosoma-Theileri unter gewissen Umständen, zumal in Symbiose mit anderen Krankheitskeimen (Piroplasmen z.B.) im Stande ist, auch *objective* Krankheitssymptome hervor zu rufen.

In *Holland* haben cirka 27 % der Rinder von zwei Jahren und älter, Trypanosoma-Theileri im Blut. Die Kälber sind beinahe immer trypanosomenfrei.

In Deutschland und Griechenland sind auch bei einigen gesunden *Schafen* Trypanosomen gefunden. Ob es dieselbe Art ist, ist noch nicht festgestellt.

Die Art der Infektion ist für Europa noch nicht sicher bekannt. Sehr wahrscheinlich sind Fliegen die Vermittler.

In Süd-Afrika konnte THEILER mittels *Hippobosca rufipes* die Infektion übertragen.

Die Frage, *wie lange die infizierten Rinder ihre Trypanosomen behalten*, ist noch nicht gelöst. Eine Kuh deren Blut ich während den letzten zwei Jahren von Zeit zu Zeit untersuchte, enthält noch immer Trypanosomen. Ein junges Rind, welches im vorigen Winter parasitenfrei war, hatte in October Trypanosomen im Blut; hatte sich wahrscheinlich diesen Sommer auf der Weide infiziert.

Nach THEILER besitzen Rinder, welche eine Tryp. Theileriinfektion überstanden haben, Immunität.

Es gelingt leicht, durch Einspritzung mit frischem trypanosomenhaltigem Blut, gesunde Rinder zu infizieren. Nach einer Inkubation von circa neun Tagen sind beim geimpften Tier die Trypanosomen mittels Kulturmethode nachzuweisen. Infizierung von Kälbern glückt nicht immer. THEILER impfte auch ohne Erfolg Pferde, Schafe, Ziegen, Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse. Mir gelang es ein Pferd zu infizieren; das Tier hatte 16 Tage nach der Impfung Trypanosomen (durch Kultur nachgewiesen) — ein Monat später war das Blut dieses Pferdes wieder parasitenfrei.

MARTINI (Manila) impfte mit Erfolg Rinder, mit jungen Blutbouillonkulturen. Ich konnte auf diese Weise keine Kälber infizieren und meine mit Kulturen geimpften Kälbern waren nicht immun geworden und konnten nachher mittels Blutimpfung infiziert werden.

Die Zahl der Parasiten bei der latenten Infektion ist nicht immer die Gleiche. Bei den holländischen Rindern war durchschnittlich auf je 3—8 Tropfen Blut ein Trypanosom.

Die Trypanosomen gedeihen am Besten in Blutbouillon (1 : 1 à 2).

Man findet sie an der Grenze zwischen Serum und Blutkörperchen, in der Leukozytenschicht. Auch das Condenswasser von Blutagar ist ein sehr guter Nährboden. Bis jetzt konnte

ich die Parasiten, bei Zimmertemperatur ($\pm 18^{\circ}$ C), in Blutagar 6 Monaten, und in Blutbouillon höchstens $5\frac{1}{2}$ Monat kultiviren. Es scheint, dass sie doch zuletzt in dem künstlichen Medium ihre Lebenskraft einbüßen. Oefteres Ueberimpfen nützt nicht — meistens mislang schon die dritte Ueberimpfung in Blutbouillon.

Nach 3—5 Tagen ($18-22^{\circ}$ C) sieht man in den Kulturen die ersten Trypanosomen erscheinen. Während den ersten Tagen treten viele flagellenlose Parasiten auf, von der Grösse eines Erythrozyten oder auch grösser, rund oder oval mit Kern und Blepharoplast. Am 6^{ten} Tag sieht man flagellate und Teilungsformen. In älteren Kulturen (schon von 7^{ten} Tage an) kann man verschiedene Degenerationsformen beobachten.

Die Grösse der erwachsenen Kulturtrypanosomen ist 20—50. zu 2—3 μ , das freie Flagellastück misst 10—20 μ . BEHN behauptet, runde flagellalose Kulturtrypanosome innerhalb Leukozyten, gesehen zu haben. Ich sah dieselbe nur extra-cellulär. Es ist möglich dass die kleinen Parasiten ohne Flagella auch im Rinderblut (in vivo) vorkommen. Ungefärbt sind sie von Leukozyten nicht zu unterscheiden.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Technischen Hochschule in Delft.)

EINFLUSZ EINIGER KOLLOIDE AUF DIE ALKOHOLGÄRUNG 1)

VON

DR. N. L. SÖHNGEN.

EINLEITUNG.

Die interessanten Resultate, welche KRZEMIENIEUWSKI 2) erhielt bei seinen Untersuchungen über den fördernden Einfluss, welchen roher Humus auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter in dem BEYERINCK'schen Kulturmedium ausübt, indem dagegen mehr gereinigter Humus diese Eigenschaft nicht oder viel weniger besass, veranlassten, dass mehrere Untersucher, wie REMY, RÖSING 3) und KASERER 4), über diese Frage weitere Untersuchungen anstellten. Sie erwiesen, dass kolloïdales Eisen- und Aluminiumoxyd die eigentlichen im rohen Humus vorhandenen Verbindungen seien, welche das Wachstum des Azotobakters beschleunigten.

Bei meinen Untersuchungen über den Einfluss einiger Kolloide auf den Verlauf mehrerer Mikrobenprozesse wurde dieser auch bei der Alkoholgärung verfolgt. DZIERBICKI 5) untersuchte schon in wiefern Humussäure und Humussäuresalze den Prozess der Alkoholgärung beeinflussten. Er stellte fest, dass Humusverbindungen einen günstigen Einfluss auf den Hefewuchs so wie auf die Alkoholbildung ausüben.

ROSS VAN LENNEP 6), der den Einfluss fester Körper auf

1) Noch einem in der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie am 19. Dezember 1912 gehaltenen Vortrage.

2) Centralbl. für Bakt. 1909. Abt. 2 Bd. 23 S. 161.

3) » » » 1911. » 2 » 30 » 349.

4) » » » 1911. » 2 » 30 » 509.

5) » » » 1909. » 2 » 25 » 296.

6) Folia Microbiologica Heft 3 1912. Influence des substances fixes sur l'anaërobiose dans les milieux de cultures liquides.

die Anaerobiose studierte, stellte auch Versuche an über deren Einfluss auf die Alkoholgärung und die Gärung von *B. coli* in Bouillon-glucose bei 37° C. Beide Prozesse verlaufen bei Anwesenheit von Filtrierpapier im Kulturmedium schneller; die Gasbildung in beiden Kulturen sowie auch die Milchsäurebildung durch *B. coli* werden gefördert. Er schrieb die günstige Wirkung des Filtrierpapiers dem schnellen Entweichen der Kohlensäure aus dem Medium zu, wodurch darin eine niedrigere Kohlensäurekonzentration entsteht.

Da nun meine Untersuchungen erwiesen haben, dass der Einfluss der Kolloide auf die Alkoholgärung in unmittelbarem Zusammenhang steht mit dem Einfluss, welche sie auf die Konzentration der Kohlensäure in der Kulturflüssigkeit ausüben, werde ich die wichtigsten Arbeiten, welche über den Einfluss der Kohlensäure auf den Alkoholprozess handeln, kurz zusammenfassen.

Im Jahre 1886 ist von DELBRUCK und FOTH 1) durch zahlreiche Versuche nachgewiesen, dass die ohne jegliche Bewegung bewerkstelligte Entfernung der Kohlensäure den Verlauf der Gärung fördert. Unter sonst ganz gleichen Verhältnissen vergärten z. B. drei mit gleichen Hefemengen angestellten Würzen

am Saccharometer bis zu	und erzeugen dabei an Hefe
1 bei $\frac{1}{2}$ Atmosphäre Unterdruck 6,8°	18 gr.
2 bei Normaldruck 8,2°	12 „
3 bei $\frac{1}{2}$ Atmosphäre Überdruck 9,3°	10 „

In seiner wichtigen Arbeit, De theorieën der alcoholgisting sagt ABERSON 2), dass der hemmende Einfluss der Kohlensäure auf die Alkoholgärung grösser sein wird als derjenige des Alkohols. Es gelang diesem Untersucher den Prozess der Alkoholgärung mittels Kohlensäuredruck völlig zu hemmen, indem er in ein kupfernes Rohr, welches die Kultur enthielt, schnell ein wenig feste Kohlensäure brachte und dasselbe darauf verschloss. Es fand in dieser Kultur infolge der Kohlensäurespannung keine Gärung statt.

1) DELBRUCK. Zeitschrift f. Spir Ind. 1886 cit, KOHL. Die Hefepilze, S. 153.

2) ABERSON De theorieën der alkoholische gisting. Chemisch Weekblad 1903—1904 blz. 133, 149 en 161.

In der Gärungsindustrie ist es von allgemeiner Bekanntheit, dass Trebern und Gärfaden die Alkoholgärung fördern durch Austreiben der Kohlensäure aus der Flüssigkeit.

Bei der Luftheferfabrikation ist es von grösster Bedeutung, dass die Entfernung der Kohlensäure möglichst weit getrieben wird. So sagt KIBY 1) auf Seite 574 seines Handbuches: »Es musz daher Luft in solchen Mengen eingeblasen werden, dass die Kohlensäure nicht bloss verdrängt, sondern auch mit Luft so weit verdünnt wird, dass sie nicht mehr hemmend zu wirken vermag.

Aus obigen Tatsachen leuchtet die Bedeutung der Kohlensäurekonzentration auf in alkoholischer Gärung begriffenen Kulturmedien ein.

Zur Erklärung dieses Einflusses der Kohlensäurekonzentration, welche wie wir sehen werden durch die Anwesenheit bestimmter Kolloide bedingt wird, können nachstehende Möglichkeiten als Ursachen angenommen werden.

- 1^e Die Gärungsfunktion der Hefe wird geändert.
- 2^e Die Wuchsgeschwindigkeit der Hefe wird geändert.
- 3^e Die Gärungsfunktion und die Wachstumsgeschwindigkeit werden geändert.

I. Einfluss der Kolloide auf die Gärungsfunktion.

Der Einfluss der Kolloide auf die Gärungsfunktion zeigt sich wenn wir die Gärungen mit und ohne Kolloid unter solchen Umständen vor sich gehen lassen, dass Hefewachstum ausgeschlossen ist. Dies wird der Fall sein, wenn Gärungen stattfinden zwischen der Maximumtemperatur des Hefewachstums und der der Gärungsfunktion, jedoch unterhalb der Temperatur, wobei während des Versuches Absterben der Hefe stattfindet. Dann allein werden Veränderungen in der Geschwindigkeit des Prozesses durch Kolloide die Folge sein von Veränderungen in der Gärungsfunktion, verursacht durch diese Verbindungen.

Zuerst soll die Maximumtemperatur des Hefewachstums bestimmt werden. Nach PEDERSEN beträgt die Maximumtemperatur des Hefewuchstums 40° C.

1) KIBY. Presshefenfabrikation, S. 574.

Bestimmung der Maximumtemperatur des Hefewachstums.

Er stellte sie in folgender Weise fest: Eine mit einer bestimmten Anzahl Hefezellen geimpfte Serie Kulturen von Malzextrakt wurde während 24 Stunden bei verschiedenen Temperaturen gestellt und nachher wieder die Anzahl Zellen darin bestimmt. Es stellte sich heraus, dass in den Kulturen auf 40°C und höher kein Hefewachstum mehr stattfand; wohl aber bei niedrigeren Temperaturen. Ich gelangte zu demselben Resultat durch direkte Beobachtung des Hefewachstums in hängenden Tropfen unter dem Mikroskop bei verschiedener Temperaturen; bei 35°C wurde innerhalb zwei Stunden noch Vergrößerung der Hefeknospen wahrgenommen; bei 37° — 38°C fand während zwei Stunden kein Wachstum der Knospen mehr statt.

Die Maximumtemperatur des Hefewachstums ist also ungefähr 38°C . Es musste nun festgestellt werden bei welcher Temperatur die Kultur während der Versuchsdauer, ohne Schädigung der Gärungsfunktion stattfinden kann.

Fräulein VAN AMSTEL ¹⁾ stellte fest, dass Preszhefe während 20 Minuten auf 45°C erwärmt werden kann ohne Schädigung der Gärungsfunktion. Da nun die Dauer meiner Versuche, auf Grund einiger Vorversuche maximal auf zwei Stunden gestellt war, musste bei einer niedrigeren Temperatur als 45°C vergoren werden; denn die Gärungsfunktion nimmt beim Erhitzen der Hefe während dieser Zeit auf 45° mit fast 40 % ab.

Nach einer zweistündigen Kultur bei 38° — 40°C findet keine nennenswerte Abnahme der Gärungsfunktion statt. Drei Versuche zeigten, dass die Gärungsfunktion resp. um 3 %, 6 % und 2 %, also im Mittel um nur 5 % abgenommen hatte.

Die Bestimmung der Abnahme der Gärungsfunktion bzw. des Hefewachstums in Kulturen (5 Gr. Hefe, 5 Gr. Glucose, 50 c.M³. destilliertes Wasser) wurde in folgender Weise ausgeführt. Die Kultur wurde während einer bestimmten Zeit auf die erforderliche Temperatur gestellt, dann zentrifugiert und die klare Kulturflüssigkeit abgegossen. Mit dieser Hefe wurde die Gärungsge-

¹⁾ De temperatuursinvloed op physiologische processen der alcoholgist.
Dissertatie 1912 Technische Hoogeschool te Delft. J. E. van Amstel.

schwindigkeit mit einer neuen Kulturflüssigkeit (5 Gr. Glucose, 50 c.M³. destilliertes Wasser) bestimmt.

Als Gärungsgeschwindigkeit gilt bei diesen Versuchen die Anzahl c.M³. Kohlensäure, welche während zehn Minuten durch die Kultur bei 30° C entwickelt wird, wenn zwischen den ersten 150 und 400 c.M³. entwickelte Kohlensäure gemessen (die Geschwindigkeit der Gasentwicklung ist zwischen diesen Anzahlen c.M³. Kohlensäure fast konstant).

Tabelle der Gärungsgeschwindigkeiten.	cM ³ . Kohlensäure in zehn Minuten.
Nicht vorher erwärmte Kultur	50
Nach einer Stunde Erhitzen bei 35° C	55
» » » » » 38° C	50
» » » » » 40° C	50
» » » » » 45° C	32
» zwei Stunden » » 40° C	47
» drei » » » 38° C	50

Das Vorhandensein von Kolloiden in den Gärungen während der Erwärmung bringt keine Änderung in den erhaltenen Resultaten; diese stimmen mit den obenerwähnten überein.

Aus diesen Zahlen geht hervor, dass bei einer Gärung auf 35° C während einer Stunde noch ein geringes Hefewachstum stattfindet; zwischen 38°—40° C *wächst die Hefe nicht und nimmt die Gärungsfunktion auch während zwei Stunden nicht ab.*

Zur Bestimmung des Einflusses der Kolloide auf die Gärungsfunktion ist es also notwendig die Gärung zwischen 38°—40° vor sich gehen zu lassen.

A. Einfluss der Humussäure und der humussäuren Salze auf die Geschwindigkeit der Alkoholgärung.

DZIERBICKI's Untersuchungen veranlassten, dass ich zuerst den Einfluss der Humussäure und ihrer Salze auf die Geschwindigkeit der Alkoholgärung untersuchte. Die bei diesen Versuchen erhaltenen Resultate waren jedoch wider Erwartung nicht sehr ermutigend, weil diese Stoffe den Prozess nicht beschleunigen, wie es DZIERBICKI mitteilt, sondern hemmen. Humussäure und Calciumhumat üben eine wenig hemmende Wirkung aus, wenn

sie frisch niedergeschlagen aus einer Lösung von Natriumhumat und gewaschen mit destilliertem Wasser sind. Als Pulver hinzugefügt nachdem sie getrocknet sind, erhöhen sie die Gärungsgeschwindigkeit ein Wenig. Natrium-Kalium- und Ammoniumhumat sind in einer Konzentration von $1/20$ % noch schädlich; diese Kulturen fangen meistens nicht sofort zu gären an, aber erst nach einigen Stunden mit geringer Geschwindigkeit, dann nimmt die Gärungsgeschwindigkeit zu, erreicht jedoch nie diejenige der Kulturen ohne Humate.

Offenbar üben die Humate also einen schädlichen Einfluss auf die Alkoholgärung aus.

Diese Resultate sind also denjenigen DZIERBICKI's streitig.

Inzwischen war festgesetzt worden, dass durch Hinzufügung von sterilisierter und nicht sterilisierter Erde zu den gärenden Kulturen, die Geschwindigkeit des Prozesses bedeutend gefördert wird, sodass vorausgesetzt werden darf, dass andre Körper als Humus die günstige Wirkung ausüben.

Zu denen gehören kolloïdales Eisen- und Siliciumoxyd (welche in den Kulturen bald teilweise ausflocken) nicht, denn auch diese Verbindungen hemmen die Geschwindigkeit des Prozesses und geben dieselben ungünstigen Resultate wie die Versuche mit Humussäure. Die Gärungsgeschwindigkeit wird ebenso einigermaßen gehemmt, wie aus einer Serie Versuchen hervorging, durch Gelatine, Arabisches Gummi und Agar-Agar.

B. Einfluss anderer Kolloide auf die Geschwindigkeit der Alkoholgärung.

Die folgenden Versuche über den Einfluss welche die Fasern, die Biokolloïde, auf den Prozess ausüben wurden mit Torf, Filtrierpapier und Blutkohle angestellt und gaben überzeugende Resultate.

In wiefern jedoch diese Kolloïde in der Tat die Gärungsfunktion ändern, werden die folgenden Untersuchungen zeigen. Als am meisten dazu geeignetes Kolloid wurde Filtrierpapier angewendet, weil es gar keine für die Hefe assimilierbare Verbindungen enthält und sich durch grosse Reinheit auszeichnet. Zu den Kulturen (5 Gr. Hefe, 5 Gr. Glucose, 50 cM.³ Hefewasser) wurden 1.5 Gr. Filtrierpapier von SCHLEICHERT und SCHÜLL No. 509 hinzugefügt, in Stückchen von $\pm 1/4$ cM².

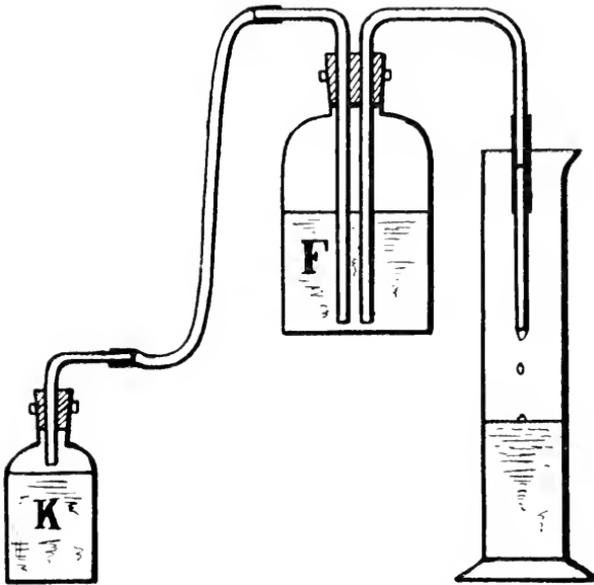


Fig. 1. Gärungsapparat (beschrieben auf Seite 100).

K. Kulturflasche.

F. Flasche von MARIOTTE.

Die Gärung fand statt in Fläschchen von $\pm 100 \text{ cm}^3$, versehen mit Gummistöpsel und Glasrohr, welches letztere an das Rohr einer Flasche von MARIOTTE verbunden wurde. Fig. 1. Diese Flasche war mit Kohlensäure und Kochsalz gesättigtem Wasser gefüllt. Das Ablesen der gebildeten Kohlensäure geschah durch Messen des verdrängten Wassers aus der Flasche in einem Meszzyylinder, welcher unter dem Rohre aufgestellt war.

In der Kulturflasche findet die Kultur stets unter demselben (hier atmosphärischen) Druck statt, was bei diesen Gärungen von Bedeutung ist.

In unterstehenden Tabellen sind die Resultate einer Anzahl Gärungen mit und ohne Filtrierpapier gesammelt worden; darin bedeutet F Gärung versehen mit Filtrierpapier, — Gärung ohne Filtrierpapier.

Am Ende der Ablesungen wurden die Kulturen kräftig geschüttelt, wodurch die übersättigte Flüssigkeit ihre Kohlensäure verlor.

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose bei 42° C .

Anf. 12.33	12.40	12.45	12.50	12.55	1.00	1.05	1.10	1.15	1.20	1.25	1.30
F	75	125	170	215	265	310	355	395	435	475	515
—	40	70	95	125	160	190	225	255	290	320	355

Zeit	12.35	12.40	12.45	12.50	12.55	Kultur geschüttelt
F	550	590	630	665	695	15
—	385	420	450	485	575	70

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung der Glucose bei 45° C . F fing an um 9.38; — um 9.33. In der grafischen Vorstellung fängt F 5 Minuten früher an.

9.45, 9.55, 10.05, 10.15, 10.20, 10.25, 10.30, 10.35, 10.40, 10.45, 10.50, 10.55
 F 65 195 300 400 450 Kultur geschüttelt 5
 — 55 140 220 300 330 360 385 415 445 Kultur gesch. 75.

Um 10.15 hatte — 300 cc CO_2 gebildet und F würde, wenn sie auch um 9.33 angefangen hätte, 450 cc CO_2 gebildet haben. Wären beide dann geschüttelt worden, so hätte F 465 cc und — 375 cc. CO_2 gebildet.

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose bei 50° C. — fing um 9.43, F um 9.48 an. (In der grafischen Darstellung fängt F 5 Minuten früher an.)

	9.55	10.05	15	20	25	30	35	40	45	50	55	11.05	11.10	Kultur gesch.
F	80	170	215	260	280	295	310	325	335	345	350	360	365	12
—	45	95	135	150	170	185	200	210	225	235	245	255	260	70

Um 11.05 hatte — 255 cc CO₂ gebildet, F 365 cc. Wären beide dann geschüttelt, so hätte F 377, und — 325 cc CO₂ gebildet.

In diesen Kulturen, worin kein Hefewachstum stattfindet, also die Anzahl Hefezellen dieselbe bleibt, wird bei den Gärungen mit Filtrierpapier in derselben Zeit $\pm 50\%$ CO₂ mehr gebildet als in den Gärungen ohne Filtrierpapier. *Hierdurch ist bewiesen, dass die Aktivität der Hefezellen bei Anwesenheit von Filtrierpapier in den Kulturen um ungefähr 50 % erhöht wird.*

Die Erklärung VAN AMSTELS, wobei angenommen wird, dass die Geschwindigkeit der Alkoholgärung bedingt wird durch die Konzentration der Glucoselösung, welche durch Adsorption auf der Hefezelle entsteht, wird durch diese Tatsache nicht in Gefahr gebracht. Wir können uns vorstellen, dass die von den Hefezellen verbrauchte Glucose auch bei der grösseren Geschwindigkeit des Prozesses infolge der Abführung einer der Reaktionsprodukte, der Kohlensäure, auf die Oberfläche der Zelle sofort wieder angeführt wird.

Gärungen, an welche als Kolloid Torf, Haidegrund oder Blutkohle hinzugefügt sind, geben dieselben Resultate. Versuche mit andern Zuckerkonzentrationen geben übereinstimmende Resultate mit den oben beschriebenen Gärungen. Der Einfluss der Kolloide auf den Prozess ist bei höheren Temperaturen ungefähr derselbe als bei niedrigeren, sowie aus den folgenden Seiten hervorgehen wird. Zwar findet bei diesen Temperaturen ein geringes Wachstum in diesen Kulturen (nach einer einstündiger Gärung bei 30° ist die Hefemenge um $\pm 4\%$ zugenommen, nach einer vierstündiger Gärung bei 21° um $\pm 6\%$) statt, aber dieses ist sehr gering infolge der grossen Quantität Hefe, welche angewendet wurde. Wir dürfen in diesen Kulturen den Einfluss

der Kolloide auf die Geschwindigkeit des Prozesses bei verschiedenen Temperaturen fast ganz als die Folge ihres Einflusses auf die Gärungsfunktion betrachten.

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose durch Hefe bei 32° C.

Der Prozess fing um 5.03 an.

F	5.10	15	20	25	30	35	40	50	6 Uhr.	10	20	30	7.15
	15	50	90	135	170	210	250	335	402,5	475	545	605	845
	5	25	45	70	90	115	145	200	245	295	345	395	595

	7.25	7.40	Kultur geschüttelt.
F	895	955	15
	642 ⁵	690	90

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose durch Hefe bei 21° C.

Der Prozess fing um 10.35 an.

F	10.55	11.05	11.15	11.35	12.00	12.10	12.20	12.45	1.05
	10	50	85	160	235	265	300	365	420
	2	15	30	70	120	140			

F	3.05	3.25	3.55	4.20	4.55	5.35	5.50	Kultur geschüttelt.
	670	710	765	825	885	945	955	20
	440	475	525	575	630	690	715	70

Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose durch Hefe bei 12° C.

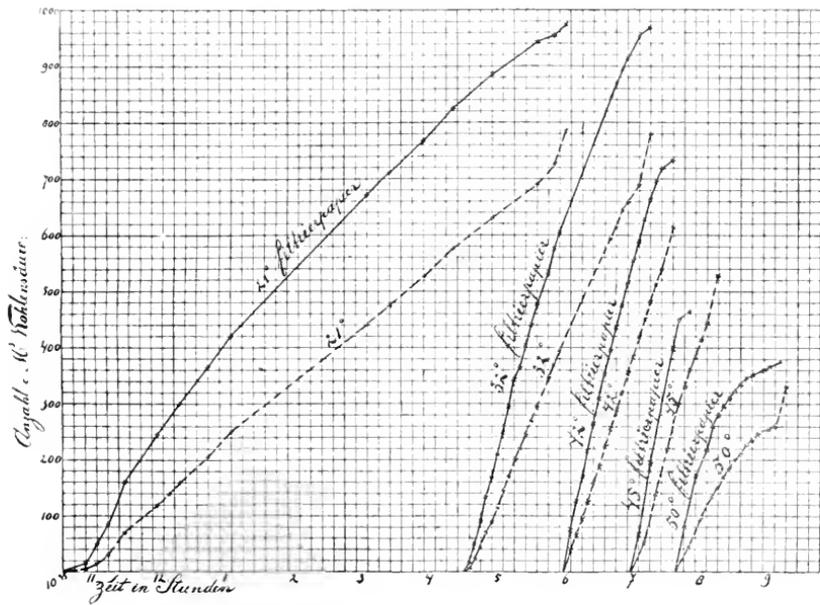
Der Prozess fing an um 11.30.

F	12.45	2.10	3.05	3.40	4.25	4.40	Kultur geschüttelt.
	50	210	320	395	485	517	17
	--	85	160	210	275	295	110

In beigehender grafischer Darstellung 1 ist der Verlauf der Gärungen angegeben.

Die Kurven sind zwischen 150 und 400 c.M³. alle fast gerade infolge der konstanten Gärungsgeschwindigkeit. Die Kohlensäure-

Graphische Darstellung 1.
 Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von Glucose durch
 Presshefe bei verschiedenen Temperaturen.



entwicklung in den Kulturen *mit und ohne Filtrierpapier* wird in der grafischen Darstellung deutlich wiedergegeben.

Eine Betrachtung der Gärung bei 21° führt zu den merkwürdigen Tatsachen, dass in der Kultur mit Filtrierpapier, sogar nachdem beinahe 1000 cM³ CO₂ gebildet sind, ± 200 cM³ CO₂ mehr gebildet sind als in der Kultur ohne Filtrierpapier, während im ganzen ± 1300 cM³ CO₂ bei der Gärung entstehen können.

Von 4 Uhr 20 ab verlaufen beide Gärungen ungefähr mit gleicher Geschwindigkeit; nach 5 Uhr 35 gärt die Kultur ohne Filtrierpapier jedoch schneller als die mit Filtrierpapier. Diese Tatsache ist sehr frappant, weil die Gärung ohne Filtrierpapier um 5 Uhr 35 ungefähr noch 1,5 mal soviel Glucose enthält als die Gärung mit Filtrierpapier.

Die Geschwindigkeit, womit die Kohlensäure entwickelt wird, zeigt in eigentümlicher Weise den Einfluss der Kolloide auf die Gärung, so wie es aus unterstehender Tabelle hervorgeht.

Kohlensäureentwicklung in 10 Minuten zwischen 150 — 140 cc.

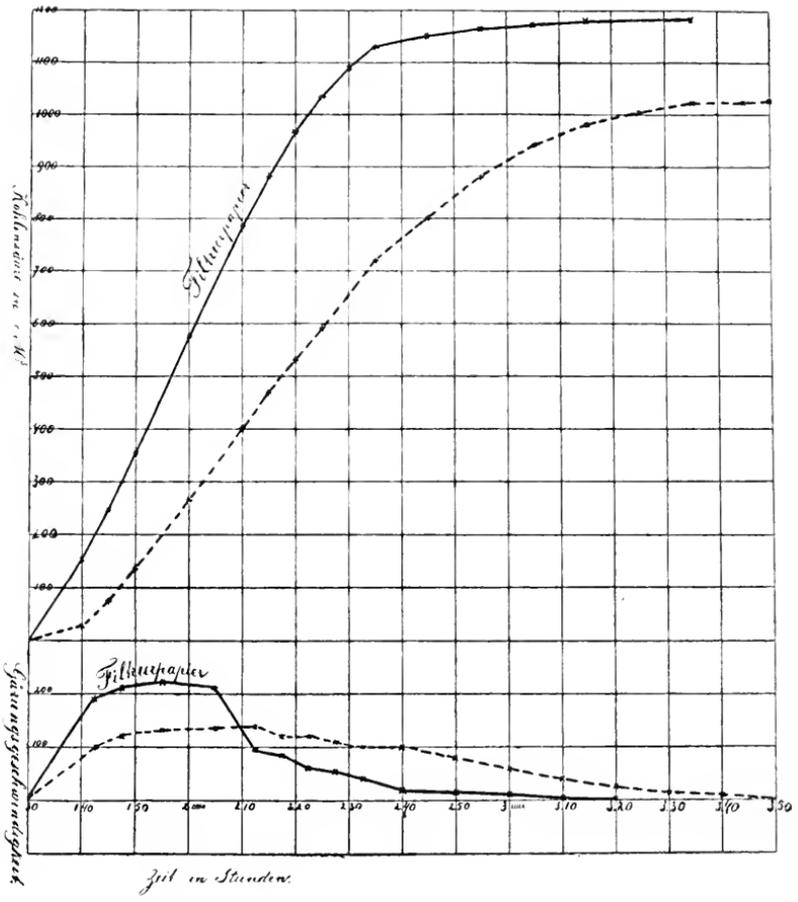
	10°	21°	32°	40°	42°	45°
mit Kolloid	20	30	77	94	95	100
ohne Kolloid	14	16	50	62	65	69

Es stellt sich also heraus, dass das VAN 'T HOFF'sche Gesetz nicht gilt für den Prozesz der Alkoholgärung, weil der Temperaturquotient bei Steigerung der Temperatur schneller abnimmt als es nach dem ARRHENIUS'schen Formel hätte geschehen müssen, so wie das auch von Frl. VAN AMSTEL in ihrer Dissertation festgesetzt wurde.

Das Verhältnis der Geschwindigkeiten $\frac{\text{mit Kolloid}}{\text{ohne Kolloid}} = \frac{3}{2}$

ist also dasselbe für alle untersuchten Temperaturen, sodass in den Kulturen mit Filtrierpapier die Aktivität der Hefe 50 % grösser ist als in denjenigen ohne Filtrierpapier. Auch das Verhältnis der Gesamtmengen der gebildeten Kohlensäure in den Kulturen mit und ohne Filtrierpapier ist ungefähr $\frac{3}{2}$, nachdem 400 c.M³. in der Kultur mit Filtrierpapier gebildet sind.

Graphische Darstellung 2.
 Einfluss von Filtrierpapier auf die Alkoholgärung, 38° C.



	12	21	32	40	42	45	50
F	400	400	400	400	400	400	377 ⁵
—	310	290	315	320	315	310	325

Bei 50° C verursacht das Absterben der Gärungsfunktion eine verminderte CO₂ bildung, wodurch diese Gärungen nicht mit den übrigen zu vergleichen sind.

Die folgende Tabelle gibt die Zahlen einer totalen Vergärung von 5 Gr. Glucose gelöst in 75 cM³ Wasser durch ungefähr 12 Gr. Preszhefe als Reinkultur bei 38° C, bei Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Filtrierpapier in der Kultur. Eine Gärung ohne Filtrierpapier, welche jede 5 Minuten kräftig geschüttelt wurde gab fast ganz übereinstimmende Resultate mit derjenigen mit Filtrierpapier.

Anfang	1.40	1.45	1.50	2 Uhr	10	15	20	25	30	35	45	55
F	150	245	355	575	785	880	965	1035	1090	1130	1150	1165
—	25	75	135	265	400	470	530	590		700	800	880

F	3.05	15	25	35	45	55	4.05	
—	1175	1180	1182	Geschüttelt und erwärmt.			1235	
—	940	980	1005	1020	1030	1035	1037 ⁵	geschüttelt und erwärmt 1220.

In den Gärungen mit Filtrierpapier ist die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung anfangs bedeutend grösser als in denjenigen ohne Filtrierpapier. Zwischen 2 Uhr 10 und 2 Uhr 15 nimmt jedoch die Geschwindigkeit der Gärung mit Filtrierpapier schnell ab und wird nachgeholt durch die ohne Filtrierpapier; die Kultur hat dann ungefähr die doppelte Quantität Kohlensäure entwickelt als die Gärung ohne Filtrierpapier. Hier schneiden die beiden Kurven, welche die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung angeben, einander. Nach 1,5 Stunde ist die Kultur mit Papier praktisch ausgegoren, nach Schütteln und Erhitzen sind ungefähr 1235 cM³ CO₂ gebildet.

Die Gärungsgeschwindigkeit wird also durch Filtrierpapier bedeutend beschleunigt und die Zeit, welche zur Beendigung der Gärung nötig ist, ist auch kürzer als die, welche nötig ist zur Vergärung derselben Quantität Glucose durch eine gleiche Quantität Hefe bei Nichtvorhandensein von Filtrierpapier.

Die grafische Darstellung No. 2, welche oben den Zusammenhang zwischen der Quantität gebildete Kohlensäure und der Kulturzeit und unten den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Kohlensäurebildung und der Zeit zeigt, schildert den Verlauf des Gärungsprozesses in den Kulturen.

C. Quantität der Kohlensäure und Alkohol in den Gärungen mit und ohne Kolloid.

Die Quantität der Kohlensäure ist bestimmt worden durch Wiegen und wurde entwickelt durch eine Reinkultur von Presshefe aus 2 Gr. Glucose und 25 cM³ destilliertem Wasser bei Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Filtrierpapier. Zu diesem Zwecke wurden die Kulturen in einem Fläschen von ± 50 cM³ (versehen mit einem Gummistöpsel mit Abflussrohr auf 40° C. gestellt; die entwickelte Kohlensäure durch Schwefelsäure und Chlorcalcium geführt und getrocknet und in einem Kaliapparätchen gebunden. Nach achtstündiger Kultur wurden die Fläschen in einem Wasserbade auf 100° C. gestellt und die Kohlensäure aus der Kulturflüssigkeit mittels eines Luftstromes ausgetrieben und in den Kaliapparat geführt.

Die Anzahl der Gramme bei Vergärung von 2 Gr. Glucose durch Presshefe gebildete Kohlensäure war.

In der Kultur mit Filtrierpapier: 942 mG.

» » » ohne » 930 »

In der Kultur mit Filtrierpapier werden also 47,1 %.

» » » ohne » » » 46,5 %.

der Quantität Glucose in Kohlensäure umgesetzt.

Anzahl Gramme der bei Vergärung von 10 Gr. Rohrzucker und von 10 Gr. Glucose durch Presshefe gebildete Gramme Alkohol.

Aus 10 Gr. Rohrzucker aus 10 Gr. Glucose.

Gärung mit Filtrierpapier 4.83 Gr. 4.64 Gr.

» ohne » 4.79 » 4.66 »

Nach PASTEUR entstehen:

Aus 10 Gr. Rohrzucker aus Glucose
5.1 Gr. Alkohol 48.3 Gr. Alkohol.

Das Vorhandensein des Filtrierpapiers in den Alkoholgärungen,

welche auf 40°, also ohne Hefewachstum verlaufen, beschleunigt den Prozess bedeutend, aber übt einen geringen oder gar keinen Einfluss aus auf die totale Quantität Kohlensäure und Alkohol, welche dabei gebildet wird.

Quantität Kolloid und Gärungsgeschwindigkeit.

Bei allen obenerwähnten Versuchen war das Kolloid in so grosser Quantität in den Kulturen vorhanden, dass die Kohlensäure gar nicht in übersättigtem Zustande in der Kulturflüssigkeit blieb. Werden jedoch an die Gärungen geringere Quantitäten der Kolloide hinzugefügt, so kann die Kohlensäure darin wohl in übersättigtem Zustande vorkommen; die Kohlensäurekonzentration in der Flüssigkeit wird grösser werden und die Geschwindigkeit des Prozesses abnehmen.

So war die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung in einer Kultur auf 40° C (5 Gr. Hefe, 5 Gr. Glucose und 50 destilliertes Wasser) durch Hinzufügung von resp. 50 mG. Blutkohle 100, von 10 mG. Blutkohle auch 100, von 2 mG. Bluthohle 80, von 0,2 mG. Blutkohle 55. Ebenso wurden bei Hinzufügung von 100 mG. Filtrierpapier in 10 Minuten 100 cM³. Kohlensäure gebildet, von 10 mG. Filtrierpapier 54 cM³. in der selben Zeit. Vergrösserung der Kohlensäurekonzentration in der Kulturflüssigkeit hat also eine Abnahme der Gärungsfunktion zufolge.

Wenn die Kohlensäurekonzentration in der Kultur durch Vergrösserung der Kohlensäurespannung über der Kulturflüssigkeit noch mehr steigt, nimmt damit wieder die Schnelligkeit des Prozesses ab.

Gärung unter zwei Atmosphären Druck.

Bei dem folgenden Versuch wurde der Druck des Gases über der Kultur (50 cM³. destilliertes Wasser, 3 Gr. Hefe, 5 Gr. Glucose) mit einer Atmosphäre erhöht dadurch, dass die in der Kultur entwickelte Kohlensäure durch eine Quecksilbersäule von 76 cM. Höhe quillt; danach wurde die entwickelte Quantität Kohlensäure beim atmosphärischen Druck gemessen.

Um die Quantität Kohlensäure, welche in der Kultur zu einer bestimmten Zeit vorhanden war, bestimmen zu können, konnte

sie mittels eines Dreiwegshahnes direkt mit einer Gasmeszflasche verbunden werden, (also unter atmosphärischen Druck gestellt werden).

Die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung durch 5 Gr. Presshefe aus 5 Gr. Glucose in 50 c.M³. destilliertem Wasser bei 40° C unter 76 c.M. Quecksilberdruck (als Kulturgefäß diente ein Fläschchen aus Glas von 100 c.M³.) war ungefähr 52.

Durch direkte Verbindung der Kultur mittels eines Dreiwegshahnes mit der Gasmeszflasche entwichen 125 c.M³. Kohlensäure aus dem Kulturgefäß. Nach Schütteln entwichen noch 90 c.M³. im ganzen waren also 50 c.M³. in der Flüssigkeit gelöst gewesen:

$$215 + 30 - 50 = 195 \text{ c.M}^3. \text{ Kohlensäure.}$$

Durch Übersättigung der Kulturflüssigkeit entsteht also eine Kohlensäurekonzentration, welche übereinstimmt mit einer Lösung, welche unter ungefähr 5 Atmosphären Druck mit Kohlensäure gesättigt ist. Die Gärungsgeschwindigkeit ist fast die Hälfte derjenigen einer Gärung, an welche Filtrierpapier hinzugefügt worden ist und welche nicht mit Kohlensäure übersättigt ist; darin ist also ungefähr 1/5 der Kohlensäure vorhanden, welche die Kultur unter Druck enthält.

In derselben Weise wurde der Unterschied der Geschwindigkeit des Gärungsprozesses bestimmt in einer auf 40° C geschüttelten Kultur unter zwei Atmosphären Druck und in einer übereinstimmenden Kultur auf 40° unter gewöhnlichem Druck; diese betrug nur 6 c.M³. in zehn Minuten. Aus diesen Versuchen stellt es sich in überzeugender Weise heraus, dass die Kohlensäurekonzentration des Kulturmediums von grosser Bedeutung ist für die Gärungsfunktion; diese wird vergrößert, wenn die Kohlensäurekonzentration in der Kulturflüssigkeit abnimmt und wird erniedrigt, wenn die Kohlensäurekonzentration in der Flüssigkeit zunimmt.

Die Schnelligkeit des Alkoholprozesses wird für einen bedeutenden Teil geregelt durch die Kohlensäurekonzentration in der Kulturflüssigkeit.

In wiefern nun die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration zufolge der höheren Kohlensäurekonzentration des Mediums, die Geschwindigkeit des Prozesses beeinflusst, werden spätere Untersuchungen zeigen.

II. Einfluss der Kolloide auf die Alkoholgärung bei gleichzeitigem Wachsen der Hefe.

Zum Festsetzen des Einflusses von Filtrierpapier auf das Wachstum der Presshefe in Alkoholgärungen wurden die Kulturflüssigkeiten mit einer geringen Anzahl Zellen geimpft und kultiviert bei 30° C oder bei einer niedrigeren Temperatur. Die gebildete Kohlensäure und Alkohol wurden in ähnlicher Weise bestimmt wie in den Kulturen des vorigen Abschnitts.

A. Einfluss von Filtrierpapier auf die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung bei Vergärung von drei Gramm Glucose.

Eine von zwei Kulturflüssigkeiten, welche bestanden aus 100 c.M³. Hefewasser, worin drei Gramm Glucose gelöst worden waren, wurde versehen mit ungefähr 1 Gramm fein geschnittenes Filtrierpapier; beide Kulturen wurden in Fläschchen von 150 c.M³. versehen mit Gummistöpsel und Abfließrohr) sterilisiert, dann geimpft mit ± 180 Hefezellen und in der beschriebenen Weise verbunden mit dem Gasmessapparat und gestellt bei 20° C.

Anfangs verbrauchte die Hefe den Sauerstoff in und über der Kultur, was zufolge hatte, dass die Salzlösung in dem Gasabfließrohr stieg. Nach einiger Zeit fing die Kohlensäureentwicklung in der Kultur an drang die Flüssigkeit ins Rohr zurück und drückte diese in den Messzylinder.

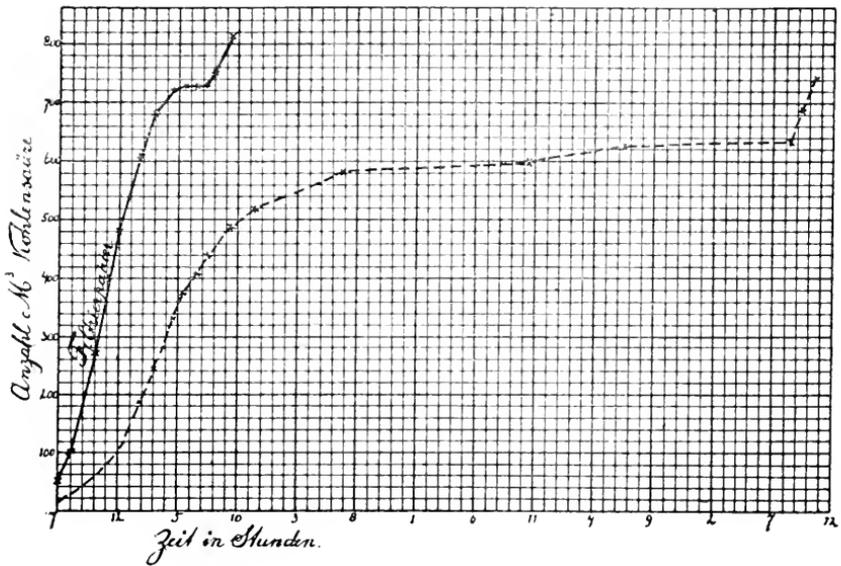
Ungefähr 24 Stunden nach der Impfung fing F langsam zu gären an, nach 28 Stunden fing die Kultur ohne Kolloid an noch viel langsamer Kohlensäure zu entwickeln.

In der folgenden Tabelle sind die Quantitäten Gas angegeben, welche nach einer bestimmter Zeit durch beide Kulturen gebildet worden waren.

Nach 36 Stunden Kultur, um 7 Uhr v.m., wurde geregelt abgelesen.

	7 Uhr	8	10	12	1.45	3.	4.30
F	49	100	275	488	610	675	721
—	13	25	56	104	188	249	332

Graphische Darstellung 3.
 Einfluss von Filtrierpapier auf die Vergärung von 3 Gramm Glucose durch
 Presshefe, indem Wachstum der Hefe stattfindet.



530	6.30	7.30	Geschüttelt und erwärmt.	9.30	11.30	7. v.m.
F 726	728	728	752	811		
— 374	412	442		490	520	582
10.30 n.m.	6.30 v.m.	8.30 n.m.	10.30 n.m.	geschüttelt und erwärmt		
— 598	624	632	633	741		

Die graphische Darstellung 3 zeigt den Gang der Prozesse bei Vorhandensein und Nichtvorhandensein von Filtrierpapier. Die Kurve, welche die Kohlensäurebildung in der Kultur mit Filtrierpapier anzeigt, steigt schnell und beugt sich am Ende des Prozesses plötzlich um; der ganze Prozess verläuft mit grosser Geschwindigkeit und endet fast plötzlich.

Die Gärung ohne Filtrierpapier verläuft im ganzen ruhig; besonders am Ende ist die Gärungsgeschwindigkeit sehr gering. Die Vergärung der letzten Quantitäten Glucose findet sehr langsam statt.

Unterstehende Tabelle zeigt die sehr auseinanderlaufenden Geschwindigkeiten der beiden Prozesse; die Geschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung ist in cm^3 CO_2 pro Stunde Kultur angegeben.

	7.30	9.00	11.00	12.50	2.20	3.45	5.00	6.00	7.00	8.30
F	51	87 ⁵	106	70	52	30	5	2		
—	12	15	24	48	49	55	42	38	30	24
			10.30	3.15	8.45	2.30	1.30			
F										
—			15	8	2.5	3.25	0.4			

Die Maximumgeschwindigkeit der Kohlensäureentwicklung in der Gärung mit Filtrierpapier ist 106, also fast zweimal so gross wie in derjenigen ohne Papier, welche 55 ist. Infolge des Unterschiedes der Geschwindigkeit der beiden Prozesse, ist auch die Zeit, welche benutzt wird zur Vergärung von 3 Gramm Glucose in beiden Kulturen sehr verschieden; in der Kultur mit Filtrierpapier beträgt sie nur 48 Stunden, in der ohne Papier 72 Stunden.

Das Hefewachstum ist in den Kulturen durch Zählung der Hefezellen auf Malzgelatineböden direkt nach Impfung und nach einer bestimmten Kulturzeit, während welcher die gebildete Kohlensäure aufgefangen wurde, festgestellt worden.

B. Bestimmung des Einflusses von Filtrierpapier auf das Hefewachstum.

Zwei Kulturflüssigkeiten, welche aus 100 cM³ Hefewasser und 10 Gramm Glucose bestanden und wovon eine 2 Gr. geschnittenes Filtrierpapier enthielt, wurden mit ± 112 Hefezellen geimpft und auf ungefähr 16° C. gestellt.

Diese Kulturen entwickelten die folgenden Anzahlen cM³ Kohlensäure:

	Nach 54 Stunden	72 Stunden	Schütteln der Kultur	Zählkultur erwärmen
F	80	775	798	914
—	25	200	402	499

Zwei Zählungen zeigten, dass die Anzahl Keime nach 71 Stunden Kultur ohne Filtrierpapier $102 \times$ und $94 \times 5 \cdot 10^6$, in F $139 \times$ und $146 \times 5 \cdot 10^6$ betragen.

Es ist also klar, dass das Hefewachstum in der Kultur durch Vorhandensein des Kolloids gefördert wird. Das Verhältnis der gebildeten Quantitäten Kohlensäure $\frac{914}{499} = 1.83$ ist nicht dasselbe wie das der Anzahl Hefezellen $\frac{142}{98} = 1.45$, sodass der günstige Einfluss des Kolloids sich auch auf die Gärungsfunktion zeigt.

Die Quantität Kohlensäure, welche entstanden ist infolge der Erhöhung der Gärungsfunktion ist

$$(914 - 499 \times 1.45 = 190) \text{ 190 cM}^3. \text{ CO}_2.$$

Durch Vermehrung des Hefewachstums sind 225 cM³. gebildet worden

$$914 - (499 - 190) = 225$$

sodass Vergrößerung des Hefewachstums und Erhöhung der Gärungsfunktion jede ungefähr 50 % der totalen Kohlensäure-

vermehrung verursachen, zufolge Vorhandenseins von Filtrierpapier in den Kulturen.

Zwei Kulturen, welche bestanden aus 100 cM³. Hefewasser, 3 Gr. Glucose, kultiviert bei 28° C und geimpft mit \pm 232 Hefezellen, und wovon eine überdies versehen war mit einem Gramm geschnittenes Filtrierpapier gaben ungefähr übereinstimmende Resultate.

Bei einer dritten Serie Versuche wurden zwei Kulturflüssigkeiten, welche bestanden aus 100 cM³. Hefewasser und 5 Gramm Glucose, wovon eine noch versehen war mit 2 Gramm geschnittenes Filtrierpapier, kräftig aëriert durch Schütteln mit Luft und dann jede geimpft mit \pm 58 Hefezellen. Die Kohlensäurevermehrung infolge Erhöhung der Gärungsfunktion betrug \pm 40 %, die infolge grösseres Hefewachstums 60 %.

Versuche mit Blutkohle, Torf und sterieler Erde, welche an die Gärungen hinzugefügt wurden, gaben übereinstimmende Resultate wie diejenigen ohne Filtrierpapier.

Die totale Quantität Kohlensäure, welche in den Kulturen mit und ohne Filtrierpapier gebildet wurde, ist auch verschieden. So entstanden in drei Gärungen mit Filtrierpapier resp. 47.7 %, 48.9 % und 48.35 % Kohlensäure, in denjenigen ohne Filtrierpapier resp. 43.6 %, 46.6 % und 46.5 % Kohlensäure; dagegen ist die Quantität Alkohol in den Gärungen mit Filtrierpapier etwas geringer als in denjenigen ohne Papier. In den drei Gärungen mit Filtrierpapier nämlich waren resp. 39 %, 38 % und 41.5 %, in denjenigen ohne Filtrierpapier 42 %, 37 % und 42 % Alkohol gebildet.

Der Einfluss dieser Kolloide auf den Gärungsprozess wird nicht ganz und gar verursacht durch Veränderung der Kohlensäurekonzentration in der Lösung, er rührt auch her von dem besseren Zufuhr der Nährstoffe an die Hefezellen, welche zwischen und auf den Kolloïdteilchen liegen, während die Zellen in den Kulturen ohne Kolloïd auf dem Boden der Flasche liegen, sodass nur die Nährstoffe ungehindert bis zu den oberen Schichten der Hefezellen geraten können. In den kräftig gärenden Kulturen der unter I beschriebenen Versuche mit grossen Quantitäten Hefe angestellt, ist die Flüssigkeit infolge der Gasentwicklung in so starker Bewegung, dass die Hefe nicht auf den Bodem sinkt; in diesen Kulturen müssen wir dann auch die Geschwindig-

keit des Prozesses ganz der Kohlensäurekonzentration des Mediums zuschreiben.

III. Über die Ursachen, durch welche Gase aus übersättigten Lösungen freigemacht werden.

Der übersättigte, labile Zustand eines Gases in einer Flüssigkeit kennzeichnet sich dadurch, dass eine Gasblase in der Flüssigkeit grösser wird; der ungesättigte Zustand dadurch, dass die Blase in der Flüssigkeit kleiner wird. Die Quantität übersättigtes Gas in einer Flüssigkeit hängt ab von dem Druck des Gases über der Flüssigkeit und von ihrer Temperatur; sie wird bei einem bestimmten Druck und Temperatur ein Maximum erreichen können.

Ist eine Flüssigkeit mit Gas übersättigt, dann kann das Gas daraus freigemacht werden durch Erhöhung der Temperatur der Flüssigkeit, durch Erniedrigung des Druckes, durch Schütteln, durch Gasblasen und durch Hinzufügung von Salzen, scharfeckigen Stoffen, Fasern, u.s.w.

Wird das Maximum der Übersättigung überschritten, so entweicht das Gas an willkürlichen Stellen aus der Flüssigkeit.

In einfacher Weise sind diese Tatsachen nachzuweisen bei Anwendung künstlicher Mineralwässer, die als mit Gas übersättigte Flüssigkeit dienen.

1869 hat SCHRÖDER 1) schon einen interessanten Versuch mitgeteilt, der die Ursachen des Freimachens von Gasen aus damit übersättigten Flüssigkeiten schildert.

SCHRÖDER brachte einen ausgeglühten und einen ausgeglühten dann aber fettgemachten Platindraht in eine mit Gas übersättigte Flüssigkeit und nahm wahr, dass der fette Platindraht (aktiviert) schnell mit einer grossen Anzahl Gasbläschen bedeckt wurde, während der ausgeglühte nicht fette Platindraht kein Gas aus der Flüssigkeit auf ihrer Oberfläche freimachte. SCHRÖDER erläuterte diese sogenannte Aktivität des fetten Platindrahtes mit Recht durch die Wirkung der Luftschicht an diesem Draht auf das übersättigte Kohlensäuregas.

In gärenden Kulturen nun wird die übersättigte Kohlensäure

1) O. LEHMANN. Molekular Physik.

durch Papier, Torf, Blutkohle, Gartenerde und rohen Haidehumus sowie auch kolloidales Eisen- und Aluminioxyd aus der Flüssigkeit freigemacht, dagegen geschieht dies nicht bei Verwendung kolloidaler Humussäure, Siliciumoxyds, arabischen Gummi's, Agars oder Gelatine. In welcher Weise der Einfluss dieser Verbindungen auf die in Flüssigkeiten übersättigte Kohlensäure erläutert werden kann, wird sich aus folgenden Versuchen zeigen.

Bei diesen Versuchen wurde als mit übersättigtem Gas flüssigkeit künstliches Mineralwasser verwendet.

Wenn man an eine Reihe mit künstlichem Mineralwasser gefüllte Reagenzröhren Blutkohle, Torf, Filtrierpapier, Erde, trocknen Humus, Quarz, gestampftes Glas, Zucker, trocknes Kochsalz u.s.w. hinzufügt, so findet inselben Augenblick eine schnelle Kohlensäureentwicklung statt, welche ihren Ursprung an der Oberfläche der hinzugefügten Stoffe hat.

Kochen wir obenerwähnte Stoffe mit Wasser, so wird dadurch die Luft grösstenteils von den Stoffen entfernt; dann aber verursachen Quarz, Glas, Zucker- oder Salzlösung keine Kohlensäureentwicklung mehr. Faserstoffe, Blutkohle und Erde jedoch noch wohl eine. Werden diese jedoch während einiger Tage unter ausgekochtem Wasser, das einige Male erneuert wird, bewahrt, sodass die noch an der Oberfläche und in den Poren vorhandenen Gase davon verschwinden durch Lösung in Wasser, so verursachen diese Stoffe direkt nach Hinzufügung zu dem Mineralwasser keine Kohlensäureentwicklung, nach einigen Sekunden jedoch entsteht bisweilen, abhängig von der Kohlensäurekonzentration in der Flüssigkeit, eine schwache Kohlensäureentwicklung an der Oberfläche der Kolloide.

Befindet sich über dem Mineralwasser versehen mit Kolloid, ein Vakuum, wodurch die Übersättigung der Kohlensäure verhältnissmässig zunimmt, so sehen wir eine kräftige Bildung von Kohlensäurebläschen an den Spitzen der Fasern und auf der Blutkohleteilchen entstehen. In den Gärungen wird in dieser Weise in der mit Kohlensäure stark übersättigten Lösung das Gas freigemacht.

Dass wirklich scharfeckige Gegenstände in einer mit Gas übersättigten Flüssigkeit einen geringen Einfluss ausüben auf die Bildung von Gasblasen ergibt sich auch aus unterstehendem

Experiment; setzen wir in ein Reagenzrohr gefüllt mit Mineralwasser, ein an der oberen Seite offnes und ein geschlossenes enges gläsernes Röhrchen, so werden an der Unterseite des obengeschlossenen Röhrchens fortwährend Gasblasen gebildet; an der Unterseite eines an beiden Seiten offenen Röhrchens entstehen bisweilen einige Gasblasen; oft jedoch auch gar keine. Das Vorhandensein einer Gasoberfläche besonders mit kleiner Krümmung, also mit grosser Oberflächenspannung befördert offenbar die Konzentration der übersättigten Kohlensäure in der Gasoberfläche (was mit dem GIBBS'schen Gesetz übereinstimmt).

Im Gegensatz zu den genannten Biokolloiden verursacht eine Hefesuspension in künstlichem Mineralwasser keine Kohlensäureentwicklung, eben so wenig kolloidale Humussäure oder Siliciumoxyd (negative Kolloide wie Kohlensäure). Diese adsorbieren wohl die Kohlensäure aus der Lösung, weil aus Mineralwasser, versehen mit einer Quantität einer kolloidalen Lösung dieser Verbindungen, die Kohlensäure langsamer z.B. durch Filtrierpapier freigemacht wird als aus Mineralwasser, woran eine eben so grosse Quantität destilliertes Wasser hinzugefügt ist. Dagegen verursacht kolloidales Eisenoxyd und Aluminiumoxyd als positives Kolloid eine schnelle Kohlensäureentwicklung und flockt dabei aus. Ausgeflocktes Eisenoxyd und Aluminiumoxyd ist fast inaktiv.

Das Freimachen der Kohlensäure aus damit übergesättigten Lösungen durch Biokolloide (so wie dies in den beschriebenen Gärungen stattfindet) müssen wir auf folgende Weise erläutern:

An den feinen Spitzen der Fasern wird die Kohlensäurekonzentration in der Flüssigkeit durch Kohlensäureadsorption so gross, dass das Gas nicht mehr in Lösung bleibt, aber als äusserst feine Gasblasen freikommt. Diese Gasbläschen mit hoher Oberflächenspannung wachsen dann sehr schnell zu Gasblasen, welche zur Oberfläche steigen; an die Faserspitzen werden jedoch noch geringe Quantitäten Gas hinterbleiben, welche wieder zu groszen Gasblasen werden u.s.w. Das Freiwerden des Gases aus einer mit ihr übersättigten Lösung durch Biokolloide (und in sehr geringem Masse durch scharfeckige Körper) ist die Folge der Anwachsung zu Gasblasen von auf den Kolloiden durch Oberflächenspannung entstandenen kleinen Gasbläschen, welche den Prozess so zu sagen einleiten.

In dieser Weise werden die Kolloide die übersättigte Kohlensäure in Alkoholgärungen freimachen, in analoger Weise werden Gase durch Schütteln der mit ihnen übersättigten Flüssigkeit entweichen; infolge der selben Ursachen entweichen Gase aus Flüssigkeiten, welche mit Gas gesättigt sind nach Erwärmung der Flüssigkeit.

Blutkohleteilchen auf den Hefezellen.

Ein sehr merkwürdige Erscheinung kommt oft vor in Gärungen, an welche Blutkohle hinzugefügt ist.

Bei einer mikroskopischen Beobachtung der Hefezellen stellt es sich heraus, dass diese mit einer grossen Anzahl Blutkohleteilchen bedeckt sind, oft dermassen, dass die Hefezellen ganz unsichtbar, so zu sagen in einer Umhüllung von Kohleteilchen sich befinden infolge der Wirkung der Oberflächenspannung. Es braucht nicht erörtert zu werden, dass in dieser Weise die Gärungsprodukte von der Oberfläche der Hefezellen in sehr geeigneter Weise abgeführt und Nährstoffe angeführt werden können, was eine Erhöhung der Gärungsfunktion zufolge hat.

Beigehende Photographie zeigt die Weise, auf welche die Kohleteilche auf der Hefeoberfläche vorkommen. Ein Teil der Kohleteilchen, welche nur sehr locker den Hefezellen anliegen, ist beim Anfertigen des mikroskopischen Präparats der Hefezellen entfernt worden; doch ist auf dieser Photographie noch sehr gut zu sehen, dass die Kohleteilchen sich auf der Oberfläche der Hefezellen bedeutend angesammelt haben.

ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE.

1^o. Alkalisalze der Humussäure wirken schädigend auf den Prozess der Alkoholgärung.

2^o. Kolloidales Eisen-, Aluminium-, Siliciumoxyd und Humussäure fördern weder verzögern beträchtlich die Alkoholgärung.

3^o. Biokalliode, wie Torf, Filtrierpapier, Blutkohle und Gartenerde wirken sehr beschleunigend auf den Prozess der Alkoholgärung.

a. Die Gärungsfunktion, die Aktivität der Hefezelle wird in dem Kulturmedium (5 Gr. Glucose, 5 Gr. Presshefe, 50 c.M³.

Wasser) bei Anwesenheit dieser Kolloide um $\pm 50\%$ gesteigert.

b. Das Wachstum der Hefe, in einem mit wenig Hefe geimpften Kulturmedium (3%—10% Glucose in Hefewasser) wird ebenfalls um etwa 50% erhöht.

4°. Den günstigen Einfluss dieser Kolloide auf den Prozess der Alkoholgärung ist der niedrigeren Kohlensäurekonzentration in der Kulturflüssigkeit zuzuschreiben. Infolge eines schnellen Entweichens daraus durch Bläschenbildung wird der Kulturmedium nicht mit Kohlensäure übersättigt.

5°. Das Freiwerden der Kohlensäure aus damit übersättigten Lösungen durch Biokolloide müssen wir auf folgende Weise erläutern:

An den feinen Spitzen der Fasern wird die Kohlensäurekonzentration in der Flüssigkeit durch Kohlensäureadsorption so gross, dass das Gas nicht mehr in Lösung bleibt, aber als äusserst feine Gasbläschen freikommt. Diese Gasbläschen mit hoher Oberflächenspannung wachsen dann sehr schnell zu Gasblasen, welche zur Oberfläche steigen. An den Faserspitzen werden jedoch noch geringe Quantitäten Gas hinterbleiben, welche wieder zu grosse Gasblasen werden u.s.w. Das Freiwerden des Gases aus einer mit ihr übersättigten Lösung durch Biokolloide (und in sehr geringem Masse durch scharfeckige Körper) ist die Folge der Anwachsung zu Gasblasen von auf Kolloiden durch Oberflächenspannung entstandenen kleinen Gasbläschen, welche den Prozess so zu sagen einleiten.

Durch diese Untersuchungen werden die Resultate der Arbeit Dr. ED. MOUFANGS 1) »Über eine katalytische Wirkung toter Hefezellen auf die Gärung« erklärt.

Dr. MOUFANG schreibt § 116.

Es liegt der Gedanke nahe, hier eine Art »*Emanationswirkung*« anzunehmen, die von der toten Hefezelle auf gärende Hefe ausgeübt wird und die bei höherer Temperaturwirkung etwa durch stattfindende Dissoziation verstärkt wird.

1) Wochenschrift für Brauerei 1913, 22 Februar No. 8, S. 113.

OXYDATION DES MANGANCARBONATES DURCH BAKTERIEN UND SCHIMMELPILZE

VON

M. W. BEIJERINCK.

(Hierzu Tafel III und IV).

I. Die Bakterien des Mangancarbonates.

Bei Gelegenheit einer erneuten Untersuchung des Nitrifikationsprozesses, worüber ich später berichten werde, hatte ich mich die Frage vorgelegt, ob diese Fermente vielleicht imstande sein sollten auch andere Körper, wie die Ammonsalze und die Nitrite zu oxydieren. Dazu brachte ich auf die Oberfläche geeigneter, an löslicher organischer Substanz sehr arme Agarplatten, frisch präzipitiertes, schneeweisses Mangancarbonat in der Form einer sehr dünnen etwas feuchten Schicht und zog darauf Impfstriche der zu untersuchenden Kulturen, wodurch die Keime Kolonien entwickeln konnten allseitig durch das Carbonat eingeschlossen. Es stellte sich heraus, dass weder das Nitrit- noch das Nitratferment das Mangancarbonat umwandeln, doch fand sich bisweilen in nitrifizierenden Flüssigkeiten in reichlicher Anzahl eine bemerkenswerte Bakterie, deren ziemlich ausgedehnte Kolonien eine dunkelbraune bis schwarze Farbe besitzen, verursacht durch die Umwandlung des Carbonates in eine Manganverbindung. Weiter zeigte sich, dass dieselbe Bakterie schon in reichlicher Anzahl im Boden selbst vorkommt, und nicht oder wenigstens nicht deutlich in den nitrifizierenden Kulturen angehäuft wird.

Dass die Braunfärbung wirklich von irgend einer Manganverbindung herrührt, ergibt sich aus den beiden folgenden Reaktionen, welche sich als besonders gut brauchbar für die weitere Untersuchung herausstellten: die Spaltung von

Wasserstoffsperoxyd unter starker Sauerstoffbildung und die Erzeugung von Jod aus Jodkalium in stark saurer Lösung. Reines Mangancarbonat hat diese Eigenschaften nicht, enthält es jedoch auch nur eine Spur einer Manganverbindung so wird dieses eben durch die genannten Reaktionen leicht nachgewiesen. Als weitere Reaktionen können noch verwendet werden die Chlorbildung aus konzentrierter Salzsäure, und die Löslichkeit der Verbindung, mit dunkelbrauner Farbe, in konzentrierter Schwefelsäure.

Für die Darstellung von reinem Manganocarbonat frei von Manganverbindungen, kann man wie folgt verfahren. Man präzipitiert Mangansulfatlösung mit Natriumcarbonat und setzt eine Spur Wasserstoffsperoxyd zu um die kleine Menge von Manganverbindungen, welche, wie es scheint gewöhnlich in Mangansulfat vorkommen und durch das Natriumcarbonat als höhere Oxyde gefällt werden, zu zersetzen. 1) Das reine Manganocarbonat wird aufbewahrt unter Wasser in einer geschlossenen Flasche, wodurch man immer das Präparat als ein in Wasser suspendierter Brei zur Verwendung fertig hat.

Die Angabe der chemischen Lehrbücher, dass das Manganocarbonat an der Luft oxydiert, muss so aufgefasst werden, dass dieses geschieht beim Eintrocknen und in feuchtem Zustand bei Gegenwart von Alkalien. Meine Mangancarbonat-agarplatten habe ich in Glasdosen, bei freiem Luftzutritt, länger wie ein Jahr aufbewahrt, ohne, dass die weisse Farbe sich auch nur im allerwenigsten verändert hat.

Reines Manganocarbonat erhält man ebenfalls, in für unseren Zweck geeigneter Form durch das Präzipitieren von reinem Mangansulfat mit Natriumbicarbonat in Kohlensäureatmosphäre.

Da ich die genannte Bakterie sehr oft in meinen Kulturen fand wurde ich zu einer näheren Untersuchung derselben veranlasst, wobei sich herausstellte, dass sie bei der Ueberimpfung der Nitrifikationen verloren gehen kann, und mit diesem Vorgange selbst nicht in direkter Verbindung steht, dagegen in Gartenerde sehr allgemein verbreitet ist. Organische Sub-

1) Es muss noch daran erinnert werden, dass Wasserstoffsperoxyd, bei Gegenwart von Alkali, das Manganhydroxyd sofort in dunkelbraune Manganioxyde überführt, was jedoch nicht der Fall ist wenn Carbonate zur Fällung verwendet werden.

stanzen werden nur in grosser Verdünnung vertragen, sodass die Reinkultur einige Schwierigkeit verursachte. Inzwischen gelang es auf Agarplatten mit 0.05 % Manganlaktat, die Art in der Gestalt sehr kleiner, sich durch eine Manganverbindung braunfärbende Kolonien rein zu erhalten.

Auf meinen Mangancarbonatplatten wachsen diese Bakterien auf zweierlei Weisen, nämlich entweder als grosse, feuchte, braune Flecke, welche sehr unregelmässig begrenzt sind und aus Bakterien bestehen, welche sich infolge des Wachstums über die Oberfläche der Platte seitlich ausbreiten. Oder die Kolonien bestehen aus braunschwarzen, dicht neben einander gelagerten kleinen Kapseln von 0.1 bis 0.5 mm Mittellinie. Die Gruppen dieser Kapseln können wieder ziemlich umfangreich werden und z. B. Felder von 1 bis 2 cm Mittellinie erzeugen. Sie wachsen langsam und entwickeln sich erst nach zwei bis drei Wochen am besten bei c.a. 25° C. Mikroskopisch bestehen, sowohl die weichen wie die festen Kolonien auf den Mangancarbonatplatten scheinbar aus Mikokokken, welche stark erinnern an die von MOLISCH unter dem Namen *Siderocapsa* beschriebenen Eisenbakterien,¹⁾ doch kann man bei den eingekapselten auch Eigenbewegung bemerken. Die Reinkulturen auf Manganlaktatplatten wachsen ebenfalls schwierig und bestehen aus sehr kleinen, lebhaft beweglichen Stäbchen, welche sich kaum inkapseln, jedoch, in den Kolonien, mit braunen Körnchen von Manganverbindungen gemischt vorkommen. Werden die Kolonien von den Manganlaktatplatten zurückgeimpft in eine Mangancarbonatschicht, welche auf eine Agarplatte mit Salzen ausgebreitet ist, so bilden sie darauf wieder die braunen Flecke, welche bisher jedoch immer zu der weichen Modifikation gehörten, auch wenn die Reinkultur auf der Laktatplatte von der harten eingekapselten Form abstammte.

In den Rohkulturen, mit Gartenerde angefertigt, wobei überall in der Mangancarbonatschicht auch andere Bakterien und Amöben vorkommen, ist das Wachstum unserer Bakterie viel üppiger wie in den Reinkulturen.

Versuche mit verschiedenen organischen Körpern, ausgeführt um die Manganbakterien zu einer kräftigeren Entwicklung zu

¹⁾ Die Eisenbakterien, Pag. 10. Jena 1910.

bringen, haben kein Resultat gegeben, woraus jedoch nur der Schluss zu ziehen ist, das die verwendeten Stämme eine geringe Vegetationsenergie besitzen und nicht, dass diese Eigenschaft eine allgemeine ist, dafür ist die Zahl der untersuchten Formen noch nicht beträchtlich genug.

Die Frage ob die Manganbakterien vielleicht im Stande sein sollten, das Mangancarbonat zugleich als Energie- und als Kohlenstoffquelle zu verwenden und also zu den Mikroben mit Chemosynthese würden gehören können, muss verneint werden, — ohne organische Kohlenstoffquelle war keine Entwicklung herbeizuführen.

Bemerkenswert muss es dabei erscheinen, dass der Oxydationsvorgang so viel besser stattfindet auf Agarplatten, welchen keine besondere organische Nahrung zugesetzt ist, wie wenn letzteren wohl geschieht, so dass hier jedenfalls eine bestimmte Adaptation vorliegt, welche an diejenige der Fermente der Nitrifikation erinnert, womit unser Mikrobe übrigens in morphologischer Beziehung, sowohl bezüglich der Formverhältnisse, wie der Beweglichkeit und Grösse, auch nahe übereinstimmt. Ich glaube denn auch, dass hier wirkliche Verwandtschaft vorliegt und, dass die Oxydation des Mangancarbonates in diesem Falle auf einen ähnlichen Biochemismus beruht, wie der Nitrifikationsprocess. Es war darum wichtig festzustellen, ob die Absonderung der Manganverbindung ausserhalb des Bakterienkörpers stattfindet oder im Innern desselben. Es ergab sich, dass von der Absonderung irgend einer Oxydase nichts zu bemerken war und, dass die Oxydation sicher an der Substanz des Bakterienkörpers gebunden ist. Ob dabei eine Endooxydase oder das Protoplasma selbst in betracht kommt, ist, wie in so vielen anderen Fällen eine müssige Frage, weil man Ursache hat das Protoplasma, jedenfalls für einen grossen Teil, als aus Endoenzymen zusammengesetzt zu betrachten, so dass Worte, wie »Endoenzym« und »Protoplasma«, Begriffen entsprechen, welche nicht scharf zu trennen sind und fliessend in einander übergehen.

Weil unsere Bakterie zu einer besonderen, noch nicht beschriebenen Art gehört, scheint es geeignet dafür einen neuen Artnamen aufzustellen, nämlich *Bacillus manganicus*, mit der folgenden Diagnose:

Bodenbakterie, welche wächst auf Platten von reinem Agar

mit Salzen und bedeckt mit einer anklebenden Schicht von Manganocarbonat, welches oxydiert wird. Die Bakterie erzeugt braune oder schwarze Flecke von 0.5 bis 1 cm. Mittellinie, worin entweder lose Mikrokokken von 0.2 μ bis 0,7 μ vorkommen, oder kleine, feste in Manganioxyd eingekapselte Körnchen oder Knöpfchen, welche aus sehr kleinen stark beweglichen Stäbchen von 0.2 μ dick bei 1.5 bis 2 μ lang bestehen. Auf Agarplatten mit 0.05 Prozent Manganolaktat, schwieriges, schwaches Wachstum zu kleinen, braunen Kolonien von beweglichen Bazillen, wie oben. Auf reichere Kulturböden kein Wachstum.

II. Die Schimmelpilze des Mangancarbonates.

Papulospora manganica.

Als ich im Januar 1912 eine der vorgehend beschriebenen Manganocarbonat-Agarplatten in meinem Laboratorium einige Tage bei ca. 18° C. offen an der Luft bewahrt hatte, entwickelten sich darauf einige Schimmelkolonien, welche zu meiner Verwunderung, eben wie die Kolonien der Manganibakterien, sich durch die Bildung von Manganverbindungen ¹⁾ tief braun und schwarz färbten. In einem anderen Falle erhielt ich den gleichen Schimmelpilz aus einer jungen Nitrataction selbst, sodass kein Zweifel daran war, dass derselbe aus den für die Nitrificationsversuche verwendeten Erdmuster herköünftig sein musste.

Mikroskopisch betrachtet stellte sich heraus, dass das neugebildete Mangansalz teilweise in der Form von vollständig runden Körnern, welche bis in ziemlich grossen Entfernungen vom Mycelium, loose im Agar verbreitet waren, anderenteils als amorphes, braunes den Mycelfäden anhaftendes Pulver, abgesetzt war.

Weil das Mycel tief im Agar eingedrungen war, verbesserte ich den Versuch dadurch, dass das Mangancarbonat nicht mehr auf die fertige Agarplatte gebracht, sondern, beim Anfertigen davon, in den noch flüssigen in Leitungswasser gelösten Agar suspendiert wurde, wodurch es leicht ist kreideweisse

¹⁾ Wahrscheinlich handelt es sich hierbei (und ebenso bei den Manganibakterien) um $Mn_3 O_4$, doch werde ich weiterhin von »Braunstein« sprechen.

Platten zu erhalten, welche ausser dem Mangancarbonate nur noch etwas Kaliumfosfat und Chlorammon oder Nitrat enthalten. Wurde auf eine solche Platte Material des neuen Schimmels übergebracht, so kam das Mycel im Innern besser mit dem Carbonat im Kontakt, wodurch eine vollständige Lösung desselben unter Aufhellung der Platte zu stande kam, während die »Braunsteinsferite« sich in dem durchsichtig gewordenen Boden als tiefschwarze Körner absetzten (Taf. III Fig. 1). Zugleich wurde dabei die Erscheinung der LIESEGANG'schen Ringe sichtbar, welche bei *Actinomyces annulatus* unter ganz anderen Bedingungen entsteht und wovon man das Bild findet auf Taf. I, Bd. I dieser Zeitschrift. Man wird sehen, dass es sich bei der Entstehung dieser »Braunsteinplatten« um eine der schönsten mikrobiologischen Versuche handelt.

Glücklicherweise erzeugte der neue Pilz auf den Manganplatten sehr leicht Sporen, wodurch das Determinieren möglich wurde. Es stellte sich heraus, das es sich dabei handelte um eine Art der Gattung *Papulospora*, welche verwandt ist mit *P. sepedonioides* PREUSS ¹⁾, mit dieser Art nach der Beschreibung von SACCARDO ²⁾ jedoch nicht völlig identisch sein kann, und deshalb weiterhin *Papulospora manganica* genannt werden wird.

Weil die durch diesen Pilz erzeugte Manganverbindung bei makroskopischer Betrachtung tief schwarz ist, lässt sie sich nicht leicht von Braunstein unterscheiden, und es ist wahrscheinlich, dass dieselbe auch teilweise oder gänzlich wirklich aus Braunstein besteht, in welchem Falle die neue *Papulospora*, sowie die übrigen sofort zu besprechenden Pilze »Braunsteinpilze« würden genannt werden können. Wenn dieses nun auch nicht ganz sicher ist, werde ich doch kurzweilshalber diesen Namen verwenden, weil die genannten Reaktionen auch für Braunstein charakteristisch sind.

Die Braunsteinsferite erreichen, wie man aus der Fig. 2 ersehen kann, relativ gewaltige Dimensionen und können selbst dem unbewaffneten Augen sichtbar werden; so misst der in den Fig. 2 links photographierte Sferit beinahe 350 μ , während ein scharfes Auge schon schwarze Kügelchen von 100 μ auf weissem

1) LINDAU, ENGLER'S Pflanzenfamilien, Th. 1, Abt. 1, S 428, Fig. 221 D.

2) SACCARDO, Sylloge Fungorum, Bd. 4, Pag. 59, 1886.

Boden als gesonderte Teilchen erkennt. Die Sferite sind vollständig rund oft mit rauher Oberfläche. Daneben liegt jedoch im Agar ein unregelmässiger Detritus, welcher besonders an den Zellwänden der Pilzfäden abgesetzt ist. Die Reaktionen dieser Massen sind wieder, eben wie bei der Mangancarbonatbakterie, diejenigen des Braunsteins, oder vielleicht genauer gesagt, der höheren Manganoxyde, in soweit dadurch in saurerer Lösung aus Jodkalium Jod frei gemacht, während Wasserstoffsuperoxyd energisch gespalten wird, und Lösung, mit dunkelbrauner Farbe in concentrirter Schwefelsäure stattfindet. Es ergibt sich jedoch, dass die Sferite nicht völlig aus Manganoxyden bestehen, sondern, es ist möglich, nach Extraktion mit einer nicht all zu concentrirten Säure, darin eine farblose, aus organischem Stoff bestehende Kugel zu beobachten.

Dass auch in anderen Fällen, wobei Sferite in kolloidalen organischen Massen entstehen eine Kugel organischen Materiales Träger der abgelagerten Sferitsubstanz ist, wissen wir seit 1872 aus HARTING'S ¹⁾ Beobachtungen über die künstlichen Calcosferite und die natürlichen der Muschel- und Eischalen. ²⁾

Das Mycel der *Populospora* kriecht in und über die Agaroberfläche und erzeugt sehr kurze, sich kaum aus dem Agar erhebende Hyphen, welche die Conidienköpfchen tragen. Diese fallen leicht auseinander in farblose durchsichtige Sporen von länglicher Gestalt (Fig. 3). Die Sporen keimen auf die verschiedensten Nährböden und können z.B. auf Bouillongelatine gebracht reine Schimmel Kolonien erzeugen. Auf diesem Boden erzeugt der Pilz jedoch keine deutlich Conidienköpfchen, sondern mehr vereinzelt stehende Sporen, welche auf Agarplatten ohne andere Nahrung wie Chlorammon und Kaliumfosfat, wieder zu der gewöhnlichen *Populospora*form auswachsen. Hierbei ist das Agar selbst Kohlenstoffquelle. Hat man dem

¹⁾ P. HARTING, Recherches de Morphologie synthétique. (Acad. Royale Néerlandaise) Amsterdam, v. d. Post, 1872.

²⁾ Wunderschöne »Eisenfosfersferite« erhält man, wenn in Gelatine Ferroammonsulfat gegen Natriumfosfat diffundiert. Auch darin wurde, nach vorsichtiger Extraktion mit Säure, eine durchsichtige Kugel organischer Substanz als Träger des Eisenfosfates gefunden. Manganioxydsferite, werden hier, wie ich glaube, zum ersten Male beschrieben.

Agar Manganocarbonat zugesetzt, so wird das Wachstum allerdings begünstigt, jedoch ist auch dann das Agar die einzige Kohlenstoffquelle. Versucht man den Schimmel mit Manganocarbonat allein zu ernähren, so bekommt man eben so wenig ein Resultat, wie mit *Bacillus manganicus*, sodass bei der Ernährung auch von *Papulospora* Chemosynthese sicher ausgeschlossen ist. Das Manganocarbonat ist aber dem Wachstum entschieden günstig und als Nahrung zu betrachten.

Ueber den eigentlichen Chemismus des Oxydationsvergangs ist noch wenig bekannt. Die Lage der Braunsteinsferite in ziemlich grossen Entfernungen der Mycelfäden, zeigt vielleicht, dass irgend ein, aus dem Mycel herausdiffundierende oxydierende Substanz dabei in Betracht kommt. Um Alkali handelt es sich dabei nicht, denn die Reaktion der Kulturplatte verändert durch das Wachstum des Pilzes nicht merkbar.

Salze wie Manganlaktat und Manganacetat sind für *Papulospora* ziemlich gut geeignete Kohlenstoffquellen und auch daraus entstehen in Agarplatten kleine Braunsteinsferite von schwarzer Farbe, jedoch nur langsam und durchaus nicht so reichlich, wie aus dem Carbonate.

Mit Manganpepton und ähnlichen Präparaten, erhielt ich wohl Wachstum des Mycels jedoch keine Sporen und keine Manganbildung.

Anderc „Braunsteinbildner“.

Sowohl die verwandtschaftlichen Beziehungen von *Papulospora*, wie die Herkunft dieses Pilzes aus Gartenerde und die Leichtigkeit, womit die Ernährung desselben mit dem so schwierig angreifbaren Agar stattfindet, haben mich veranlasst eben im Gartenboden die Gegenwart auch von anderen »Braunsteinpilzen« zu erwarten. Weil ich aus früheren Untersuchungen wusste, dass eine Reihe sehr interessanter Erdpilze Cellulose als Kohlenstoffquelle angepasst sind, habe ich zunächst mit diesen einige Versuche angestellt, welche bald lehrten, dass eben unter den »Cellulosepilzen« auch die wichtigsten »Braunsteinschimmel« vorkommen.

Das Verfahren um die Cellulose Schimmel zu erhalten kann wie folgt eingerichtet werden: Filtrierpapierscheiben werden angefeuchtet mit einer Lösung in Leitungswasser von 1/10

Proz. Ammonitrat und 1/20 Proz. Kaliumbifosfat, und infiziert mit Humus oder gewöhnlicher Gartenerde und bei 20° bis 25° C. kultiviert. Zahlreiche Arten kommen darauf zur Entwicklung, welche, sobald die Sporenbildung beginnt abgestrichen werden auf eine frische Platte von Agar-Mangancarbonat-Ammonitrat-Kaliumfosfat, mit oder ohne 1 Proz. Cellulose.

Zur Erhaltung der Cellulose in einer Form, welche sich leicht in dem Agar verteilen lässt, wird Baumwolle mit starker Salzsäure behandelt, und nachdem dieselbe ganz spröde geworden (»carbonisiert«) ist, nach vollständiger Entfernung der Säure getrocknet und pulverisiert, wobei man leicht ein sehr feines, beinahe strukturloses Pulver erhalten kann, welches eine sehr günstige Mikrobennahrung, insbesondere für Schimmel darstellt.

Auch habe ich Waldhumus und Gartenerde sofort ausgesät auf Mangancarbonat-Agarplatten, also ohne vorherige Kultur auf Filtrierpapier und auch dann Braunsteinschimmel erhalten. Ebenso auf Filtrierpapier mit Mangancarbonat und Salzen.

Es hat sich bei diesen verschiedenen Versuchen herausgestellt, dass Pilze aus verschiedenen Verwandtschaftsreihen das Vermögen der Manganbildung besitzen und darunter z. B. Arten aus den Gattungen *Botrytis*, *Mycogone*, *Trichocladium* und *Sporocybe*.

Mehrere Arten darunter scheinen noch nicht beschrieben zu sein. Auch wurden ein paar anscheinend neue Gattungen gefunden worauf ich später noch zurück zu kommen hoffe. Kurz, die Manganmethode hat sich herausgestellt als geeignet um unsere Kenntnisse des Pilzreiches, sowohl in physiologischer wie in systematischer Hinsicht zu bereichern.

Von den verschiedenen Formen, womit ich mich schon etwas näher beschäftigt habe, gehören die in Gartenerde ausserordentlich allgemein vorkommenden *Mycogone*-arten, wovon besonders eine noch nicht beschriebene Art, mit aus vier tetraëdrisch angeordneten Zellen bestehenden dunkelbraunen Sporen, beinahe nie in meinen Kulturen fehlte.

Auch die so interessante Familie der Stilbaceen ist sowohl auf den Filtrierpapierscheiben, wie auf den Manganplatten, beinahe immer durch irgend eine Art repräsentiert. Die allgemeinste davon möge hier noch kurz besprochen werden. Dieselbe gehört zur Gattung *Sporocybe* und ich will daran den Namen geben:

Sporocybe chartoikoon. 1)

Wenn diese Art sich auf Filtrierpapier entwickelt hat, so sieht man darauf mit unbewaffnetem Auge kleine, schwarze Tröpfchen von c. a. $\frac{1}{2}$ mM Mittellinie, welche durch sehr kurze Stiele von c. a. 1 mM Länge getragen werden, und in ziemlich weiten Entfernungen von einander vorkommen. Es sind diese die Coremien, welche sich aus dem im Papier umher kriechenden Mycelium erheben. Drückt man ein solches Coremium flach zwischen Objektglas und Deckglas, so sieht man, dass das Sporenköpfchen aus länglichen, ziemlich grossen, c. a. 9 bei 3μ messenden Sporen besteht, welche grau gefärbt sind und jede für sich durch eine Stiel getragen werden, wie bei der der Gattung *Monosporium* (Taf. IV Fig. 4). Die Hyphenverzweigung im Köpfchen ist monopodial, doch sind die mittleren Zweige kürzer wie die seitlichen. Eben wie die Sporen sind die reifen Stiele der Coremien dunkel grau, während das Mycelium im Papiere farblos ist. An der Basis der Coremien finden sich, auch in den Reinkulturen, eine zweite Art von Conidien, welche kugelförmig sind eine ziemlich dicke Zellwand besitzen, und c. a. 6μ messen.

Wie alle Papier bewohnende Schimmelarten ist auch diese *Sporocybe* überall mit Bakterien bedeckt, welche jedoch in den ausgereiften Sporenköpfchen nur selten sind, so dass man daraus leicht soviel bakterienfreies Sporenmateriale abheben kann, dass daraus reine, weit aus einander liegende Kolonien kultiviert werden können. Eben wie bei *Papulospora* wachsen diese Kolonien auf den verschiedensten Kulturböden; mit Erfolg verwendete ich, dafür die gewöhnliche Bouillon-gelatine. Diese wird wenig und erst ziemlich spät verflüssigt; Coremien bilden sich darauf nicht sondern nur vereinzelt stehende, einsporige Hyphen, wesshalb das Determinieren des Pilzes, wenn die Kultur nur von diesem Kulturboden bekannt wäre, unmöglich sein sollte. In diese Verbindung wünsche ich noch zu bemerken, dass die Cellulosemethode nicht allein für die Ausbildung der Coremienzustände der Hyphomyceten, sondern für diejenige der Fruktifikationsorgane im allgemeinen besonder günstig ist, was z. B.

1) Ob diese Art wirklich neu ist, ist natürlich unsicher. SACCARDO (Sylloge fungorum, Bd. 4, Pag. 604, April 1886) erwähnt aber keine einzige Papier bewohnende Art, und die beiden von ihm angeführten Erdbewohner, nämlich *S. sphaerophila* und *S. Phillipsii*, sind, seiner Diagnose nach, andere Arten.

hervorgeht aus der Leichtigkeit, womit sich auf der Filtrierpapierscheiben die Perithezien von *Chaetomium* und *Sordaria* entwickeln.

Auf den Mangancarbonatagarplatten sind die Wachstumserscheinungen und die Bildung der „Braunsteinsferite“ ähnlich den nämlichen Vorgängen bei *Papulospora*, die LIESEGANG'schen Ringe werden dabei wohl oder nicht gebildet; warum dieses nicht immer geschieht ist mir unbekannt. Zwar giebt Fig. 1 das Bild einer Kultur von *Papulospora*, welche diese Ringe in schönster Weise erzeugt hat, kann jedoch, unter Umständen, auch auf *Sporocybe* passen.

Dass auch hier für die Oxydation des Mangancarbonates organische Nahrung, wenn auch in grosser Verdünnung notwendig ist, lässt sich leicht feststellen und ebenfalls, dass sowohl Agar wie Cellulose für diese Nahrung geeignet sind. Dass die Umwandlung dieser Körper die Gegenwart eines spezifischen die Cellulose oder den Agar lösenden Enzyms erfordert ist gewiss. Im Falle des Agars handelt es sich dabei nicht um die durch Bakterien gebildete Gelase, denn dieses Enzym vermag in den Agarplatten mehr oder weniger leicht zu diffundieren, was hier nicht beobachtet wird.

Die Oxydation des Mangancarbonates dürfte auch bei der hier betrachteten Schimmelart wohl mit irgend einem, nicht nur in sondern auch ausserhalb dem Mycel vorkommenden oxydierenden Körper zusammen hängen, denn anders wäre es nicht klar warum die Braunsteinsferite sich in relativ grossen Entfernungen der Mycelfäden absetzen können.

Bei den Mangancarbonatbakterien haben wir dagegen gesehen dass die Bildung des Manganisalzes sicher nur in Contact mit dem Bakterienkörper stattfindet.

Die Oxydation von Ammonsalzen oder Nitriten können die Manganschimmel eben so wenig bewirken, wie die Manganbakterien.

Wie man sieht hat die Manganmethode eine Reihe von Fragen in Flusse gebracht, welche nur zum kleinsten Teile und dann noch unvollständig beantwortet sind.

FIGURENERKLÄRUNG

ZU TAFEL III und IV.

- Fig. 1. (Taf. III) *Papulospora manganica*. Kultur dieses Pilzes auf einer Platte von der Zusammensetzung: Leitungswasser, 2 % Agar, $\frac{1}{20}$ % $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, $\frac{1}{50}$ % $\text{K}_2 \text{HPO}_4$, 1 % MnCO_3 . Die Mangansiferite setzen sich zum Teil ab mit Bildung der LIESEGANG'schen Ringerscheinung.
- Fig. 2 (Taf. III) (350). *Papulospora manganica*. Kultur auf einer Platte der bei Fig. 1 genannten Zusammensetzung. Die grossen schwarzen Flecke sind Braunsteinsiferite. Uebrigens sieht man das Mycel und einige Sporenköpfchen.
- Fig. 3 (Taf. IV) (350). *Papulospora manganica*. Reinkultur auf Boden ohne Mangancarbonat.
- Fig. 4 (Taf. IV) (900). Kleines Stück eines Coremiums von *Sporocybe chartoikoon*, auf Filtrierpapier wachsend.

*Laboratorium für Mikrobiologie der
Technischen Hochschule zu Delft.*

DIE SELEKTION BEI DER NAHRUNG VON ASPERGILLUS NIGER.

Rohrzucker, Maltose, Raffinose und Gemische von Rechts- und
Linkswelnsäure als organische Nahrung

VON

Dr. H. I. WATERMAN.

§ I. Allgemeine Erörterungen.

Wenn wir ausgehen von einer vollständigen anorganischen Kulturflüssigkeit, mit allen für die Entwicklung von *Aspergillus niger* 1) notwendigen Elementen, so wird die Zufügung einer dazu geeigneten Kohlenstoffquelle z. B. Glukose, die Bildung einer Pilzdecke veranlassen. Nicht immer geschieht aber die Entwicklung mit gleicher Schnelligkeit. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dasz, wenn wir ein Gemisch einiger organischen Verbindungen: A, B, C, u. s. w. dem Pilze zur Nahrung darbieten, sich das gegenseitige Verhältnis der Quantitäten dieser Verbindungen während der Entwicklung ändern wird. A wird rascher assimiliert als B, B wiederum rascher als C.

Diese der Praxis entnommene Auffassung folgt schon ohne weiteres bei der Betrachtung des Lebensprozesses als Komplex chemischer Reaktionen, denn die Schnelligkeit einer chemischen Reaktion ist abhängig von der Natur der Verbindungen, die sich an die Reaktion beteiligen.

1) Ohne weitere Andeutung soll man im folgenden hierunter verstehen eine im Laboratorium für Mikrobiologie anwesende Stammform dieses Pilzes.

Jedoch ist die Nahrung mit einem Gemische von organischen Verbindungen (A, B, C, u. s. w.) keineswegs so einfach, als man im Anfang vermuten würde.

Immer wird gegenseitige Beeinflussung stattfinden, deren Ursprung im betreffenden Organismus zu suchen ist, wenn nicht die Verbindungen schon in der Nährlösung einander gegenseitig beeinflussen, welches im Allgemeinen nicht oder nur in geringem Masse der Fall sein wird.

Prinzipiell sind wir also im Stande, mittels Lebensprozesse zahlreiche Verbindungen aus einem Gemische zu isolieren. Dergleiche Methoden werden im Laboratorium häufig ausgeführt. Wir können z. B. aus einem Gemische von Galaktose und Glukose die erstgenannte Zuckerart isolieren, indem wir das Gemisch der Wirkung einer Hefe überlassen.

Doch haben dergleiche Darstellungsmethoden, vielleicht besser Reinigungsmethoden genannt, viele Nachteile. Meistens sind dieselben wenig ökonomisch, weil auch die darzustellende Verbindung oft vom betreffenden Organismus zerstört wird.

Ein merkwürdiges Beispiel dieser Reinigungsmethoden ist die Spaltung racemischer Gemische. Hier werden zwei Verbindungen getrennt, welche in hohem Grade mit einander verwandt sind. Das klassische Beispiel ist die Darstellung von Linksweinsäure aus Traubensäure.

Es war ein glücklicher Umstand, dasz dieser Prozes untersucht wurde von dem genialen PASTEUR 1), der die Eigenschaften der Rechts- und Linksweinsäure vollständig kannte.

Die Einzelheiten seiner allgemein bekannten Versuche brauche ich hier nicht zu wiederholen. Seines Erachtens war ein asymmetrischer Bau von einigen Bestandteilen des betreffenden Organismus wahrscheinlich, ohne dasz er aber den Beweis dafür geben konnte.

Er sagt nämlich: »Quant à la cause intime de la différence, »que j'ai signalée entre la fermentation des deux acides tartriques »*il me paraît vraisemblable* de l'attribuer au pouvoir rotatoire »des matières, qui entrent dans la constitution de la levûre. »On comprend que, si la levûre est naturellement constituée

1) Compt. rend. 46 (1858). S. 615; 51 (1860) S. 298.

»par des matières dissymétriques, elle ne s'accomodera pas à un degré égal d'un aliment qui lui-même sera dissymétrique dans le même sens ou en sens inverse.«

Weniger bekannt ist der Weg, welcher PASTEUR zu diesen Versuchen brachte. 1) Es war nämlich bei einem Studium betreffend der künstlichen Nährlösungen, welches RAULIN fortgesetzt hat. Er benutzte eine Lösung der Aschenbestandteile der Hefe und der Weinsäureammoniak in destillirtem Wasser mit und ohne Zucker.

Spätere Untersuchungen haben unsre Kenntniss der biochemischen Spaltung racemischer Gemische, trotz den zahlreichen Versuchen, ziemlich wenig gefördert.

Besonders von LEWKOWITSCH sind in dieser Hinsicht Versuche angestellt.

Eine inaktive Milchsäureammoniumlösung wurde mit *Penicillium glaucum* rechtsdrehend. 2)

Auch spaltete er das Ammoniumsalz der racemischen Mandelsäure. 3) Die l-Mandelsäure wurde besser angegriffen. Sorgfältigere Untersuchungen über diesen Gegenstand sind von LINOSSIER 4) und von MAC KENZIE und HARDEN 5) ausgeführt.

Die letzteren 6) konnten die Resultate LEWKOWITSCH' nicht in jeder Hinsicht bestätigen. Später untersuchte LEWKOWITSCH 7) die racemische Glycerinsäure ($C_2H_5OCH_2CHOHCO_2H$). Eine inaktive Ammoniumglyceratlösung wurde durch *Penicillium glaucum* linksdrehend.

MC. KENZIE und HARDEN arbeiteten mit dem Calciumglycerat. Weiter haben diese Forscher noch bei zahlreichen anderen Säuren die biochemische Spaltung der betreffenden Racemate in die Antipoden ausgeführt. Meistens wurde die

1) W. KRUSE. Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910. S. 89 ff.

2) LEWKOWITSCH. Ber. d. deutsch chem. Ges. (1883) 16, 2720.

3) LEWKOWITSCH. Ber. d. deutsch chem. Ges. 15, 1505; 16, 1568.

4) LINOSSIER. Bull. soc. chim. 1891, 3e Ser. 6, 10.

5) MC. KENZIE und HARDEN. Proc. Chem. Soc. (1903). 19, 48.

6) MC. KENZIE und HARDEN. Journ. of the chem. Soc. 83, 432 (1903).

7) LEWKOWITSCH. Ber. d. deutsch chem. Ges. 16, 2721.

Lösung nach der Entwicklung des Pilzes optisch aktiv. In einigen Fällen aber wurde, obwohl der Pilz sich wohl entwickelte, keine optische Aktivität der Lösungen beobachtet, wie z. B. bei Dimethoxybernsteinsäure, Propoxybernsteinsäure und Aethoxybernsteinsäure. PURDIE und WALKER 1) hatten aber bei dem Ammoniumsalz der letzten Säure eine rechtsdrehende Lösung erhalten. E. FISCHER hatte schon früher die Spaltung der Mannonsäure in die Antipoden ausgeführt 2), während PLÖCHT und MAIJER 3) die Phenylglycerinsäure gespalten hatten. Weiter können wir noch eine Untersuchung von S. CONDELLI über die Spaltung der racemischen Weinsäure durch *Aspergillus niger* 4) zitieren.

In den letzten Jahren sind besonders von HERZOG und MEIER 5) Versuche mit getöteten Pilzkulturen ausgeführt. Sie lieferten den Beweis, dass die optischen Antipoden mehrerer Oxysäuren mit verschiedener Schnelligkeit von getöteten Pilzkulturen verbrannt wurden.

Rechtswinsäure wurde viel besser als Linkswinsäure angegriffen. Die racemische Säure stand zwischen beiden.

Diese Versuche beweisen also, dass bestimmte Bestandteile des Pilzorganismus schon die betreffende Spaltung veranlassen, während wir dabei die Entwicklung des Pilzes ausschalten können. Die in dieser Weise erhaltenen Resultate können wir nicht ohne weiteres auf die Versuche mit lebendiger Pilzsubstanz übertragen, weil wir dann auch mit der Entwicklung dieses Pilzes zu tun haben. Ein Mangel der meisten betreffenden Arbeiten war eine genügende quantitative Untersuchung der gebildeten Pilzsubstanz. Weiter musste man auch besonders die Form des Organismus, womit man arbeitet, betrachten. Schon hatte AUGUST MEIER 6) hierauf die Aufmerksamkeit gelenkt.

1) PURDIE und WALKER, Journ. of the Chem. Soc. (1893) LXIII, 250.

2) E. FISCHER, Ber. d. deutsch-chem. Ges. 23, 379.

3) PLÖCHT und MAYER, Ber. d. deutsch-chem. Ges. 30, 1611.

4) S. CONDELLI, Ueber die Spaltung der racemischen Weinsäure durch *Aspergillus niger*, Ref. KOCHS', Jahresber. 1904.

5) HERZOG und MEIER, Z. für physiol. Chemie, 57, 35 (1908); 59, 57 (1909).

6) AUGUST MEIER, Ueber Oxydation durch Schimmelpilze, Dissertation Karlsruhe, 1909.

Bei unsern Betrachtungen sind wir vom Gemische verschiedener Verbindungen (A. B. C. u. s. w.) gekommen auf Gemische zweier optischen Antipoden. Hierdurch ist die Sache etwas verwickelter geworden. Zwar wissen wir, dasz z.B. eine wässrige Traubensäurelösung grösztenteils aus freier l—und d—Säure besteht 1), doch haben wir auch in mehr konzentrierten Lösungen die ungespaltete Traubensäure zu berücksichtigen und es ist doch möglich, dass diese Verbindung ungeändert in den Organismus eindringt.

Noch schwerer wird eine Übersicht des Prozesses, wenn wir im Anfang nur mit einer Verbindung zu machen haben, aus welcher sich zwei oder mehrere Verbindungen von einfacher Konstitution unter dem Einflusse des Lebensprozesses bilden können (In wie weit wir einen Enzymprozess trennen können von einem Lebensprozesse, ist noch immer eine offene Frage, weil eine scharf formulierte Definition eines Enzyms noch immer nicht gegeben ist.)

Ich denke z.B. an Polysaccharide, (Rohrzucker, Raffinose u.s.w.), aber daneben auch an weniger gut definierte Verbindungen, wie die Gerbsäure. Mit dieser letzten Verbindung ist der Name VAN TIEGHEMS verbunden, der zuerst den Pilz mit schwarzen Konidien, welchen wir nach ihm *Aspergillus niger* nennen, in wissenschaftlicher Weise beschrieben hat. VAN TIEGHEM 2) beobachtete die Zerstörung der Gerbsäure unter dem Einfluss der Entwicklung von *Penicillium glaucum* oder *Aspergillus niger*, wobei auch Glukose entstand. Er dachte an eine Umwandlung des Tannins in Gallussäure und Glukose unter Aufnahme der Elemente des Wassers. Vermutlich war das Tannin, mit welchem er arbeitete, nicht rein und enthielt noch andre Pflanzenprodukte, denn er spricht von einer wässrigen Lösung des Tannins oder von einem filtrirten Gallnussextrakt. VAN TIEGHEM stellte fest, dasz ohne Sauerstoff der Prozess nicht stattfindet.

»Für die Entwicklung ist es Bedingung«, sagt er, dasz der »Pilz lebt und sich entwickelt innerhalb der Lösung« ; in diesem

1) L. MARCHLEWSKI. Ber. d. D. Ch. G. 25 (1892) S 1556.

2) VAN TIEGHEM. Compt. rend. 65, 1091; Vgl. auch GRÜTTNER, Archiv der Pharmacie 236 (1898). S. 297.

»Falle ist das Gewicht des gebildeten Myceliums sehr gering,
 »2/1000 ungefähr des Gewichtes vom dem zerstörten Tannin.
 »Wenn dagegen der Pilz sich an der Oberfläche entwickelt und
 »eine Decke bildet, ist die Art der Wirkung eine ganz andere.
 »Sofort wird dann das Tannin verbrannt unter Bildung von
 »grossen Quantitäten Kohlensäure und Umwandlung in Gallus-
 »säure findet fast nicht statt; in so weit von Umwandlung noch
 »die Rede ist, ist sie den untergetauchten Teilen des Myceliums
 zu verdanken.

»Die Glukose, welche hierbei entsteht, wird mit grösserer
 »Schnelligkeit als die Gallussäure verbrannt, so dass das
 »Endresultat ist: eine geringe Quantität Gallussäure und nur
 »Spuren Zucker und in diesem Fall ist das Gewicht der
 »erhaltenen Pilzsubstanz besonders beträchtlich.«

Wie VAN TIEGHEM dafür sorgt, dass bei der Gallussäurebil-
 dung die Entwicklung des Pilzes ganz innerhalb der Nährlösung
 stattfindet, wird nicht angegeben. Es wird gewiss der Mühe
 lohnen, diese Versuche noch einmal mit grösserer Sorgfalt und
 mehr quantitativ zu wiederholen, auch im Zusammenhang mit
 den Untersuchungen von E. FISCHER 1) über die Konstitution
 des Tannins, welcher Forscher dazu eine Verbindung von
 Poly-Digallussäure und Glukose wahrscheinlich gemacht hat.
 In vielen der hier genannten Fällen können wir den Zusam-
 menhang zwischen Reaktionsprodukt und Ausgangsprodukt (z.B.
 Gallussäure und Tannin) noch mit Sicherheit annehmen.

Denken wir jetzt aber an die Oxalsäureproduktion, 2) an
 die Bildung von Fumarsäure 3) bei Pilzen, so ist es klar, dass
 wir hier den obengenannten Zusammenhang zwischen Ausgangs-
 und Reaktionsprodukt nicht mehr in so einfacher Weise ange-
 ben können.

Diese letzteren Lebensprozesse sind vollkommen zu vergleichen
 mit denjenigen, wobei neben Pilzsubstanz nur Kohlensäure und
 Wasser entstehen, während der organische Nährstoff ganz ver-
 zehrt wird. Zusammenfassend, können wir also sagen, dass
 Zusammenhang besteht zwischen dem Selektionsprozess bei der

1) E. FISCHER, Ber. d. deutsch-chem. Ges. 45, 915 (1912).

2) WEHMER. Ber. d. deutschen Bot. Ges. IX (1891), 163.

3) FELIX EHRLICH, Ber. d. deutsch-chem. Ges. 44, 3737 (1911).

Nahrung, (wobei das gegenseitige Gewichtsverhältnis von z. B. zwei dargebotenen organischen Verbindungen während des Lebensprozesses geändert wird) und der Spaltung von racemischen Gemischen in deren optische Antipoden, wie auch zwischen der teilweisen Spaltung von komplizierten Verbindungen wie die Polysaccharide in deren mehr einfache Spaltungsstücke und den gewöhnlichen Lebensprozessen.

Die Kohlensäure als Reaktionsprodukt des Stoffwechsels des Pilzes und die Gallussäure bei der Tanningährung sind prinzipiell vollkommen mit einander zu vergleichen.

Ich will hiermit in Zusammenhang die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass man für ein vollständiges Studium der Umwandlung, z. B. eines Polysaccharids in ein Monosaccharid mittels eines Lebensprozesses, diese nicht vollkommen mit einer Enzymreaktion vergleichen kann. Man muss in solchem Falle den Stoffwechsel in ganz derselben Weise studieren, wie ich dies früher bei mehreren organischen Nährstoffen ausgeführt habe. 1)

§ 2. Rohrzucker und Maltose.

Die Resultate der Versuche findet man in Tabelle 1.

TABELLE I.

Rohrzucker.

a. 50 cM.³ Leitungswasser, 2% Rohrzucker, 0.15% NH_4NO_3 , 0.15 % KH_2PO_4 , 0.06 % MgSO_4 . Temp. 33—34° C.

	Trockensubstanz in Milligr.	Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs (±)
Nach 8 Tagen 2)	344	37—38 %
» 12 »	310	34 »
» 13 »	299	32—33 »

1) Folia microbiologica. Holl. Beitr. z. ges. Mikrobiologie. Bd. I (1912) S. 422.

2) Kein Zucker ist mehr in der Lösung vorhanden. Die Pilzdecke zeigt normales Aussehen.

b. Nährflüssigkeit wie bei a, nur wurde statt 1000 Milligr. Rohrzucker 1000 Milligr. Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11} + 1 \text{ Aq}$) benutzt.

	Trockensubstanz in Milligr.	Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs (\pm)
Nach 8 Tagen 1)	291	33 %
» 12 »	251,5	29 »
» 13 »	248	28—29 »

Man sieht aus der Tabelle, dass der Verlauf des Stoffwechsels beim Gebrauch von Rohrzucker als Kohlenstoffquelle demjenigen bei Glukose und Lävulose vollkommen gleich ist 2). Nur für Maltose fand ich kleinere plastische Aequivalente; der Unterschied ist aber nicht gross. Dieses Resultat ist auch in Übereinstimmung mit meiner Auffassung über die Faktoren, welche die Grösze des plastischen Aequivalents des Kohlenstoffs für *Aspergillus niger* bedingen 2). Auch für 50 cM³. einer analogen zwei prozentigen Kartoffelmehllösung fand ich ein analoges Resultat (Vgl. Tabelle II).

TABELLE II.

Kartoffelmehl. (1 Gr. pro 50 cM³.)

	Trockensubstanz in Milligr.	Plastisches Aequiva- lent des Kohlenstoffs. (\pm)
Nach 8 Tagen 3)	324	33—34%
„ 12 „	269	28 „

Mit 1 Gr. Glykogen 4) pro 50 cM³. als einzige organische Nahrung wurde ein merkwürdiges Resultat erzielt. Von drei Versuchen gab nur einer Entwicklung. In den zwei

1) Kein Zucker ist mehr in der Lösung vorhanden. Die Pilzdecke zeigt normales Aussehen.

2) Folia microbiologica Bd. I (1912), S., 422.

3) Kein Kartoffelmehl ist mehr in der Lösung. Die Pilzdecke zeigt normales Aussehen.

4) Von E. MERCK, Darmstadt.

andren entstand keine Pilzdecke. Die Entwicklung des Pilzes beim ersten Versuch war nach 25 Tagen kräftig und ziemlich viele Sporen waren gebildet; die Trockensubstanz hatte aber ein Gewicht von nur 157 Milligr, während kein Glykogen sich mehr in der Lösung vorfand und auch keine „Fehling“ reduzierende Substanzen anwesend waren. Vermutlich ist diese niedrige Zahl einer stattgefundenen Mutation zuzuschreiben 1). (Vgl. auch einen analogen Fall bei der Links-weinsäure). Auch die Tatsache, dass nur einer der drei Versuche Entwicklung gegeben hatte, war für diese Auffassung eine Stütze.

Ich war nicht im Stande, beim Rohrzucker und bei der Maltose Spaltungsprodukte zu isolieren und hatte dies auch nicht erwartet, weil die gleiche Assimilationsgeschwindigkeit für die event. entstehende Reaktionsprodukte besteht. (Glukose und Lävulose). Wohl war dies bei der Raffinose der Fall (s. u.).

§ 3. Raffinose.

Von den Trisacchariden wurde nur die Raffinose untersucht. Dieser Zucker war besonders merkwürdig für das Studium, da derselbe aus Monosacchariden aufgebaut ist, welche jedes für sich mit ungleicher Schnelligkeit von *Aspergillus niger* angegriffen werden. Es war nicht so sehr eine event. mögliche Spaltung in die Komponente, wobei vielleicht die Melibiose oder die Galaktose erhalten werden könnte, welche unsre Aufmerksamkeit in Anspruch nahm, als vielmehr der quantitative Verlauf des Verschwindens der Raffinose in Zusammenhang mit der Entwicklung des Pilzes.

Dass Raffinose unter der Wirkung verdünnter Säuren oder durch Enzyme in Lävulose und Melibiose gespalten werden kann, ist schon längst bekannt. Die Melibiose kann wiederum Galaktose und Glukose liefern.

Im allgemeinen aber leistet die Melibiose ihrer Zersetzung einen grösseren Widerstand und das habe ich auch hier bestätigen können.

Für die Drehung des polarisirten Lichtes fand ich für die benutzte Raffinose:

1) H. J. WATERMAN, Verslagen Kon. Akad. v. Wetenschappen Amsterdam, Wis- en Natuurk. Afd. Mei 1912. Z. f. Gärungsphysiol. 3 (1913), 1.

Für eine 2 % Lösung in destillirtem Wasser, Rohrlänge = 2 dM : α_D (Polarimeter v. LAURENT) = $4^\circ 10'$

α (Saccharimeter v. SCHMIDT u. HAENSCH) = + 11,95 (weisses Licht)

z = die Anzahl Gr. Raffinose p. 100 cM³ = 2

l = die Länge des Polarisationsrohres in dM = 2

$$[\alpha] = \frac{4,17 \cdot 100}{2 \cdot 2} = \frac{417}{4} = 104^\circ$$

Berechnet für wasserfreie Raffinose (C₁₈ H₃₂ O₁₆):

$$[\alpha]_D = 105^\circ$$

Die Raffinose war also praktisch wasserfrei.

Die spezifische Drehung von Raffinose für weisses Licht und für die D-Linie ist offenbar nicht sehr verschieden, denn hier gilt ungefähr die Gleichung:

$$\frac{2}{26} \cdot 100 : 11,95 = 66,5 : 105, \text{ also:}$$

$$\frac{2}{26} \cdot 100 \cdot 105 = 808 \text{ und } 66,5 \cdot 11,95 = 795$$

Doch findet man für einige Farben andre Zahlen für die spezifische Rotation angegeben 1) nl. α (j) = ± 116 .

Die Resultate der Versuche mit Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle für *Aspergillus niger* findet man in Tabelle III.

Aus dieser Tabelle sieht man, dass noch beträchtliche Quantitäten die Polarisations Ebene drehende Verbindungen, vermutlich Melibiose oder (und) Galaktose, sich in der Nährlösung vorfinden.

Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Bestimmung des Reduktionsvermögens der Kulturlösung mit „Fehling“.

Um zu entscheiden mussten zwei Bestimmungen ausgeführt werden:

1°. Bestimmung der Drehung des polarisirten Lichtes vor und nach Ablauf der Inversion der Reaktionsflüssigkeit.

2°. Bestimmung der Reduktionszahl der Lösung vor der Inversion.

1°: Die nach 12 Tagen erhaltene Kulturlösung wurde filtriert. Sie drehte die Polarisations Ebene nach rechts. (Saccharimeter

1) v. LIPPMANN, Chemie der Zuckerarten S 1636.

TABELLE III.

Raffinose.

50 cM.³ Leitungswasser, 2 ‰ Raffinose (wasserfrei), 0,15 ‰ NH₄ NO₃,
0,15 ‰ KH₂ PO₄, 0,06 ‰ Mg SO₄. Temp. : 33–34° C.

Anzahl Tage nach der Impfung.	Polarisationszahl (in Graden VENTZKE) berechnet für 50 cM. ³ der Flüssigkeit und bestimmt mit dem Saccharimeter von SCHMIDT und HAENSCH für weisses Licht. Rohrlänge 2 dM.	Gewicht der Pilzsubstanz in Milligr.	Entwicklung und Sporenbildung.
0	+ 11,95°	—	
1	—	—	++, keine Sporen
4	—	—	+++++, ziemlich viele Sporen
6	—	—	" " " "
8	+ 7,2° 1)	142,5	
12	+ 7,0° 1)	144,5	
13	+ 6,7° 1)	140.—	

von SCHMIDT und HAENSCH) Für eine Rohrlänge von 4 dM. und weisses Licht fand ich + 19,0° (die in Tabelle III angegebene Zahl ist berechnet für 2 dM. und für 50 cM.³ der Flüssigkeit, dabei die Verdampfung des Wassers während der Versuchsdauer berücksichtigend).

Diese filtrirte Lösung wurde invertirt:

A.	B.
15 cM. ³ des Filtrates	15 cM. ³ des Filtrates
+ 3 cM. ³ destillirtes Wasser	+ 3 cM. ³ Salzsäure (Sp. G. 1,19)

9 Minuten gekocht

A und B wurden nach der Abkühlung auf 25 cM.³ verdünnt und polarisirt:

Rohrlänge = 2 dM.

A.	B.
+ 5,8.	+ 2,8.

Die Drehung hat also beträchtlich abgenommen und ist auf weniger als die Hälfte reduziert. Die für A gefundene Zahl, + 5,8 ist vollkommen in Uebereinstimmung mit der oben gefundenen (+ 19,0 für 4 dM. Rohrlänge), denn $\frac{25}{15} \cdot 5,8 \cdot 2 = + 19,4^\circ$.

1) Die Lösung reduziert „FEHLING“ kräftig.

Das Kochen mit destillirtem Wasser hat, wie man erwarten konnte, die Drehung der Lösung nicht geändert. Ich wiederholte diesen Inversionsversuch auch noch mit der nach 13 Tagen erhaltenen Kulturflüssigkeit. Das Resultat war ganz dasselbe. Die Polarisationszahl kam auch hier bis auf die Hälfte. Nun war es gerade besonders auffallend, dass sowohl Raffinose wie Melibiose eine dergleiche Polarisationsverminderung verursachen. Deshalb bestimmte ich die Reduktionszahl mit »Fehling« vor der Inversion.

2^o: Ich nahm eine Lösung von 1 gr. Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11} + 1 \text{ aq.}$) in 100 cM.³ destillirtem Wasser. 10 cM.³ Fehling korrespondierten mit 8,3 cM.³ dieser Lösung.

Die nach 13 Tagen erhaltene Kulturlösung (Polarisation für eine Rohrlänge von 4 dM.) und für weisses Licht = + 17,9° Ventzke (die in der Tabelle III angegebene Zahl ist berechnet für 50 cM.³ Flüssigkeit und 2 dM. Rohrlänge) wurde filtrirt.

5 cM.³ »Fehling« verbrauchten > 3 und < 6 cM.³ dieses Filtrates. Dieses Resultat wies schon mit ziemlich grosser Bestimmtheit in Verbindung mit den Resultaten der Inversion darauf hin, dass Melibiose in beträchtlichen Quantitäten in der Lösung anwesend war. Eine genauere Bestimmung gab:

10 cM.³ Fehling verbrauchten 8,10 cM.³ des Filtrates. Für das Reduktionsvermögen von einer 0,6 % Melibioselösung wird angegeben, dass es 92 % von demjenigen der Maltose beträgt 1) (Dauer des Kochens: 4 Minuten). Also sind in 8,1 cM.³ der nach 13 Tagen erhaltenen Kulturflüssigkeit $\frac{8,3}{100} \cdot \frac{100}{92} \cdot 1 \text{ gr.}$ Melibiose ($C_{12}H_{22}O_{11} + 1 \text{ aq.}$) vorhanden.

In 37,5 cM.³. (das Volum der Kulturlösung war nach 13 Tagen nur 37,5 cM.³), waren also $\frac{37,5}{8,1} \cdot \frac{8,3}{90}$ Gr. Melibiose

(+ 1 aq.) = $\frac{37,5}{8,1} \cdot \frac{8,3}{92} \cdot \frac{342}{360}$ Gr. Melibiose (wasserfrei) = 0,4 Gr.

Diese zwei Ergebnisse beweisen, dass in der Lösung nach 13 Tagen nur 0,4 Gr. Melibiose anwesend sind und keine andren Zuckerarten.

Kontrolle: Wenn wir von der Annahme ausgehen, dass die

1) v. LIPPMANN, Eie Chemie der Zuckerarten. S. 1596.

spezifische Rotation der Melibiose für die verschiedenen Wellenlängen dieselbe sei, so können wir für 4 dM. Rohrlänge und weisses Licht für die Kulturflüssigkeit nach 13 Tagen erwarten:

$$2 \cdot \frac{100}{37.5} \cdot 0,4 \cdot 100 \cdot \frac{143}{66,4} = + 17,7^\circ \text{ Ventzke}$$

$$\left[[\alpha]_D \text{ Melibiose} = + 143^\circ; [\alpha]_D \text{ Rohrzucker} = + 66,4^\circ \right]$$

Wir fanden (s.o.): + 17,9° Ventzke.

Die Uebereinstimmung ist also sehr gut.

Resultat dieser Versuche ist also, dass man aus 1 Gr. Raffinose nach 13 Tagen erhalten kann: 0,4 Gr. Melibiose (wasserfrei), 0,14 Gr. Pilzsubstanz (bei 105° getrocknet), Kohlensäure und Wasser.

Die theoretisch mögliche grösste Ausbeute beträgt: $\frac{342}{576} \cdot 1$ Gr. = 0.59 Gr. Melibiose.

Die Ausbeute beträgt also: $\frac{4000}{59} = 68\%$ der theoretischen.

Ein nicht unbeträchtlicher Prozentsatz der in der Raffinose anwesenden Melibiose wird also assimiliert.

Das Gewicht der gebildeten Pilzsubstanz ist ziemlich konstant. Aber das ist nur scheinbar, denn die noch stattfindende Assimilation, auf welche das fortwährende Sinken der Polarisationszahl hinweist, ist im Gleichgewicht mit der Verarbeitung des Zwischenproduktes des Stoffwechsels.

Berechnen wir ungefähr die Grösse des plastischen Aequivalents des Kohlenstoffs nach 13 Tagen:

1 Gr. Raffinose enthält 428 Mgr. C.

Die gebildete Pilzsubstanz hatte ein Gewicht von 140 Mgr. und enthält ungefähr:

$$\frac{46}{100} \cdot 140 = 64,5 \text{ Milligr. C.}$$

Das plastische Aequivalent nach 13 Tagen:

$$\frac{6450}{428} = 15\% \text{ C.}$$

Diese sehr niedrige Zahl ist mit grosser Wahrscheinlichkeit zum Teil einer stattgefundenen Mutation zuzuschreiben.

§ 4. Gemische von Rechts- und Linksweinsäure als einzige Kohlenstoffquelle für *Aspergillus niger*.

In § 1 sind schon die betreffenden Versuche von *Pasteur* und andren Forschern über den quantitativen Verlauf der Assimilation der Traubensäure durch *Penicillium glaucum* zitiert. Auch habe ich die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, dass die individuellen Eigenschaften des Stammes vom Organismus mit welchem man arbeitet, von besonderer Bedeutung ist. 1)

So fand ich, dass ein bei andren Versuchen benutzte Stamm von *Penicillium glaucum* ein wenig prononziertes Selektionsvermögen hatte. 2)

Wohl war dies der Fall mit meiner Stammform von *Aspergillus niger*. In dieser Weise war ich im Stande, die Linksweinsäure mit guter Ausbeute (60 %) darzustellen. Mittels dieser Versuche konnte ich zu gleicher Zeit feststellen, ob die zusammen mit der Rechtsweinsäure verarbeitete Linkssäure eine höhere Pilzernte erzeugt hatte. Wäre dies tatsächlich der Fall, so wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die Vermehrung der Quantität Trockensubstanz grösser oder kleiner war, als mit einer selben Menge Rechtssäure erhalten sein würde; m. a. W.: Ob das plastische Aequivalent des Kohlenstoffs von Rechtsweinsäure für eine selbe Form von *Aspergillus niger*, demjenigen der Linkssäure gleich war. Es musste also neben den qualitativen Beobachtungen ein quantitatives Studium des Stoffwechsels ausgeführt werden. Eine direkte Antwort auf diese Frage war nicht möglich. Wohl kannte ich die Grösze des plastischen Aequivalents der Rechtsweinsäure, aber nicht diejenige der Linksweinsäure.

Aspergillus niger entwickelte sich nicht, wenigstens nicht im Anfang, auf Lösungen der Linksweinsäure. Eine 2%, 1% und 0,6% Lösung der Linkssäure, von deren Reinheit ich mich mittels

1) Vgl. auch AUGUST MEIER, l. c.

2) J. BÖESEKEN und H. J. WATERMAN, Verslagen Kon. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam, Wis- en Natuurk. Afd.; 29 Juni 1912, S. 208–211.

der Polarisation überzeugt hatte, gab nach 22 Tagen fast keine Entwicklung. Die anorganische Nahrung war 50 cM.³ Leitungswasser, 0,15% N H₄ N O₃, 0,15% K H₂ P O₄, 0,06% Mg S O₄, während die Temperatur 33—34° C. war. Nach ungefähr zwei Monaten beobachtete ich, dass auf der 2% Lösung beträchtliche Entwicklung stattgefunden hatte. Das anomale Aussehen der Pilzdecke liess aber vermuten, dass Mutation aufgetreten war. Ein beträchtlicher Teil derselben war braun, nur ein geringer Teil war schwarz.

Hiermit in Übereinstimmung konnten wir ein niedriges plastisches Aequivalent erwarten. Die Pilzdecke, bei 105° getrocknet, hatte ein Gewicht von nur 74 Milligr., während alle Linksweinsäure aus der Lösung verschwunden war. Diese 74 Milligr. Trockensubstanz korrespondierten mit 35 Milligr. Kohlenstoff; das plastische Aequivalent nach 2 Monaten war also $\frac{3500}{320} = 11\%$. Die niedrige Zahl musste einer Mutation zu verdanken sein, (Siehe auch unten).

Ich musste also für die Bestimmung des plastischen Aequivalents des Kohlenstoffs der Linksweinsäure, die indirekte Methode benutzen, n. durch die Beobachtung der Entwicklung von *Aspergillus niger* auf Kosten der Traubensäure, wobei keine Mutation beobachtet wurde.

Wie ich schon sagte, wird die Linksweinsäure durch *Aspergillus niger* nur wenig angegriffen, die d-Säure ist, wie früher angegeben, ¹⁾ eine ausgezeichnete Kohlenstoffquelle.

Es war also zu erwarten, dass dieselbe Form von *Aspergillus niger*, bei diesen Versuchen benutzt, im Stande sein würde, aus der Traubensäure die l-Säure in Freiheit zu stellen. Hierzu wurde eine Lösung von 2 Gr. Traubensäure in 50 cM.³ Leitungswasser, mit 0,15% N H₄ N O₃, 0,15% K H₂ P O₄ und 0,06% Mg S O₄, geimpft mit *Aspergillus niger*. Die Temperatur war 33—34° C., während für genügenden Luftzutritt Sorge getragen wurde. Schon nach 4 Tagen war, neben der Bildung einer beträchtlichen Quantität Pilzsubstanz, eine bedeutende Linksdrehung, auf die Anwesenheit freier Linksweinsäure hinweisend,

¹⁾ Folia Microbiologica I (1912) S. 422.

zu beobachten. Die Quantität dieser Säure korrespondierte mit 60% der in der Traubensäure anwesenden Linksweinsäure.

Nach 5 Tagen hatte diese Quantität noch ein wenig zugenommen und betrug 60 bis 70% der in der Traubensäure ursprünglich anwesenden Linkssäure. Nach 6 Tagen hatte sich dieser Betrag praktisch nicht geändert. Später wurde fortwährend eine Verminderung der Linksdrehung beobachtet.

Um eine maximale Ausbeute zu erhalten, soll man also nach 6 Tagen die Flüssigkeit befreien von der entstandenen Pilzdecke. Nach der Titration kann man mittels des Bleisalzes und hierauf folgender Spaltung mit Schwefelwasserstoff, die Linksweinsäure, als solche, in Lösung bekommen. Nach Eindampfung erhält man die Säure in der Form weisser Krystalle. Aus 4 Gramm Traubensäure wurde 0,879 Gramm Linksweinsäure erhalten, Ausbeute 56%.

Durch die Bestimmung des Molekulargewichtes und der spezifischen Rotation überzeugte ich mich von der Reinheit der Säure.

a. Bestimmung des Molekulargewichtes:

0,1 Gr. Salicylsäure 4,66 cM.³ Barytlösung.
(Lackmus war Indikator).

0,1 Gr. Linkssäure 8,62 cM.³ Barytlösung
(Phenolphthalein war Indikator).

$$M. G. = \frac{4,66}{4,31} \cdot 138 = 149,2 \text{ (berechnet : 150).}$$

b. Bestimmung der Rotation des polarisierten Lichtes.

0,2719 Gr. wurden in 50 cM.³ gelöst.

Polarisation 1) (4 d.M. Rohrlänge): — 0,8° VENTZKE.

d. i. für eine 2% Lösung (Rohrlänge 2 d.M.): — 1,5° VENTZKE.

Eine 2% Lösung von Rechtsweinsäure gab unter analogen Umständen + 1,6° VENTZKE.

Obgleich man in einer Flasche (Inhalt 200 cM.³) nicht mehr als 2 Gr. Traubensäure verarbeiten kann, können grössere Quantitäten Linkssäure erhalten werden indem man die Zahl der Versuche vergrössert. Bei dem Gebrauch von grösseren Versuchsflaschen ist im allgemeinen die Grösze der Oberfläche der Flüssigkeit

1) Saccharimeter von SCHMIDT und HAENSCH (weisses Licht.)

weniger günstig, mit Bezug auf den Inhalt, als bei kleinere Flaschen, weil der Luftzutritt ungenügend wird. Durch die Verarbeitung von 40 Gr. Traubensäure, verteilt über 20 Flaschen, erhielten wir 9 Gr. reine Linkswensäure.

Die Quantität der von der Traubensäure assimilierten l-Säure (30—40 %), war gross genug, um festzustellen, in welchem Maasse dieselbe eine erhöhte Pilzernte veranlasst hatte.

Die Resultate dieser Untersuchung, sowie der Verlauf des Assimilationsprozesses findet man in Tabelle IV. Zu einander gehörende Zahlen befinden sich in derselben vertikalen Kolonne und sind in derselben Weise unterstrichen.

TABELLE IV.

Traubensäure.

2 Gr. Traubensäure (COOH/CHOH/2COOH + Aq.; M. G. = 168, pro 50 c.M³
Leitungswasser, 0,15 % NH₄NO₃, 0,15 % KH₂PO₄, 0,06 % MgSO₄.
Temp. : 33—34° C.

Anzahl Tage nach der Impfung:	0	1	2	4	5	6	8	13	45
Polarisation ¹⁾ in Graden VENTZKE berechnet für 50 c.M ³ und 2 d.M. Rohrlänge.	0			<u>— 0,8</u> <u>— 0,9</u>	<u>— 1,0</u> <u>— 1,0</u> <u>— 0,95</u>	<u>— 1,0</u> ²⁾	<u>— 0,9</u> ²⁾	<u>— 0,7</u>	<u>— 0,0</u>
Quantität der Pilzsubstanz (Milligr. Trockensubstanz).				<u>120</u> <u>114</u>	<u>176</u> <u>171</u> <u>173</u>	<u>187</u>	<u>176</u>	<u>185</u>	<u>195</u>
Milligr. CO ₂ bei Verbrennung der Pilzsubstanz.				<u>198</u> <u>183</u>	<u>280</u> <u>277</u>	<u>292</u>	<u>290</u>	—	—
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.						<u>21,5 %</u>	<u>21 %</u>	<u>±20%</u>	<u>±16%</u>
Entwicklung und Sporenbildung.		+	+	+	+	+	+	+	+
				+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
				nur wenige Sporen.	nur wenige Sporen.	viele Sporen.	viele Sporen.	viele Sporen.	viele Sporen.

¹⁾ Saccharimeter von SCHMIDT und HAENSCH (mit weissem Lichte).

²⁾ Keine d.-Säure war mehr in der Lösung vorhanden, nur l-Säure.

Da die spezifische Rotation der Weinsäure für die verschiedenen Wellenlängen nicht dieselbe ist, muszte ich die Skala von VENTZKE für Lösungen der d-Weinsäure von bekannter Konzentration eichen. Zu diesem Zwecke wurde die d-Säure in Leitungswasser mit

0,05 % $\text{NH}_4 \text{Cl}$, 0,15 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ und 0,06 % Mg SO_4 gelöst.
Rohrlänge 2 dM. Grade VENTZKE.

d-Weinsäure	}	4	%	Lösung.....	+	3,25
		2	»	»	+	1,6
		1	»	»	+	0,85
		0,6	»	»	+	0,55
		0,2	»	»	+	0,15

Zum Vergleich habe ich in Tabelle V einige Tatsachen, den Verlauf des Stoffwechsels der d-Weinsäure betreffend, vereinigt.

TABELLE V.

d. Weinsäure.

2 Gr. d. Weinsäure. $\text{COOH/CHOH/}_2\text{COOH}$ (M.G. : 150) pro 50 c.M³
Leitungswasser, 0,15 % $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, 0,15 % $\text{KH}_2 \text{PO}_4$, 0,06 % Mg SO_4 .
Temp : 33—34° C.

Anzahl Tage nach der Impfung:	2	4	5
Polarisation in Graden VENTZKE berechnet für 50 c.M ³ und 2 d.M. Rohrlänge.		+ 0,8	+ 0,1
Trockensubstanz (Milligr.)		271	318
Milligr. CO_2 bei Verbrennung der Pilzsubstanz.		453	505
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.		26 %	22 %
Entwicklung und Sporenbildung.	++ keine Sporen.	+++++ nur wenige Sporen.	+++++ viele Sporen.

An erster Stelle sieht man, dass die verbrauchte Linksweinsäure eine erhöhte Pilzernte veranlasst hat. Sogar nach 5 Tagen war dies schon deutlich (Vgl. Tabelle IV).

Nur in denjenigen Fällen, wo ich mit Bestimmtheit wusste, wieviel Weinsäure verbrennt worden war, konnte ich das plastische Aequivalent des Kohlenstoffs berechnen.

Nach 6 Tagen z.B. ist die Linksdrehung der Nährlösung — 1,0 (Vgl. Tabelle IV.) Nur Linkswensäure ist dann noch anwesend, wovon ich mich durch die Darstellung dieser Säure aus der betreffenden Lösung überzeugete.

Assimilirt war also:

- 1^o. alle ursprünglich anwesende Rechtsweinsäure.
- 2^o. ein Teil der Linkswensäure.

Die Quantität der ursprünglich anwesenden

Rechtsweinsäure war: $\frac{150}{168}$. 1 gr.

Die verbrauchte Quantität der

Linkssäure war: $\left(\frac{1,43-1,0}{1,43}\right) \cdot \frac{150}{168}$. 1 gr.

Summe $\frac{1,86}{1,43} \cdot \frac{150}{168}$. 1 gr. Weinsäure.

Hierin sind $\frac{1,86}{1,43} \cdot \frac{150}{168} \cdot \frac{49}{150}$ Gr. Kohlenstoff = 37² Milligr. Kohlenstoff vorhanden.

In der gebildeten Pilzsubstanz: $\frac{12}{44} \cdot 292 = 80$ Milligr. C.

Das plastische Aequivalent des Kohlenstoffs bei einer 4 % Traubensäurelösung war also nach 6 Tagen = $\frac{8000}{372} = 21,5$ %.

Bei der 4 % Rechtsweinsäure finden wir nach 5 Tagen ein plastisches Aequivalent von 22 %. Hieraus können wir den Schluss ziehen, dass das plastische Aequivalent der Rechtsweinsäure demjenigen der Linkswensäure vollkommen gleich ist.

Die Linkswensäure veranlasst also, *wenn sie nur verarbeitet wird*, in ganz derselben Weise, wie die Rechtssäure, eine Erhöhung der Pilzernte.

Nach 8 Tagen finden wir bei der Traubensäure ein plastisches Aequivalent von 21 %. Nach 13 Tagen ± 20 % (einen Kohlenstoffprocentsatz der Pilzsubstanz von 47 % voraussetzend). Auch können wir dabei mit Bestimmtheit voraussetzen, dass nach 13 Tagen sich nur Linkswensäure in der Lösung vorfindet.

Wir beobachten bei der Traubensäure ebenso, wie dies schon früher bei zahlreichen andren organischen Verbindungen festgestellt wurde, ein Sinken der Grösze des plastischen Aequivalents während des Kultivierens.

Zu gleicher Zeit sieht man, dasz auch die Linkssäure auf die Dauer ganz verschwindet und nicht nur in Kohlensäure verwandelt wird, sondern fortwährend *zum Aufbau neuer Pilzsubstanz dient*. Diesem Umstande ist denn auch die Steigerung der Trockensubstanz *nach* dem 8^{ten} Tage zuzuschreiben.

Vor dieser Zeit war die Gewichtsabnahme (z. B. durch die Verarbeitung des Glykogens), der Gewichtszunahme, zufolge der Assimilation der Linkswensäure, überlegen, so dass man vom 6^{ten} bis auf den 8^{ten} Tag ein Sinken des Pilzgewichtes beobachtete. Gewünscht war es jetzt, den erhaltenen Einblick in die Assimilation der Traubensäure in mehreren Richtungen zu erweitern.

An erster Stelle wurde der Einfluss der *Konzentration* beachtet. Zweitens wurde die Aenderung des *Verhältnisses der Rechts- und Linkswensäure*, welches bei der Traubensäure 1 : 1 ist, studiert. Schliesslich wurde untersucht, in wie weit eine *Aenderung der Form von Aspergillus niger* den beschriebenen Lebensprozess zu ändern vermöge.

a. *Einfluss der Konzentration.*

Untersucht wurden 8, 6, 4 und 2 % Lösungen der Traubensäure. Die Darstellung geschah in der bekannten Weise aus d- Weinsäure. 1) Die Kulturbedingungen waren denjenigen der vorigen Versuchsreihen (Tabelle IV und V) vollkommen ähnlich. Die Resultate findet man in Tabelle VI.

Aus diesem Resultate können wir den Schluss ziehen, dass auch hier unter dem Einflusse eines Konzentrationswechsels, die Grösze des plastischen Aequivalents des Kohlenstoffs bei *Aspergillus niger* nicht geändert wird.

b. *Einfluss des Verhältnisses d. : l.*

Es war zu erwarten, dasz der Prozentgehalt der assimilirten l- Weinsäure bis zu einer gewissen Höhe, eine Funktion von

1) A. F. HOLLEMAN, Rec. trav. chim. 17. 66.

TABELLE VI.
Traubensäure. Einfluss der Konzentration.

Anzahl Tage nach der Impfung.	5		6		7		13	
	Polarisation in Grad. (VENTZKE 1) berechnet für 50 cM ³ und 2 d.M. Rohrlänge.	Milligr. Trockensubstanz.	Polarisation.	Milligr. Trockensubstanz.	Polarisation.	Milligr. Trockensubstanz.	Polarisation.	Milligr. Trockensubstanz.
4 Gr. Traubensäure pro 50 cM ³	—	—	—	—	—	—	— 0,9	401
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.							± 19,5 %	
3 Gr. Traubensäure pro 50 cM ³	— 1,3	267,5	— 1,3	285,5	— 1,35	283		
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.					± 22 %			
2 Gr. Traubensäure pro 50 cM ³ Vgl. Tabelle IV.	— 1,0 — 1,0 — 0,95	176 171 173	— 1,0	187			— 0,7	185
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.			21,5 %				± 20 %	
1 Gr. Traubensäure pro 50 cM ³	— 0,4	96	—	—	— 0,4	108		
Plastisches Aequivalent des Kohlenstoffs.					± 22,5 %		± 18,5 %	

dem ursprünglichen Verhältnisse zwischen der Quantität der d- und der l-Säure sein würde.

Je mehr Rechtsweinsäure in Bezug auf die Quantität der l-Säure, desto grösser der Prozentsatz der nach z.B. 6 oder 7 Tagen assimilirten l-Säure und demgemäss wird die resultierende Linksdrehung kleiner sein.

1 Saccharimeter v. SCHMIDT u. HAENSCH (m. weissem Lichte).

Die Versuche haben diese Auffassung vollkommen bestätigt.
(Tabelle VII)

TABELLE VII.

Gemische von Rechts- und Links-Weinsäure.

Anzahl Tage nach der Impfung.	5		6		7		13	
	Polarisation.	Trocken- substanz (Milligr.)	Polarisation.	Trocken- substanz (Milligr.)	Polarisation.	Trocken- substanz (Milligr.)		
1 Gr. d. Weinsäure 1 Gr. Traubensäure	+ 0,1	216	- 0,3	281	- 0,2	266	--	--
Plastisches Aequivalent.	—		—		± 21,5 %		—	
1 Gr. d. Weinsäure 0,5 Gr. Traubensäure	—	—	0,0	218	- 0,15	201	- 0,05	187
Plastisches Aequivalent.	—		—		± 21,5 %		± 18,5 %	

Wenn andererseits der Prozentgehalt der l-Säure vergrößert wird, bleibt auch ein grösserer Teil der l-Säure unangegriffen und demgemäss wird auch nach ungefähr 6 Tagen eine grössere Linksdrehung beobachtet. (Tabelle VIII.)

c. Die Abhängigkeit der Assimilation und Verarbeitung der Traubensäure von der Form von Aspergillus niger.

Oben sah man schon, dass auf Lösungen von Linksweinsäure *Aspergillus niger* sich praktisch nicht entwickelte, dass aber nach 2 Monaten in einer Versuchsflasche beträchtliche Entwicklung zu beobachten war. Die betreffende Pilzdecke hatte aber eine braune Farbe und dies konnte einer stattgefundenen Mutation zugeschrieben werden. Das plastische Aequivalent des Kohlenstoffs war demgemäss besonders niedrig. Diese Beobachtung liess vermuten, dass die früher von mir beim Kultiviren auf

TABELLE VIII.

1,5 Gr. Traubensäure + 0,5 Gr. I. Weinsäure.

Anzahl Tage nach der Impfung:	3	4	5	8	17	27
Polarisation.	—	—	—1,4	—	—1,3	—1,25
Trockensubstanz Milligr.	—	—	170,5	—	157,5	155
Entwicklung.	++++	+++++	+++++	+++++		
Sporenbildung.	Keine Sporen.	Wenige Sporen.	Ziemlich viele Sporen.	Viele Sporen.		

Galaktose erhaltenen Mutanten sich von der Hauptform verschieden zeigen würden in ihrer Selektion den zwei optischen Antipoden gegenüber.

Das Experiment war mit dieser Auffassung gänzlich in Uebereinstimmung.

Die Resultate der betreffenden Versuche findet man in Tabelle IX.

TABELLE IX.

Abhängigkeit der Selektion von der Form von *Aspergillus niger*.
2 Gr. Traubensäure pro 50 cM³.

Anzahl Tage nach der Impfung.		5	17	27
Polarisation in Graden VENTZKE berechnet für 50 cM ³ . und 2 dM. Rohrlänge.	Stammform I	<u>— 1,0</u>	<u>— 0,95</u>	<u>— 0,9</u>
	Galaktosemutante. II	<u>— 1,0</u>	<u>— 0,85</u>	<u>— 0,1</u>
	„ III	<u>— 0,25</u>	<u>— 0,7</u>	<u>— 0,35</u>
Milligr. Trockensubstanz.	Stammform I	<u>212</u>	<u>178</u>	<u>191</u>
	Galaktosemutante. II	<u>204</u>	<u>167</u>	<u>210</u>
	„ III	<u>49</u>	<u>131</u>	<u>133</u>
Entwicklung und Sporenbildung.	Stammform I	+++++, viele Sporen.		
	Galaktosemutante. II	„ , ziemlich viele Sporen		
	„ III	„ , fast keine Sporen.		

Aus der Tabelle sieht man also, dass bei Form II und III, die im Anfang in Freiheit gesetzte l-Weinsäure, z.B. nach 17 Tagen viel rascher verschwindet als bei Form I. Die Wahrscheinlichkeit ist weiter gross, dass das plastische Aequivalent von Form II nach 27 Tagen kleiner ist als von Form I und von III wiederum kleiner als von II.

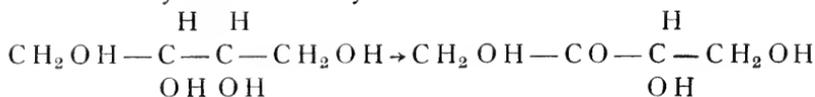
Aus den Versuchen kann man weiter die Folgerung ziehen, dass es bei der Spaltung von racemischen Gemischen und im Allgemeinen bei biochemischen Darstellungsmethoden besonders darauf ankommt, mit welcher Form des betreffenden Organismus man arbeitet. Die Möglichkeit besteht sogar, dass man von einem Organismus *zwei* Formen isolieren kann, deren Selektionsvermögen für zwei optische Antipoden gerade entgegengesetzt sein wird.

Man sieht also hier eins der ersten mehr ausführlich quantitativ bearbeiteten Beispiele einer biochemischen Spaltung eines Racemates in die Komponente.

Es wird erwünscht sein, diese Untersuchung in vielen Richtungen auszudehnen, auch auf die Lebensfunktionen anderer Organismen.

§ 5. Antiweinsäure als Kohlenstoffquelle für *Aspergillus niger*.

BERTRAND 1) konnte mittels der Sorbosebakterie aus dem inaktiven Erythrit die *d*-Erythrose darstellen.



i. Erythrit.

d. Erythrose. 2)

Sehr merkwürdig war gerade das Entstehen der *d*-Erythrose.

BERTRAND sagt davon:

„Ici, on pouvait s'attendre à obtenir un mélange des deux

1) G. BERTRAND, Annales de Chimie et de Physique (8/ Tome III (1904), 206; Comp. rend. 130 (1900), 1330, 1472.

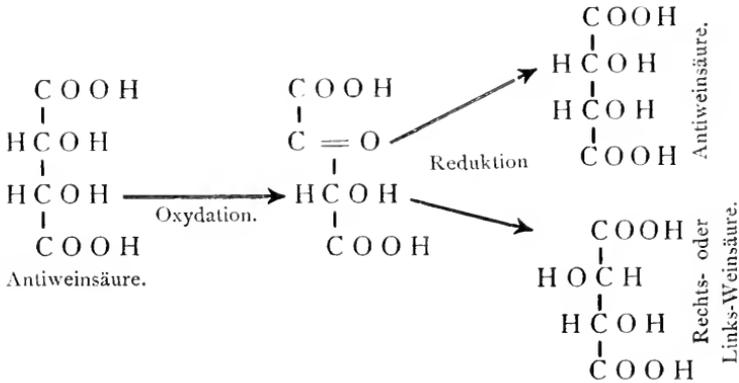
2) Wegen der Beziehung mit dem d-Erythrit, *d*-Erythrose genannt; L. MAQUENNE (Comp. rend. 130 (1900), 1402) erhielt die optische Antipode des d-Erythrits: das l-Erythrit.

„erythroses, droit et gauche, puisque les deux groupements „C. H. O H sont théoriquement semblables; mais par suite d'une „de ces préférences, comme on en observe si fréquemment „chez les microbes, il ne s'est produit que l'un d'eux dans les „bouillons de cultures.“

Prof. BÖESEKEN 1) betrachtet es als wahrscheinlich, dass das i. Erythrit unter dem Einflusse eines optisch aktiven Enzyms kommen wird; in der demzufolge entstandenen asymmetrischen Kombination kann eins der betreffenden Kohlenstoffatome eine bevorzugte Stelle einnehmen.

Im Anschlusse hieran versuchte ich, aus der Antiweinsäure, mittels *Aspergillus niger*, die Linksweinsäure darzustellen.

Um einen dergleichen Vorgang vorzustellen, vgl. man das folgende *übrigens willkürlich* gewählte Schema:



Wie man sieht, würde ein sehr komplizierter chemischer Vorgang stattfinden müssen. Es kann uns deshalb nicht wundern, dass in dieser Richtung keine Resultate erreicht wurden.

Die benutzte Antiweinsäure war ein Präparat der Sammlung der Techn. Hochschule. In 3 % wässriger Lösung, zeigte die Säure keine Drehung des polarisierten Lichtes. Es enthielt also praktisch keine freie d- oder l-Säure. Infolge der Darstellungsmethode war es aber möglich, dass noch geringe Quantitäten Traubensäure als Verunreinigung anwesend seien.

Ich beobachtete, dass die Antiweinsäure (2 und 4 % Lösungen)

1) J. BÖESEKEN, Beknopte Scheikunde der Suikers, Delft 1912, S. 36.

nicht oder sehr wenig von *Aspergillus niger* angegriffen wurde. Nach 17 Tagen war nur geringe Entwicklung zu beobachten und die Lösung zeigte denn auch nur äusserst geringe Linksdrehung (für eine Rohrlänge von 4 d.M.: $-0,1^{\circ}$ VENTZKE).

Diesem Umstand ist denn auch die minimale Linksdrehung zuzuschreiben.

Dass die Antiweinsäure nicht oder nur wenig angegriffen wurde, gibt uns prinzipiell eine Methode, um diese Säure von anderen Verbindungen, welche wohl von *Aspergillus niger* assimiliert werden, zu befreien.

Nach 27 Tagen beobachtete ich aber in den Versuchsflaschen mit Antiweinsäure eine ziemlich starke Entwicklung, welche, wie früher bei der Linksweinsäure, einer stattgefundenen Mutation zu verdanken war.

Dies wurde bestätigt durch das Vorkommen weisser Stellen in den erhaltenen Pilzdecken. Die Linksdrehung der Lösung war alsdann für eine Rohrlänge von 4 d.M.: $0,1^{\circ}$ VENTZKE.

Durch Isolierung auf Malzagar wurde übrigens festgestellt, das tatsächlich Mutation aufgetreten war.

§ 6. Zusammenfassung.

1^o. Es ist notwendig bei den verschiedenartigsten Stoffwechselprozessen die gebildete Quantität des betreffenden Organismus zu betrachten im Zusammenhang mit der Schnelligkeit der chemischen Reaktionen und also mit der Bildung bestimmter Reaktionsprodukte.

2^o. Der Nährwert des Rohrzuckers als Kohlenstoffquelle für *Aspergillus niger* ist demjenigen der Glukose und Lävulose vollkommen gleich; Maltose und Kartoffelmehl geben etwas niedrigere plastische Aequivalente.

3^o. Glykogen gibt nur eine kleine Pilzernte, welcher Umstand einer stattgefundenen Mutation zuzuschreiben ist.

4^o. *Aspergillus niger* stellt beim Kultiviren auf einer Raffinose-lösung die Melibiose in Freiheit. In dieser Weise wird die Melibiose mit einer Ausbeute von 68 % aus der Raffinose erhalten.

5^o. Die l-Weinsäure kann in analoger Weise mit einer Ausbeute von 60% aus der Traubensäure erzeugt werden. Auch hier wird ein beträchtlicher Teil (40%) der Linksweinsäure

assimilirt. Es ist bewiesen, dass das plastische Aequivalent der d-Säure demjenigen der l-Säure praktisch gleich ist.

Linksweinsäure dient, *wenn diese Verbindung verarbeitet wird*, in vollkommen gleicher Weise wie die d-Säure zum Aufbau neuer Pilzsubstanz.

6°. Eine Änderung der Konzentration der Traubensäure übt keinen Einfluss aus auf die Grösze des plastischen Aequivalentes. Auch das Maximum der Linksdrehung ist bei einer bestimmten Form von *Aspergillus niger* innerhalb gewissen Grenzen nur abhängig von der Quantität der benutzten Traubensäure. Je grösser diese Quantität, je grösser also die Pilzernte, desto grösser ist die maximale Linksdrehung.

7°. Eine Änderung des Verhältnisses d:l-zugunsten der d-Säure hat eine bessere Assimilation der l-Weinsäure zufolge und demgemäss wird auch die relative resultirende Linksdrehung sinken.

Andrerseits hat eine Erhöhung des Prozentgehaltes der ursprünglich anwesenden l-Säure eine relativ grössere Linksdrehung zufolge.

8°. Linksweinsäure wird von *Aspergillus niger* nur wenig angegriffen. Nach sehr langer Versuchsdauer (2 Monaten) wurde aber bisweilen beträchtliche Entwicklung beobachtet; Mutation hatte stattgefunden.

Dieses Resultat liess erwarten, dass die Galaktose-mutanten II und III sich der Links- und Rechtsweinsäure gegenüber in anderer Weise verhalten würden als die Stammform dieser Mutanten (I).

Diese Auffassung ist durch das Experiment vollkommen bestätigt worden. Die Mutanten II und III assimiliren die in Freiheit gestellte l-Säure viel rascher als Form I.

Für biochemische Spaltung von racemischen Gemischen, und im Allgemeinen bei allen biochemischen Darstellungsmethoden, ist die Form des Organismus, mit welcher man arbeitet, von der grössten Bedeutung.

9°. Antiweinsäure wird von *Aspergillus niger* kaum angegriffen. Nach langer Versuchsdauer ist dies doch der Fall, aber dann findet, ebenso wie bei der Linksweinsäure, Mutation statt.

*Laboratorien f. org. Chemie und f.
Mikrobiologie der Technischen Hochschule.*

Delft, April 1913.

POURQUOI L'ACTION BACTÉRICIDE DE L'ALCOOL EST PORTÉ À SON PLUS HAUT DEGRÉ D'INTENSITÉ PAR UNE CONCENTRATION DE 70 %.

PAR

S. TIJMSTRA Fzn.

(Travail de l'Institut d'Hygiène de l'Université Technique de Delft).

On connaît depuis longtemps les propriétés très désinfectantes de l'alcool éthylique et on sait aussi que la force bactéricide maximale doit être attribuée à des solutions aqueuses variant de 50 % à 80 % ¹⁾,

Beyer ²⁾ vient de l'exprimer en chiffres très précis, dans des recherches détaillées. Il a trouvé un optimum clairement reconnaissable, exactement à 70 %. Le pouvoir bactéricide de cette concentration vaut bien 30 fois celle de l'alcool à 60 % et 40 fois celle de l'alcool à 80 %. Il a aussi clairement pu fixer qu'à 69 % et 71 %, l'alcool agit moins fortement. Les concentrations au dessous de 60 % et au dessus de 80 % se révélèrent comme sans valeur au point de vue pratique. L'alcool absolu, c'est à dire exclu de toute eau, a une influence conservatrice sur les bactéries, de sorte que les staphylocoques conservent toute leur vitalité après un traitement de 6 jours. M. Beyer a fait des expériences comparées avec des staphylocoques séchés sur des fils; il ne s'est pas occupé des microbes sporogènes, après qu'il était ressorti qu'on peut traiter les spores d'anthrax pendant 25 jours avec de l'alcool à 70 % sans qu'ils soient tout à fait détruits.

Il paraît donc, que la présence de l'eau est une nécessité absolue pour l'action de l'alcool. Cela est d'ailleurs conforme à d'autres faits. Le phénol dans des solutions huileuses ou alcooliques possède une force bactéricide beaucoup moindre que

¹⁾ c.f. Thalhimer and Palmer. Journ. of Inf. Dis. Sept. 1911, p. 172.

²⁾ Zschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. 1911, T. 70, p. 225.

dans des solutions aqueuses. En considérant la question pourquoi la présence de l'eau est nécessaire, on peut se demander deux choses : premièrement, si le désinfectant est transformé dans un état particulièrement actif, secondement si le corps bactériel gagne en résistance par l'absence d'eau. Si nous considérons que la formule $C_2 H_5 O H. H_2 O$ répond précisément, à une mixture d'alcool à 71 % et que nous pensons ensuite à la contraction qui a lieu au mélange, la tentation est alors bien forte d'admettre que $C_2 H_5 O H. H_2 O$ est ou bien une solution qui se diffuse très facilement par la cellule, ou qu'elle est de plus particulièrement toxique. Dans ce cas un surplus d'alcool jouera aussi bien le rôle de délaiage qu'un surplus d'eau.

Quoiqu'il en soit, l'action sur un corps bactériel doit être étudié de plus près, afin de trouver l'explication. Nous pouvons diviser l'action d'un désinfectant en quatre facteurs : 1^o diffusion par la substance lipoïde, 2^o diffusion par la partie albumineuse du protoplasme, 3^o destruction de la membrane lipoïde, 4^o destruction de l'albumine.

Pour ce qui est du premier facteur, les interprétations de Meyer et Overton peuvent répandre quelque lumière. Ces expérimentateurs trouvèrent indépendamment l'un de l'autre que les substances qui se dissolvent facilement dans la graisse, peuvent pénétrer très rapidement dans la cellule, et que par une solubilité plus grande dans la graisse (spécialement dans l'huile d'olive), une plus petite concentration du narcotique était nécessaire pour produire la narcose. Ils en vinrent, à peu près, à la considération suivante. On peut s'imaginer la cellule vivante, comme construite de masses albumineuses, entourées d'une masse lipoïde, de telle manière que toutes les parois sont formées de couches lipoïdes. Ces couches qui paraissent posséder des propriétés grasses, c. à d. une puissance de solubilité parallèle à celle des graisses, ont une très importante signification biologique ; elles régissent les échanges vitaux entre la cellule et son entourage. Toutes les substances de l'entourage, devant passer par la couche lipoïde avant de pénétrer dans la cellule, la concentration des matières nutritives et celle des produits des échanges vitaux, est réglée par la rapidité avec laquelle la couche lipoïde les laisse passer. Les matières nuisibles sont

autant que possible, exclues; les matières utiles et indispensables sont retenues, au besoin dans la cellule.

Une grande solubilité des matières lipoides rendra possible une grande rapidité de diffusion, et, en outre, d'après la „Verteilungssatz" de Nernst, une matière s'amassera dans les lipoides, si la solubilité y est de beaucoup plus grande que dans l'eau.

Les narcotiques sont, en général, des substances se dissolvant beaucoup mieux dans la graisse que dans l'eau; ils ont donc un grand „Teilungskoeffizient" pour graisse — eau et dans ce cas généralement aussi pour eau-lipoïde. Une faible concentration dans le liquide environnant est donc nécessaire pour rendre possible une saturation importante des lipoïdes.

Une marque distinctive de la narcose est sa réversibilité. Dès que la concentration d'un narcotique dans la cellule baisse au dessous d'un certain minimum, elle est immédiatement supprimée. Si le narcotique avait agi sur les éléments de la cellule par fixation chimique, cette réversibilité si facile serait assez inexplicable, les réactions organiques n'ayant lieu, ordinairement, pas si vite. Cette réversibilité indique, au contraire, la nature plutôt physique du procès. Les narcotiques se dissolvent dans les lipoïdes et en changeant l'état physique, de sorte qu'ils ne peuvent plus procéder normalement à leur tâche. L'organisme cellulaire n'est pas changé ou détruit par la narcose, le fonctionnement n'en est seulement qu'arrêté, le mécanisme n'est plus en mouvement. Une partie des fonctions vitales cessent. Ceci indique que des substances indifférentes auxquelles la vie n'est pas immédiatement liée, mais qui servent, pour ainsi dire, d'outils aux principes vitaux, sont attaquées par les narcotiques. Il est vrai que la réversibilité de la narcose n'est pas complète en beaucoup de cas, car on ne peut pas, naturellement, soumettre un animal, un temps illimité, à la narcose au chloroforme sans que la mort n'intervienne; mais si l'application d'une très faible concentration du narcotique, n'occasionnant pas la narcose à la longue, se termine pourtant par la mort, on doit, vraisemblablement, attribuer cela à des causes secondaires. On peut admettre, par exemple, qu'après la destruction du narcotique, il se forme des produits intermédiaires nuisibles qui attaquent peu à peu le protoplasme, ou bien que la situation modifiée de la membrane lipoïde occasionne à la longue, l'extinction du protoplasme.

Waterman ¹⁾ a démontré que beaucoup de combinaisons chimiques, connues comme antiseptiques, p. e. le phénol dans de faibles concentrations peuvent être une excellente source de carbone pour le *penicillium glaucum*. A des concentrations plus fortes elles agissent de façon nuisible et empêchent le développement. Le développement maximal doit se faire quelque part entre les concentrations très faibles où les moisissures manquent de nutrition, et les concentrations plus fortes où elles sont narcotisées; ce maximum se trouve à une concentration où l'apport de la matière nutritive dans la cellule se rapporte aussi favorablement que possible aux échanges vitaux.

Si l'organisme se trouve dans un milieu, où il y a une matière, se diffusant facilement dans une concentration trop haute, de sorte que l'apport est supérieur à ce qui peut être digéré il y a alors une surcharge, à la quelle on peut, en premier lieu, imputer l'action narcotique. Avec de véritables substances nutritives, comme le sucre p. e., on peut entraver la croissance des bactéries et faire ainsi paraître un certain degré de narcose. Donc s'il est clair que la rapidité de diffusion d'un narcotique dans les matières lipoides, régit le degré de la narcose, nous pouvons chercher l'explication de la conduite spéciale des diverses concentrations, dans la conduite de l'alcool en rapport avec l'huile d'olive. Cependant il semble que la solubilité de l'alcool aqueux, dans l'huile d'olive et celle de l'huile d'olive dans l'alcool aqueux, augmente régulièrement avec la concentration de l'alcool. On s'attendrait par là à ce que l'alcool absolu, entre très facilement par la membrane lipoïde, fait dissoudre aussi facilement les matières lipoides et détruit la membrane de sorte qu'il faut se décider à ne pas trouver d'explication de cette manière là ²⁾. Il reste encore à rechercher les deux autres facteurs, à savoir la diffusion dans l'albumine et sa destruction. Frey a traité, dans ce but, de l'albumine de sérum séchée avec de l'alcool à différentes concentrations. A 30 % et 50 % d'alcool l'albumine se gonflait encore, à 70 % presque pas et à 80 % et 96 % elle restait dure et jaune; on trouve l'albumine après le contact avec l'alcool à 30 % et 96 % encore soluble dans l'eau,

¹⁾ Thèse de Delft Janvier 1913.

²⁾ Frey (Deutsche Med. Wochenschr. 1912, no. 35) arrive aussi à cette interprétation.

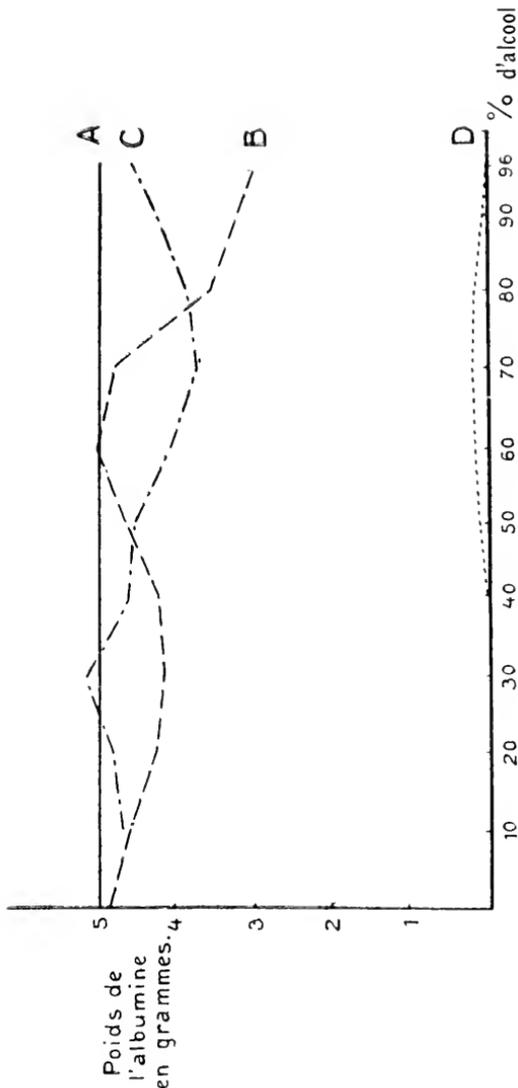
tandis que celle de l'alcool à 50 % jusqu'à 80 % est devenue insoluble. Puis il se montrait que l'alcool à 70 % avait produit les plus fortes modifications. Dans les expériences de Frey on observe le resultat de deux réactions dont voici l'explication. L'albumine est sèche et dure. Il ne peut y avoir d'action que si la matière réagissante peut pénétrer, et comme l'alcool concentré n'est absolument pas en état de se diffuser par l'albumine sèche et dure, l'action doit se restreindre à la couche extérieure. Ce n'est que si l'albumine a d'abord pris de l'eau que l'alcool peut se diffuser à l'intérieur, et par conséquent, la rapidité avec laquelle l'alcool fait dénaturer l'albumine, sera proportionnelle à la concentration de l'eau.

Une autre matière, que Frey a encore employé pour ses expériences, à savoir la gélatine, a comme obstacle la réaction réversible qu'elle occasionne.

Afin d'imiter de façon plus nette les situations dans lesquelles l'alcool agit sur le protoplasme, il m'a paru préférable de faire agir l'alcool sur le gluten. Cette matière se compose surtout des substances albumineuses qui se trouvent en réserve dans le grain. Si la farine est bien moulue, elle contient environ 5% de cette albumine et on peut l'en retirer en faisant une pâte de la farine et en pétrissant l'amidon sous l'eau. Elle apparaît alors comme une masse jaunâtre, solide et pétrissable, avec une quantité déterminée d'eau fixée colloïdalement, tandis qu'on peut en faire sortir le surplus en eau. Sur des surfaces sèches elle colle fortement, mais on peut la détacher en entier sans en enlever des morceaux. Cette matière a une particularité commune au protoplasme, à savoir que dans certaines conditions elle possède une teneur maximum de liquide; elle est attaquée et transformée par l'alcool, le phénol, la formaline, le sublimé etc.; elle devient alors blanche, non pétrissable, perd de son gluant et on peut alors facilement la distinguer de la matière originale.

J'ai fait l'expérience comme suit. On met 100 c.c.m. d'eau distillée dans un vase et 100 c.c.m. d'alcool de différentes concentrations, montant par 10%, dans 10 autres. Dans chaque vase on ajoute ensuite environ 5 Gr. de gluten, qui, après que sa surface a été bien séchée, est pétri en une boulette plate et consistante, qui ensuite est pesée, enfin toutcela est mis à la glacière. Après trois jours on fixe de nouveau le poids des

morceaux de gluten après avoir enlevé, aussi bien que possible, le liquide qui s'est attaché à l'extérieur. Ensuite on remet le tout



encore trois jours dans de l'eau distillée et à la glacière. On trouvera les divers résultats réunis dans le tableau. (En le séchant à l'air un morceau de gluten perd 58,3% d'eau.

Les données du tableau sont rendues plus claires par le graphique. La ligne A représente le poids original du gluten, la ligne B le poids après trois jours de traitement avec diverses concentrations d'alcool, tandis que la ligne C représente le poids du gluten, conservé après le traitement précédent, pendant trois jours dans de l'eau distillée. La ligne D représente la quantité de matière de la boulette de gluten dissoute dans les différentes concentrations d'alcool,

cette matière était ni de l'albumine ni de l'amidon. On voit que les faibles concentrations d'alcool ont diminué le poids de l'albumine, tandis que le traitement ultérieur à l'eau le ramenait à sa

Concentration de l'alcool.	R E M A R Q U E S.						
	A. poids original du gluten. (en Gr.)	B. poids après 3 jours dans l'alcool. (en Gr.)	Rapport de B : A.	Dissous dans l'alcool (en Gr.)	C. poids du gluten après trois jours de plus dans l'eau (en Gr.)	Rapport C : A.	Extérieur du gluten dans la :
							Colonne B. Colonne C.
0%	4,856	4,713	0,971	—	—	—	Commençait à devenir très doux.
10%	4,871	4,495	0,923	—	4,565	0,937	très mou.
20%	4,876	4,152	0,852	—	4,765	0,977	mou.
30%	5,021	4,202	0,837	0,058	5,210	1,038	»
40%	4,961	4,200	0,847	0,054	4,540	0,923	moins mou.
50%	4,731	4,422	0,935	0,132	4,348	0,919	non gluant, de nouveau assez dur.
60%	4,936	4,987	1,010	0,254	4,095	0,830	id. plus dur.
70%	4,934	4,832	0,979	0,266	3,775	0,745	id. dur.
80%	4,826	3,802	0,746	0,234	3,850	0,795	(non pétrissable). plus solide.
90%	4,816	3,222	0,631	0,120	4,156	0,863	assez dur et cependant gluant. assez doux gluant.
96%	4,991	3,092	0,619	0,042	4,585	0,919	très dur, desséché. assez doux, gluant, peu diffé- rent du gluten frais.

situation première. Ce n'est pas seulement le poids qui se rapproche du poids original mais c'est aussi la situation première qui revient à peu près complète. L'albumine conservée non dans l'alcool mais dans l'eau distillée, était devenue très molle après 6 jours et s'était désagrégée, ce qui doit être imputé à l'action des bactéries. La diminution en poids de l'albumine dans les faibles concentrations d'alcool, peut s'expliquer, si l'on admet que l'alcool peut être diffusé par toute la masse et exerce une action astringente sur l'albumine. Un changement d'état permanent n'est occasionné que par 40% d'alcool. Nous voyons d'ici que la faculté d'absorber l'eau diminue par les fortes concentrations (voir graph. ligne C) et que l'albumine est de plus en plus dénaturée. Il est assez curieux que dans l'alcool de 40 à 70% la diminution en poids descende constamment, (ligne B). On doit en conclure que 60% et 70% d'alcool font si rapidement dénaturer l'albumine qu'elle n'a pas le temps de se contracter et qu'elle contient une fois dénaturée, autant d'alcool, qu'elle contenait auparavant d'eau; 40% et 50% d'alcool semblent faire dénaturer l'albumine beaucoup plus lentement, de sorte qu'elle a encore quelque peu le temps de se retrécir. Nous constatons une très forte et constante diminution en poids dans les concentrations alcooliques au dessus de 70%, (ligne B) tandis que la faculté d'absorber de nouveau l'eau a moins diminuée et que les qualités extérieures du gluten reviennent, après l'absorption de l'eau. Il paraît donc bien, que le degré de dénaturation diminue avec l'accroissement de la concentration de l'alcool (au dessus de 70 %), tandis que la diminution du poids devient toujours plus forte. Une telle soustraction d'eau doit être causée par une action osmotique. L'alcool dans les concentrations de 80% et dans celles qui lui sont supérieures, fait dénaturer une couche mince à la surface du gluten, ou' il ne peut alors pénétrer que très lentement, tandis que l'alcool à 70% le fait très facilement. Cela a pour conséquence la soustraction osmotique de l'eau. Plus l'alcool est concentré, plus l'osmose est forte et plus vite aussi la boulette de gluten sera tout à fait desséchée et devenue ainsi résistante à l'action de l'alcool. Du commencement il y a la possibilité que de petites quantités d'alcool, se diffusent tout à fait à l'intérieur. Cela est en rapport avec le cours de la ligne C. Or, parceque

ces petites quantités se diffusent tout à fait à l'intérieur, la concentration alcoolique à l'intérieur montera lentement et amènera une diminution de la faculté d'imbibition pour l'eau. Plus l'eau sort rapidement, moins d'alcool pourra pénétrer à l'intérieur avant que la boulette ne soit tout à fait desséchée, et d'autant moins la faculté d'imbibition pour l'eau aura-t-elle changé. D'après les considérations ci-dessus on peut décider que l'alcool à une concentration d'environ 40 % commence à agir comme dénaturant sur l'albumine. Cette action augmente à mesure que la concentration monte. L'albumine ordinaire et celle qui est dénaturée laissent facilement diffuser l'alcool en concentrations faibles. Pour des concentrations au dessus de 80 %, l'albumine dénaturée n'est pratiquement pas perméable. En considérant les expériences de Beyer qui trouva à 70 % d'alcool un maximum d'action bactéricide on doit préférer 70 % d'alcool pour la désinfection de matières contenant de l'albumine, et on doit considérer les concentrations au dessus de 75 % comme défavorables. Une recherche de H. KODAMA 1) se rapporte aussi à cela. Il a trouvé que 96 % d'alcool détruisait le plus rapidement l'antigène dans la viande de cheval fraîche et contenant donc de l'eau, mais que pour la viande de cheval séchée c'était l'alcool de 60 à 70 % qui agissait le plus rapidement. D'après ce résultat il m'a semblé intéressant de rechercher encore la conduite d'une autre substance par rapport au gluten. Je choisis pour ce but le phénol. On pétrit d'abord soigneusement et à sec quelques boulettes de gluten, conservées dans des vases avec 50 c.c. m. de phénol à différentes concentrations, à une température de 37°. On trouve les changements après 24 heures de contact notés dans le tableau suivant :

Conc. du phénol.	aspect extérieur du gluten.
5 %	dimensions non modifiées; tout à fait dénaturé, aspect homogène, blanc solide, pas gluant.
10 %	fortement gonflé, surface blanche et gluante, intérieur peu changé.
70 %	gonflé, la couche de la surface devenue gluante et d'un blanc opaque jusqu'à une profondeur de 1 mM.; intérieur non modifié et normalement gluant.
80 %	gonflé, couche de la surface brune claire transparente, gluante et gélatineuse. Intérieur normalement gluant.
90 %	comme à 80 %, mais la couche gélatineuse transparente est plus épaisse et les dimensions ont moins augmenté.
95 %	

1) H. KODAMA. Zschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh. B. 74.

L'albumine blanche dénaturée de la solution à 5 % et la masse gélatineuse de la solution à 90 % se composent de la même substance. Mis dans l'eau, elles deviennent toutes deux solides et blanches, transportées ensuite dans du phénol à 90 % elles forment toutes deux la masse gélatineuse. L'albumine dénaturée se gonfle, par conséquent, en un gel par le phénol fondu. Il paraît donc de cette expérience, que 5 % de phénol se diffuse facilement à travers toute la masse de l'albumine, tandis que les fortes concentrations ne possèdent pas cette faculté. La différence entre ceci et la conduite de l'alcool réside en ce que l'albumine dénaturée est perméable pour le phénol à une haute concentration, qu'elle gonfle avec lui et que par conséquent il ne peut être question d'une couche protectrice. Il est encore nécessaire de remarquer que le phénol à 10% et à 70% se laisse séparer en deux couches, la couche supérieure contenant environ 8% de phénol et la couche plus chargée entre 75% et 80%; ceci dépend de la température. C'est pour cela que le gluten subit des transformations identiques dans ces deux concentrations. Par analogie à la conduite de l'alcool on doit donc conclure pour le phénol aussi que pour désinfecter des masses albumineuses il faut préférer une concentration de 5% aux concentrations supérieures, celle là pouvant pénétrer le plus rapidement par toute la masse. Dans les méthodes actuelles pour rechercher l'action microbicide des désinfectants et qui reposent presque toutes sur le même principe (comme p. e. le Rideal Walker Test.), on mesure l'action mortelle sur des bactéries non protégées. Pour les désinfectants du type créoline, formant émulsion, elles donnent toutes, plus ou moins, un bien meilleur résultat que pour le phénol. Comme cependant, les substances toxiques des désinfectants, formant émulsion, à savoir les crésols supérieurs, se dissolvent très mal dans l'eau on peut s'attendre à ce que les masses albumineuses et gélatineuses, aient une certaine influence protectrice sur les bactéries, ce à quoi il faut certainement tenir compte dans la pratique. On devra donc aussi, comme facteur très important pour fixer la valeur, comparer l'infiltration des toxiques. KENDALL et EDWARDS ¹⁾

¹⁾ Journ. of Inf. Dis. Vol. 8, 1911.

ont déjà fait un essai dans cette direction en faisant diffuser le désinfectant par de la gélose. Comme matériel d'étude, il me semble, que dans ce sens, le gluten vaut mieux et qu'il est plus en rapport avec les circonstances dans la pratique. Il est certain qu'on obtiendra, en suivant cet ordre de choses une meilleure impression de la force relative des différents désinfectants.

DIE STICKSTOFFNAHRUNG DER PRESSHEFE.

VON

Dr. H. I. WATERMAN.

Zum Studium des Stoffwechsels der Hefe, womit ich jetzt angefangen habe, war eine genaue Kenntnis der meist einfachen Kultivierungsbedingungen notwendig.

Festgestellt wurde, dass zahlreiche Verbindungen *wohl*, viele andre *nicht* als Stickstoffquelle für Presshefe geeignet sind. Zahlreiche anorganische Verbindungen, wie Ammoniumnitrat und Ammoniumchlorid sind ausgezeichnete Nährstoffe, und dies war für eine leichte Ausführung der Stoffwechselversuche von grosser Bedeutung.

Im Laufe der Untersuchung wurden Regelmässigkeiten beobachtet, welche in organisch-chemischer Hinsicht interessant sind.

So giebt der Amidostickstoff im allgemeinen Entwicklung, unabhängig von der Anwesenheit einer oder mehrerer Säureamidgruppen, welche letzteren für sich keine Entwicklung veranlassen, so dass in dieser Hinsicht die Wirkung der Carboxamidgruppe lokaler Natur ist.

Wenn sich nur ein Stickstoffatom im Molekül vorfindet, und dieses Atom zu gleicher Zeit zu einer Amido- und zu einer Carboxamidgruppe gehört, so kann bisweilen Entwicklung stattfinden.

Die Zusammensetzung der Nährlösung war bei allen diesen Versuchen immer: Leitungswasser, 2 % Glukose (wasserfrei); 0.2 % KH_2PO_4 (wasserfrei), 0,1 % MgSO_4 (wasserfrei), während meistens 0,1 % der betreffenden N-Quelle zugefügt wurde. Nach dem Sterilisieren während 10 Minuten auf 120° , wurde mit einer geringen Quantität einer Presshefereinkultur geimpft und bei 30° kultiviert. Immer wurden ERLENMEYER-

flaschen von Jenaglas und 200 cM.³ Inhalt benutzt mit 50 cM.³ der Nährlösung. Bisweilen wurde auch mit „EINHORNS“ gearbeitet, um die Kohlensäureproduktion bei der eventuell stattfindenden Gärung beobachten zu können.

Die Quantität der gebildeten Hefesubstanz wurde auf bestimmten Zeiten beobachtet, die assimilierte Quantität Glukose aus der Polarisationszahl berechnet. Manchmal wurde auch die Reduktion mit FEHLING bestimmt.

Um die Schnelligkeit des Lebensprozesses einigermassen beurteilen zu können, habe ich in Tabelle I einige der Versuche vereinigt.

Man sieht sofort, dass die im Leitungswasser vorhandenen N-Verbindungen keine Entwicklung veranlassen können (Nr. 1.).

Weiter geht aus diesen Versuchen hervor, dass sogar Stickstoffverbindungen der meist verschiedenen Art als Nahrung geeignet sind. Zumal sind es die alifatischen Amine, weiter auch aromatische Amine und von den letzteren besonders diejenige mit der NH₂-Gruppe in der Seitenkette und schliesslich Verbindungen wie NH₄Cl und NH₄NO₃.

Von den untersuchten Nitraten und Nitriten war keine als N-Quelle geeignet (KNO₃, NaNO₂, Nitromethan und C(CH₂-OH)₃NO₂).

Die in den Versuchen mit Harnstoff stattfindende Assimilation wird erklärt durch die aus dieser Verbindung unter dem Einfluss des Wassers entstandenen Quantitäten Ammoniak. Die zahlreichen untersuchten reinen Säureamide gaben keine Entwicklung, mit Ausnahme des Formamids und auch des Oxamids und Palmitinamids. Bei den zwei letzteren Verbindungen war die Quantität der assimilierten Glukose aber gering. Das benutzte Formamid enthielt ziemlich grosse Quantitäten Ammoniak. Eine Analyse dieser Verbindung gab:

				die Formel CH ₃ NO fordert:
% C:	25,5	25,0	25,0	26,7 %
% H:	6,9	6,9	6,6	6,7 »
% N:	33,16	33,00		31,1 »
Sp. G.:	1,1286			
	16°,5			

$$n_D = 1,4446 \quad (t = 19^\circ)$$

TABELLE I.

Nr.	NAME DER STICKSTOFFVERBINDUNG.	ENTWICKLUNG DER HEFE.	ASSIMILIERTE GLUKOSE.		BEMERKUNGEN.
			POLARISATION. (SACCHARIMETER.)	REDUKTION »F E H L I N G«	
1	Kontrolbestimmung.....	Nach 7 Tagen: keine Entw. » 15 » » »	Nach 11 Tagen: 0 % » 15 » » »	0 %	Farblose, klare Lösung.
2	Amidoessigsäure.....	Nach 4 Tagen: ziemlich stark	Nach 7 Tagen: ca. 50 %	ca. 50 %	Fast klare Lösung. Schon nach 4 Tagen sind bedeutende Quantitäten Kohlensäure gebildet. Klare, farblose Lösung.
3	Alanin	» 3 » Anfang » 30 » ziemlich stark	» 30 » 100 %	—	» » » »
4	Phenylalanin.....	» 3 » » » 30 » stark	» 30 » 100 %	—	» » » »
5	Leucin (opt. inakt. Schmpt. 270°, aus Kasein)	» 9 » » » 15 » »	» 9 » 100 % » 15 » 100 %	—	Farblose Lösung mit Niederschlag.
6	Tyrosin (aus Kasein, Schmpt. 295°).....	» 7 » »	» 7 » 27—28 %	27.5 %	Fast klare Lösung.
7	Formamid (0,3 %) (0,2 %) (0,1 %)	Nach 7 Tagen: Anfang	—	Nach 7 Tagen: 60 %	Klare Lösung.
8	Acetamid	» 7 » keine Entw. » 9 » » » 7 » »	Nach 7 Tagen: » 9 » 0 % » 7 » 0 % » 7 » 0 %	— 0—10 % 0 %	Fast klare Lösung. Keine Kohlensäurebildung. Klare Lösung.
9	Methylacetamid	» 7 » »	» 7 » 33 %	33 %	Niederschlag. Ziemlich viel Kohlensäure ist gebildet.
10	Harnstoff	» 7 » ? » 7 » ?	» 7 » 0 % » 7 » ± 25 %	0 %	Farblose, fast klare Lösung. Nicht alles ist gelöst; farblose Lösung.
11	Isovalerianamid	» 7 » »	» 7 » 0 %	0 %	Nicht alles ist gelöst; farblose Lösung.
12	Palmitinamid	» 7 » keine Entw.	» 7 » 0 % » 11 » 0 %	50 % 0 %	Nicht alles ist gelöst; farblose Lösung.
13	Stearinamid	» 7 » »	» 7 » 0 % » 11 » 0 %	0 %	Nicht alles ist gelöst; farblose Lösung.
14	Asparaginsäure	Nach 4 Tagen: starke Entw. » 7 » » » 3 » »	Nach 7 Tagen: » 7 » 53 % » 3 » 80 %	60 %	Farblose, klare Lösung.
15	Glutaminsäure	» 7 » »	» 7 » »	—	» » » »

Nr.	NAME DER STICKSTOFFVERBINDUNG.	ENTWICKLUNG DER HEFE.	ASSIMILIIRTE GLUKOSE.		BEMERKUNGEN.
			POLARISATION. (SACCHARIMETER).	REDUCTION «F E H L I N G».	
16	Oxamid.....	Nach 7 Tagen: keine Entw.	Nach 7 Tagen: \pm 33%	25%	Farblose nicht klare Lösung. » » » » » » » » » »
17	Diaethyloxamid.....	» 7 » » » » »	» 7 » » \pm 12%	15%	
18	Dimethyloxamid.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	
19	Malonamid.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	
20	Succinamid.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	
21	Succinimid.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	
22	Succinaminsäure.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	
23	Asparagin.....	Nach 7 Tagen: ziemlich stark » 7 » » » » »	Nach 7 Tagen: 64% » 7 » » 100% » 11 » » 100%	62%	Farblose, klare Lösung. Nach 7 Tagen ziemlich viel Kohlensäure.
24	Ammoniumnitrat.....	Nach 9 Tagen: Hefebildung. » 15 » » » » »	Nach 7 Tagen: 33% » 9 » » \pm 50% » 15 » » 55% » 9 » » 50—60% » 15 » » 72%	33% \pm 50%	Klare Lösung. Nach 7 Tagen ziemlich viel Kohlensäure.
25	Ammoniumchlorid.....	» 9 » » » » » » 15 » » » » »	» 9 » » 50—60% » 15 » » 72%	50—60%	Klare Lösung.
26	Kaliumnitrat.....	Nach 7 Tagen: keine Entw. » 9 » » » » » » 15 » » » » »	Nach 7 Tagen: 0% » 9 » » 0% » 15 » » 0%	0% 0% 0%	Klare Lösung. Kein Kohlensäure nach 7 Tagen.
27	Natriumnitrit.....	» 7 » » » » »	» 7 » » 0%	0%	Fast klare, farblose Lösung.
28	Nitromethan 1).....	» 3 » » » » » » 30 » » » » » » 3 » » » » »	» 30 » » 0%	0%	Fast klare, farblose Lösung.
29	C ₂ /CH ₃ OH/g. NO ₂	» 3 » » » » » » 30 » » » » »	» 30 » » 0%	0%	Gelbe, klare Lösung.
30	Benzamid.....	Nach 3 Tagen: keine Entw. » 30 » » » » »	Nach 30 Tagen: 0%	0%	Fast klare, farblose Lösung.
31	Hippursäure.....	» 30 » » » » » » 3 » » Anfang. » 3 » » Ziemlich stark. » 3 » » keine Entw.	» 30 » » 100%	100%	Klare, farblose Lösung.
32	Zimmtamid.....	» 3 » » » » »	» 30 » » 0%	0%	Fast klare, farblose Lösung.

34	Benzylamin.....	» 30 » » 30 » » 30 » » 30 » » 30 »	» ? Anfang ? keine Entw.	» 30 » » 30 » » 30 » » 30 » » 30 »	50 % 50 % 50 % 50 % 50 %	Braungefärbte, nicht klare Lösung. Fast klare, farblose Lösung.
35	Anilin ¹⁾	» 30 » » 30 » » 30 » » 30 » » 30 »	» ? Anfang ? keine Entw.	» 30 » » 30 » » 30 » » 30 » » 30 »	50 % 50 % 50 % 50 % 50 %	Braungefärbte, nicht klare Lösung. Fast klare, farblose Lösung.
36	Harnsäure.....	Nach 9 Tagen: kaum sichtbar	kaum sichtbar	Nach 9 Tagen: fast 100 %	fast 100 %	Farblose Lösung mit Niederschlag.
37	Pseudoharnsäure.....	» 7 »	?	» 7 »	0 %	Nicht alles ist gelöst.
38	Uramil.....	» 7 »	?	» 7 »	0 %	Klare Lösung, rosa Färbung
39	Violaursäure.....	» 7 »	gering	» 7 »	± 15 %	Klare, violettgefärbte Lösung.
40	Barbitursäure.....	» 7 »	»	» 7 »	25 %	Klare, gelbe Lösung.
41	Methylanilin ¹⁾	Nach 3 Tagen:	?	Nach 30 Tagen:	0 %	Farblose, fast klare Lösung.
42	Pyridin ¹⁾	» 30 »	?	» 30 »	0 %	» » » » »
43	Piperidin ¹⁾	» 30 »	?	» 30 »	0 %	» » » » »
44	m. Amidobenzoessäure...	» 30 »	?	» 30 »	0 %	» » » » »
45	m. Toluidin.....	» 30 »	keine Entw.	» 30 »	0—20 %	Gelbe, klare Lösung.
46	p. Toluidin.....	» 30 »	»	» 30 »	0 %	Gelbe, fast klare Lösung.
47	Methylamin ¹⁾	Kaum sichtbar		Nach 30 Tagen:	0—10 %	Farblose Lösung, Niederschlag.
48	Aethylamin ¹⁾	Nach 30 Tagen:	Wahrscheinlich Entw.	» 30 »	50 %	» » » » »
49	Pepton.....	Nach 7 Tagen: Stark.		Nach 7 Tagen:	100 %	Fast klare Lösung. Nach 2 Tagen viel Kohlensäure.

Der höhere N-Gehalt wurde von der Verunreinigung mit Ammoniak verursacht; dadurch war also die Entwicklung der Hefe in den Versuchen mit Formamid erklärt.

Wegen der grossen Anzahl der untersuchten Verbindungen konnte die Reinheit derselben nicht immer kontrolliert werden. So ist vielleicht die beim Oxamid und Palmitinamid beobachtete Abweichung einer Unreinheit zuzuschreiben. Die benutzten Asparagin, Pepton („Witte“) und Succinamid wurden analysiert:

<i>Asparagin</i> (+ 1 Aq.).		<i>Pepton</i> („Witte“).	<i>Succinamid</i> .	
<i>Gefunden.</i>	<i>Berechnet.</i>		<i>Gefunden.</i>	<i>Berechnet.</i>
% C 32,4; 32,5	32,0	48,3; 48,4	41,4; 41,3	41,4
% H 6,8; 6,8	6,7	7,2; 7,3	6,9; 6,8	6,9
Asche %		1,63; 1,61		

Trotz der schwierigen Beobachtung der Entwicklung der Hefe, welche noch hervorgeht aus den vielen Fragezeichen in der betreffenden Spalte, sieht man doch, dass diese Entwicklung und der Glukoseverbrauch im allgemeinen parallel gehen.

TABELLE II.

Als Stickstoffquelle sind

Geeignet.	<i>Nicht</i> geeignet.
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2 \text{N} \cdot \text{C} \cdot \text{CO}_2 \text{H} \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CO} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ <i>Asparagin</i>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CO}_2 \text{H} \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CONH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ <i>Succinaminsäure</i>
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2 \text{N} \cdot \text{C} \cdot \text{CO}_2 \text{H} \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CO}_2 \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <i>Asparaginsäure</i>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CONH}_2 \\ \\ \text{H} \cdot \text{C} \cdot \text{CONH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ <i>Succinamid</i>
HIPPURSAURE	BENZAMID
$\text{C}_6 \text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{H}$	$\text{C}_6 \text{H}_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$
α . AMIDOZIMMTAMID	ZIMMTAMID
$\text{C}_6 \text{H}_5 \text{CH} = \text{CNH}_2 \cdot \text{CONH}_2$ 1).	$\text{C}_6 \text{H}_5 \text{CH} = \text{CH} \cdot \text{CONH}_2$

1) BAUCKE, Recueil 15,131 (1896).

Um den schon genannten Unterschied zwischen den Aminen und den Amidon der Säuren deutlicher anzugeben, findet man in Tabelle II einige verwandte Verbindungen neben einander. So sieht man, das die Amine: Asparagin und Asparaginsäure gute N.-Nährstoffe sind, während Succinaminsäure und Succinamid, welche keine Amidogruppe enthalten, sondern resp. 1 und 2 Säureamidgruppen, keine Entwicklung veranlassen. Dergleichen Unterschiede bestehen zwischen Benzamid und Hippursäure; in der Hippursäure hat der Säureamidstickstoff des Benzamids zu gleicher Zeit Amideigenschaften. Das α . Amidozimmtamid kann wegen der Anwesenheit der Amidogruppe als Stickstoffquelle benutzt werden. Mit dem Zimttamid ist dies nicht der Fall, denn diese Verbindung enthält nur eine Säureamidgruppe, während keine Amidogruppe vorhanden ist.

Man hat also im obengenannten wieder ein merkwürdiges Beispiel des Selektionsvermögens eines Organismus für bestimmte chemische Gruppen.

Die Möglichkeit bleibt bestehen, dasz es bei noch grösserer Wahl von Stickstoffverbindungen gelingen wird, Ausnahmen des genannten Satzes zu finden, weil die Eigenschaften von bestimmten Gruppen im Molekül von der Natur des Molekülrestes beeinflusst werden.

Schliesslich bringe ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. J. BÖESEKEN für seine wertvollen Ratschläge meinen besten Dank.

Delft, Juli 1913.

Institut für organ. Chemie
der Techn. Hochschule.

BUCHBESPRECHUNG.

Jan Smit. Bacteriologische en chemische onderzoekingen over de Melkzuurgisting. (Academisch proefschrift, Amsterdam, Oct. 1913). Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die Milchsäuregärung. (Dissertation).

Verf. fängt den 10. Kap. (Bakteriologischer Teil) seiner Arbeit mit einer Begriffsstellung der Gattung »Lactobacillus« an und fährt weiter fort mit einer genauen Beschreibung der von ihm hauptsächlich untersuchten Art »Lactobacillus fermentum (BEIJERINCK)«, eine typische stäbchenförmige Milchsäurebakterie, welche durch kräftige Kohlensäurebildung in Malzextrakt und Maische von den andern Vertretern dieser Gruppe sich unterscheidet. Diese Art konnte aus »Köningsgist« und dem Sauergut der »Ned. Gist en Spiritusfabriek« zu Delft durch Anhäufung in Würze (10—12° B) in geschlossenen Stöpselflaschen bei 37—38° C immer gezüchtet werden. Wurde aber dieser Versuch bei 45° C ausgeführt, so blieb die Gärung aus und häufte »Lactobacillus Delbrücki« sich an, der aber nur in Maische mit Erfolg weiter zu züchten war. Beide Arten liessen sich auf Maischenagar reinzüchten; *L. fermentum* wächst darauf in runden scharfbegrenzten weissen Kolonien, während *L. Delbrücki* darauf flache matt-grünliche Kolonien mit buchtigem Umriss bildet.

Aus einer Reihe von Versuchen zeigte es sich, dass *L. fermentum* als Stickstoffnahrung die pflanzlichen Eiweisskörper über den tierischen bevorzugt, besonders diejenige, welche in Würze, Maische und auch im Hefeextrakt vorhanden sind. Die Intensität der Säuerung war hierbei ein Mass für die Tauglichkeit der Stickstoffquelle. Bei Luftabschluss wurde immer mehr Säure gebildet, wie bei reichlichem Sauerstoffzutritt. In Hefeextrakt wurden von den Zuckerarten; Glucose, Levulose, Galactose, Maltose, Saccharose, Lactose, Melibiose und Raffinose gut; Mannose, lösliche Stärke, Erythrit schwach vergoren; nicht aber Arabinose, Xylose, Trehalose, Rhamnose, Sorbose, α Methyl-Glucosid, Quercit, Sorbit, Mannit, Dextrin, Pepton (Witte), Inulin, Aepfelsäure, Ca-malat, Ca-lactat. Inversion fand statt von Saccharose und Raffinose, nicht aber von Lactose. *L. ferm.* entwickelt sich in

angesäuerten sowie auch in alkalischen Kulturmedien schlecht, sehr geringe Säuremengen wirken aber günstig. Die Optimaltemperatur ist 33° C, die Maximaltemperatur 50° C; erhitzen 2 min. auf 65° tötet *L. fermentum*.

L. ferm. spaltet Glucoside nicht oder äusserst schwach (Indikan); eiweissspaltende Enzyme konnten nicht nachgewiesen werden.

Den Erfahrungen des Verf. nach scheint *L. ferm.* eine in den Hefefabriken allgemein verbreitete Art zu sein, welches mit seinem Vorkommen auf Getreidearten in direktem Zusammenhang steht. So wurde diese Art auch aus Brennerihefe der Fabrik »Hollandia« zu Schiedam und aus der »Konservierten Getreide-Brennerihefe der Firma HEINR. HELBIG A—G zu Wandsbeck Hamburg leicht isoliert. Verf. konnte aus durchgesäuertem Roggenschrot-Maische nach obengenanntem Verfahren *L. ferm.* sowie auch *L. Delbrücki* züchten; aus Gartenerde wurde eine gährende Milchsäurebakterie isoliert, welche aber mit *L. ferm.* nicht identisch war. Eine schleimbildende Varietät wurde zufällig in einer zur Anhäufung v. B. *Delbrücki* angestellten Kultur aufgefunden. Die Schleimbildung war aber nicht konstant.

Es konnten die isolierten Stämme des *L. ferm.* mit keinem einzigen der in der Literatur beschriebenen Lactobacillen vollständig identifiziert werden, sie zeigten aber mit der von BEIJERINCK beschriebenen Art (Arch. Néerl. II Serie, 6, 212, (1901) grosse Übereinstimmung. Verf. fasst seine Stämme somit in einer Gruppe »*Lactobacillus fermentum* BEIJERINCK« zusammen, welche sich kennzeichnet durch Kohlensäurebildung, schnelle Säuerung zuckerhaltiger Flüssigkeiten, wobei weiter flüchtige Säuren und Milchsäure entstehen, während aus Levulose und Saccharose Mannit gebildet wird.

Die nachfolgenden Kap. 2, 3 und 4 sind ausschliesslich den chemischen Untersuchungsmethoden und ihrer Anwendung auf die von *L. ferm.* erzeugten Zersetzungsprodukte gewidmet.

Die qualitative Untersuchung (Kap. 2) ergab als Resultat, dass aus Glucose, Levulose, Galactose, Maltose, Saccharose, Lactose, Raffinose, als flüchtige Produkte: Ammoniak, Alkohol, Essigsäure und Spuren Ameisensäure gebildet wurden (aus Levulose aber kein Alkohol); als nichtflüchtige Produkte: Milchsäure und Bernsteinsäure, während nur aus Levulose und Saccharose Mannit gebildet wurde.

Kap. 3 handelt über die quantitativen Methoden zur Bestimmung der erzeugten Verbindungen, während in Kap. 4 die Resultate, welche durch Anwendung der am meisten geeigneten Methoden erhalten wurden, niedergelegt sind.

Als Produkte der Vergärung von Glucose, Levulose und Saccharose wurden Kohlensäure, Alkohol, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Bernsteinsäure, Mannit, Glycerin und Bakterienmaterial quantitativ bestimmt.

Der Alkohol wurde nach Destillation pyknometrisch bestimmt, die Kohlensäure gravimetrisch, die Zuckerbestimmung nach SCHOORL. (Nederl. Tijdschr. Ph. Ch. Tox, 1899; Codex alimentarius, dl. 4; Chem. Weekbl. 9, 687, 1912), Bernsteinsäure nach der Methode GUERBET (Thèse, Paris 1906). Die Essigsäure wurde auf indirektem Wege bestimmt. Dazu wurde zuerst die Gesamtsäure durch Titration bestimmt, von dieser Zahl wurde die für Bernsteinsäure gefundene subtrahiert. Im Destillat von 50 cc. der Kultur wurde die Ameisensäure bestimmt nach der Methode FINCKE (Z. Unters. Nahr. und Genussmittel 21, 1, 1911), die Gesamtmenge der Milchsäure und Ameisensäure nach der Methode ULZER und SEIDEL (Monatshefte für Chemie 18 p. 138; Anal. Ch. 38, 58, 1899); die Menge der gebildeten Milchsäure kann also auch berechnet werden. Durch Substraktion findet man die Quantität der Essigsäure. Die Mannitbestimmung wurde ausgeführt nach dem Prinzip der Methode zur Glycerinbestimmung von WAGENAAR (Pharm. Weekbl. 1911, 497), welche auch schon von MUTTER (B.B. 14, 1011 1811) angewendet wurde und welche auf das Vermögen mehrwertiger Alkohole, Kupfer in alkalischen Medien in Lösung zu halten, beruht. Mit grosser Sorgfalt hat Verf. diese Methode für die Mannitbestimmung in den Kulturen von *L. ferm.* nachgeprüft und anwendbar gemacht, welches hauptsächlich darin besteht, dass störende Verb. wie Ammoniak Aminosäuren, Zuckerarten, Glycerin und Oxysäuren durch vorherige Destruktion mit Calciumhydroxyd beseitigt werden. Dann wird der Mannit mittels Alkohol extrahiert, die erhaltene Lösung nach Vertreiben des Alkohols eventuell mit bas. Pb.-acetat gereinigt und darauf der Mannit nach der Methode WAGENAAR bestimmt. Die Einzelheiten der angewendeten Methoden können hier nicht weiter besprochen werden.

Mit Hülfe der geprüften Bestimmungsweisen führt Verf. einige Analysen der in Hefewasser mit Glucose resp. Levulose und Saccharose durch *L. ferm.* gebildeten Stoffwechselprodukte aus. In folgender Tabelle bringt er seine Resultate zusammen.

PRODUKTE.	Glucose.	Levulose.	Saccharose.
Kohlensäure.....	14.1%	—(10)%	17.4%
Alkohol.....	16.9%	1.6 %	16.8%
Milchsäure.....	47.1%	12.3 %	33.7%
Essigsäure.....	3.7%	12.9 %	6.1%
Ameisensäure....	0.1%	0.2 %	0.1%
Bernsteinsäure...	1.2%	1.4 %	0.9%
Mannit.....	—	60.1 %	22.8%
Glycerin.....	6.3%	—	—
Bakterien.....	3.5%	—(1.5)%	1.7%
Im Ganzen.....	92.9%	88.5(100)%	100.5%

Am Schluss seiner Arbeit bespricht Verf. seine Untersuchungen über die Mannitbildung durch einige anderen Milchsäurebakterien, wobei es sich ergab, dass nur diejenigen Milchsäurebakterien aus Levulose und Saccharose Mannit bilden, welche Kohlensäuregärung zeigen. Von den untersuchten Arten bildeten nur *L. ferm.*, *Saccharobacillus pastorianus* (v. LAER) und die Dextranmikrokokken neben Kohlensäure Mannit, nicht aber *Bac. lactis acidi* (LEICHMANN), *L. Delbrücki*, *L. lactis*, *Bac. bulgaricus*, *Streptococcus Yoghurt* und *Str. hollandicus*.

H. C. JACOBSEN.

UEBER SCHRÖTER UND COHN'S LAKMUSMICROCOCCUS

VON

M. W. BEIJERINCK ¹⁾.

(Mit Tafel V und VI).

1. *Micrococcus cyaneus* in der Literatur.

Im Jahre 1870 wurde im pflanzenphysiologischen Institut zu Breslau von Dr. J. SCHRÖTER ein eigentümlicher *Micrococcus* ähnlicher Organismus gefunden, wovon der Entdecker Folgendes mitteilt: ²⁾ »Auf einer im Anfang Januar 1870 zur Bakterienkultur ausgelegten gekochten Kartoffelscheibe wurde eine umfangreiche sehr intensive Blaufärbung beobachtet. Sie nahm schnell zu, sodass die Scheibe in der Ausdehnung mehrerer Centimeter davon eingenommen wurde, und schritt auch in die Tiefe fort und durchdrang nach und nach das Gewebe bis zur entgegengesetzten Seite der Scheibe. Bei mikroskopischer Untersuchung wurden im Innern der blaugefärbten Masse keine Bakterien vorgefunden, die Membranen der Stärkekörner waren hellblau gefärbt, zwischen ihnen wucherte reichlich ein Pilzmycel, dessen contrahierter Inhalt tief indigoblau gefärbt erschien.

Von der blauen Masse wurde eine Aussaat auf frische Kartoffelstücke gemacht. Erst nach zehn Tagen zeigte sich auf den Impfstellen eine blauviolette Färbung. Hier wurde das Vorhandensein kleiner, elliptischer, unbeweglicher Organismen constatirt. Die Färbung schritt centrifugal fort, wurde tief indigoblau und drang wieder weit in die Tiefe. Bei mehreren darauf wiederholten Kulturen trat immer nach etwa zehn Tagen dieselbe Pigmentbildung in derselben Weise auf.

¹⁾ Nach einem Vortrag mit Demonstration gehalten zu Leiden am 13ten Dezember 1913.

²⁾ Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. COHN's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. I. Pag. 122. 1875.

Der blaue Farbstoff wurde durch Säuren intensiv carminroth gefärbt. Alkalien stellten die blaue Farbe wieder her, Säuren färbten dann wieder roth. Das Pigment verhält sich darin ganz so wie Lakmus, zu dessen Bildung ist mithin kein den Flechten eigenthümlicher Stoff erforderlich.

Da ich im Innern der blaugewordenen Substanz keine Bacterien, dagegen sehr constant ein Pilzmycel auffand war ich lange geneigt letzterem die Blaufärbung zuzuschreiben. Diese Vermuthung musste schon deshalb aufgegeben werden weil nicht überall in der blauen Masse Mycel nachweisbar war und die Zellen der Nährsubstanz ebenso wie der Pilz blau gefärbt waren. Es ist anzunehmen, dass die Bacteridien sich nur an der Oberfläche vermehren und nur hier wie *B. prodigiosum*, das Pigment bilden. Dieses scheint in Wasser löslich zu sein, und deshalb von der Oberfläche aus in die Nährsubstanz einzudringen und sie zu färben.

Das regelmässige Auftreten des Schimmels mit der Pigmentbildung in meinen Culturen erklärt sich leicht dadurch, dass von der ersten Culturstelle gleichzeitig mit den Bacteridien Schimmelsporen und lebende Mycelstücke übertragen und dann immer weiter fortgepflanzt wurden«.

Nachdem SCHRÖTER das Pilzmycel als *Fusisporium solani* MARTIUS determiniert hat, sagt er weiter: »Es lässt sich daraus wohl schliessen, dass auch hier durch die Vegetation der Bacteridien anfangs saure, später alkalische Substanzen gebildet wurden.

Das hier betrachtete blaue Pigment, ist in seinen Reactionen gänzlich verschieden von dem der blauen Milch, wie sie O. ERDMANN angibt. ¹⁾ Nach den dort citierten Untersuchungen von Dr. TRÖMMER verändern Aetzkali und Natron den Farbstoff derselben in Pfirsichroth, Säuren stellen die blaue Farbe wieder her. Ammoniak verändert die Farben wenig ins Violet, während Essigsäure sie wieder herstellt. Salzsäure zerstört sie nicht. Salpetersäure (rauchende) zerstört sie, Chlorwasser dessgleichen. Die gegebenen Reactionen sind wiederum die der Anilinkörper und zwar desjenigen Anilinblaus, das man nach A. W. HOFFMANN's Untersuchungen als Triphenylosanilin bezeichnet. Wie es scheint wird das Pigment durch lebhaft bewegliche Bacterien

¹⁾ Bildung von Anilinfarben aus Proteinkörpern. Journal für praktische Chemie 1866. Pag. 386.

gebildet, welche sich in zahlloser Menge in der blauen Milch finden.

Es existieren also zwei specifisch verschiedene blaue Bacterienpigmente, das eine durch unbewegte Bacteridien, das andere durch bewegte Bacterien gebildet, ebenso wie wir es bei dem gelben Farbstoff gesehen haben.

In 1872 hat COHN selbst eine mit der von SCHRÖTER entdeckten Bakterie nahe verwandte Varietät gefunden und zwar durch einen Anhäufungsversuch, welcher mir bei der Wiederholung allerdings nicht den gleichen Organismus gegeben hat, aber worin ich dennoch einen guten Kern sehe, welcher wahrscheinlich, bei richtiger Anwendung von Ammoncarbonat und Infection mit fruchtbarer Gartenerde, den Lakmusmikroben auf's Neue wird liefern können.

COHN beschreibt seinen Fund folgenderweise: 1) »*Micrococcus cyaneus* (*Bacteridium cyaneum* SCHRÖTER). Die elliptischen unbeweglichen Kügelchen dieser Art wurden von SCHRÖTER im Januar 1870 als Ursache einer auf gekochten Kartoffeln erschienenen umfangreichen und intensiven Blaufärbung beobachtet. Mir selbst kam dieses blaue Pigment zur Beobachtung, als ich zuerst am 22 Januar 1872 ein Gemisch von 8 cc. destillirtem Wasser, 2 cc. concentrirter Lösung von saurem weinsteinsaurem Kali und 2 cc. käuflichem essigsauerm Ammoniak nebst den nöthigen Nährsalzen mit einem Tropfen Bacterienflüssigkeit versetzte und in einem geheizten Blechkasten bei c. a. 30° C. offen stehen liess. An der oberfläche bildete sich eine Zoogloea (*Mycodermahaut*) von Kugelbacterien, neben unzähligen Stäbchenbacterien; nach neun Tagen begann die Flüssigkeit sich schwach blaugrün zu färben, die Färbung wurde von Tag zu Tag intensiver und reiner blau und war am 17 Februar ganz blau, wie Kupfervitriollösung. Durch Uebertragung der auf der Oberfläche schwimmenden Zoogloeahaut, sowie der sich allmählich bildenden Bacterienabsatz, konnte ich aus neuen Lösungen von ähnlicher oder modificirter Zusammensetzung den blauen Färbstoff immer wieder erzeugen, sodass die Fermentthätigkeit dieser »Pigmentmutter« nicht bezweifelt werden kann; bei Aussaat wurde die Flüssigkeit zuerst alkalisch trübe, milchig, solange die stets gleichzeitig vorhandenen Stäbchenbacterien sich überwiegend

1) Untersuchungen über Bacterien. COHN's Beitr. zur Biol. d. Pflanzen, Bd. 1, Pag. 156, 1875.

vermehrten, schliesslich aber ganz klar und rein blau, nachdem die Bacterien sich am Boden abgesetzt hatten. Ich werde auf diese Verhältnisse noch einmal zurückkommen.

Der blaue Farbstoff wurde von mir in einer vorläufigen Mittheilung vom 14 Februar 1872 mit dem Lacmus verglichen, dem er äusserlich ganz gleicht; auch wird derselbe durch Säuren roth, durch Ammoniak wieder blau; er wird durch Alkohol nicht gefällt; er fluoessirt nicht und besitzt ein Spectrum ohne Absorptionsstreifen, nur mit Verdunkelung der schwächer brechenden Hälfte.

Bekanntlich ist der Lacmusfarbstoff auch nicht als solcher in den Flechtenauszügen enthalten, aus denen er dargestellt wird; diese sind vielmehr ursprünglich farblos, und erlangen ihr Pigment erst durch eine Art Gährung oder Fäulniss, bei welcher Ammoniak und andere Basen (Kalk) eine noch nicht näher ermittelte Rolle spielen; es lässt sich bis jetzt noch nicht feststellen, ob bei der echten Lacmusgährung auch Kugelbacterien betheiligt sind.

Der von mir erzeugte blaue Farbstoff enthält Kohlensaures Ammoniak, welches durch die Fermentthätigkeit aus dem ursprünglich zugesetzten essigsauren Ammon entstanden ist; derselbe zeigt jedoch nicht jene Beständigkeit, wie einige andere Pigmente chromogener Kugelbacterien; denn die Flüssigkeit, in welcher er sich löst erscheint in der Regel anfangs span-grün und wird erst allmählich blau; am Licht verliert er nach einiger Zeit an Intensität und zeigt eine blaugrüne Nuance, wobei sich ein dunkelbraunes Pulver absetzt; in anderen Fällen erhielt sich die span- oder lauchgrüne Färbung ohne in Lacmusblau über zu gehen und steigerte sich sogar zu grosser Intensität und Reinheit; auch lauchgrüne Lösung wird durch Säuren roth, durch Ammoniak wird das Grün wieder hergestellt, es handelt sich hier offenbar nur um Modifikationen eines und desselben Pigmentes durch noch unbekannt chemische Reactionen. Eine sehr intensive spangrüne Fleckenbildung beobachtete ich auch am 8 August 1872 auf gekochten Kartoffelscheiben, und auch hier fanden sich auf und zwischen den Kartoffelzellen zahllose Kugelbacterien, denen die erzeugung des Pigmentes zuzuschreiben ist.

Die geringe Stabilität des Farbstoffes, wovon COHN spricht,

ist nicht im Streite mit seiner Natur als Lakmusfarbstoff, denn ich fand eine ähnliche Desorganisation des letztgenannten Körpers in alkalischen Bakteriengemischen.

SCHRÖTER ist in 1889 noch einmal auf den gleichen Organismus zurückgekommen, nämlich in der von COHN herausgegebenen Kryptogamenflora von Schlesien, wofür er die Pilze bearbeitet hat, und zwar in der sehr guten Uebersicht der damals bekannten oder vermeintlichen 149 *Micrococcus*-arten, ¹⁾ wo man unter No. 129 die Beschreibung findet von *M. cyaneus* (SCHRÖTER 1870), wobei er als gesonderte Varietät die von COHN aufgefundene Form als *M. pseudo-cyaneus* (COHN 1872) anführt, ohne jedoch den oben gegebenen Beschreibungen irgend etwas Neues zuzufügen.

Wie man aus dem vorgehenden sieht sind COHN und SCHRÖTER völlig überzeugt von der Unbeweglichkeit ihrer Mikroben, und was die Form betrifft sprechen beide von länglichen oder elliptischen Zellen, während SCHRÖTER anfangs denn auch den Namen *Bacteridium* gebraucht hat, welcher erst später, nach COHN's Befund, in *Micrococcus* verändert wurde.

Der *Micrococcus cyaneus* ist in vielen Lehrbüchern und Compilationen angeführt, scheint jedoch nur einmal zurückgefunden zu sein und zwar in der Leitmeritzer Wasserleitung, ²⁾ sodass derselbe als selten bezeichnet wird.

Die von REINER MÜLLER gefundene Form, worauf ich zurückkomme, ist jedenfalls abweichend. Ich selbst fand die Art zuerst bei Gelegenheit von Bodenuntersuchungen zur Isolierung von *Azotobacter*, und später wieder bei der Ausführung eines Versuches, welchen ich den »Actinomycetenversuch« nenne.

2. Der Actinomycetenversuch.

Derselbe besteht in der Aussaat der zu untersuchenden Bodenprobe auf Platten von folgender Zusammensetzung: Leitungswasser 100, Agar 2, Glukose 2, Calciummalat 0,1, Ammonsulfat (oder Ammonnitrat) 0,1, Bikaliumfosfat 0,05 und Kultur im Brutschrank bei 28° C.

Viele Bodenorganismen erzeugen auf einer solchen Platte Calciumcarbonat aus dem Malat, wodurch die Reaktion neutral

¹⁾ Die Pilze Schlesiens. Erste Hälfte, Pag. 145, Breslau, 1889.

²⁾ MIGULA, System der Bakterien. Bd. 2, Pag. 187, Jena, 1900.

bleibt, selbst dann wenn andere, nebenbei liegende Arten aus der Glukose Säure bilden.

Es ist nicht zu empfehlen eine bessere Stickstoffquelle zu verwenden, weil dann die gewöhnlichen Erdmikroben die Platte zu sehr überwuchern. Es hat sich nun herausgestellt, dass die verschiedensten Arten der Familie der Actinomyceten, welche bekanntlich auf den gewöhnlichen Fleischbouillonplatten nur schwierig zur Entwicklung kommen, auf dem genannten Nährboden durch die übrigen Bodenmikroben nur wenig gehindert werden, sodass man, selbst die vielen sehr langsam wachsenden Formen dieser Gruppe nicht leicht übersehen kann. Allerdings bilden sie darauf nur kleine Kolonien, wesshalb man natürlich scharf zusehen muss um die allerkleinsten darunter zu finden. Bei der Unterscheidung derselben wird man geholfen durch das starke Vermögen der Pigmentbildung, welches sehr vielen Actinomyceten eigen ist, und wobei besonders gelbe, braune und schwarze, seltener, die für den gegenwärtigen Fall wichtigen blauen oder roten Farbkörper entstehen. Es ist nun auf diese Weise, dass man in Gartenerde die Gegenwart von drei verschiedenen Arten nachweisen kann, welche ringsum ihre Kolonien blaue Diffusionsfelder erzeugen. Hiervon lässt eine sich mit *Micrococcus cyaneus* der Literatur identifizieren; dieselbe zeigt überdies grosse Aehnlichkeit mit *Bacterium coelicolor* von REINER MÜLLER, wovon sie sich jedoch, der Beschreibung nach, unterscheidet durch die Natur des Pigmentes und durch ihre Morphologie. Eine zweite Art ist wohl identisch mit der *Streptothrix coelicolor* dieses Autors; die dritte auffallend kleine Art ist noch nicht genügend studiert. MÜLLER fand seine blaue Mikroben zufällig; das Bacterium auf einer Serumplatte bei der Untersuchung eines diphterieverdächtigen Mandelbelages, die *Streptothrix* in einem Kartoffelröhrchen; er betrachtet dieselben als aus der Luft herkünftig. ¹⁾

Besonders die erste Art ist interessant, nicht allein wegen der Pigmentbildung, sondern auch durch ihre unzweifelhafte Zugehörigkeit zu der Familie der Actinomyceten, was mich für einen *Micrococcus* sehr bezeichnend und merkwürdig zuscheint.

¹⁾ Eine Diphteridee und eine *Streptothrix* mit gleichem blauen Farbstoff, sowie Untersuchungen über *Streptothrix*-arten im allgemeinen. Centralbl. f. Bakteriologie Erste Abt. Bd. 64, Pag. 195, 1908. (Institut Kiel).

Ob diese Art wirklich so selten ist, wie es bisher den Anschein hat, betrachte ich durchaus nicht als sicher; bei unseren unvollkommenen Methoden der mikrobiologischen Bodenuntersuchung, können allerlei allgemeine Formen sich noch immer leicht unserer Beobachtung gänzlich entziehen, und andere, reichlich in unserer Umgebung vertretene Arten, nur äusserst selten zur Anschauung kommen, was wohl am deutlichsten daraus hervorgeht, dass beinahe jeder neue, gut eingerichteter Kulturversuch auch zur Entdeckung neuer Formen Veranlassung giebt. In diesem Falle kommt dazu noch der Umstand, dass unserere Art sehr leicht das Vermögen der Pigmentbildung erblich verliert, und dass es allen Anschein hat, dass dieses auch in der Natur stattfinden kann; das Auffinden und Identifizieren solcher pigmentfreien Formen muss aber mit ausserordentlichen Schwierigkeiten verbunden sein. Was uns also als eine seltene Art zuscheint, könnte sich schliesslich herausstellen als ein für die im Boden verlaufenden Prozesse dennoch wichtiger Faktor von grosser Verbreitung.

Ich halte es für sehr wohl möglich, dass der hier beschriebene Lakmusmikrobe oder seine nächsten Verwandten auch das Agens der technischen Lakmuserzeugung sind. Zwar habe ich bei der Aussaat des Mikroben auf einem Brei von fein gemahlener Orseilleflechte, nur vereinzelte blaue Punkte erhalten, jedoch sind mir die praktischen Bedingungen der Lakmusfabrikation nicht genügend bekannt um diesen Misserfolg als entscheidend zu betrachten.

3. Pigmentbildung.

Unser Mikrobe kann auf den verschiedensten Nährböden wachsen, und ist ein makrobiotischer Organismus, der scharfes Austrocknen und grosse Konzentrationsänderungen gut überdauern kann. Kulturgelatine wird nur langsam und spät verflüssigt. Bouillonagar wird schliesslich alkalisch durch Bildung von Ammoncarbonat.

Obschon die Pigmenterzeugung gegenwärtig nicht mehr so intensiv ist wie zur Zeit der ersten Isolierung, ist es leicht mit dem rein kultivierten Mikroben Lakmusfarbstoff in grosser Menge zu erzeugen. Nur kommt es darauf an den dazugeeigneten

Kulturboden zu finden. Nach sehr vielen Versuchen, welche nicht interessant genug sind um hier beschrieben zu werden, stellte sich heraus, dass der bei dem Actinomycetenversuch genannte Nährboden, für diesen Zweck zwar gut geeignet ist, jedoch, wenn es sich um die Reinkulturen handelt, noch beträchtlich verbessert werden kann, dadurch, dass als Stickstoffquelle Pepton anstatt Ammonsalz, und als Kohlenstoffquelle Mannit anstatt Glukose verwendet wird. Man erhält dann also folgender Kulturboden:

Leitungswasser	100
Agar.....	2
Mannit.....	2
Pepton.....	0.5
Calciummalat.....	0.10
Bikaliumfosfat.....	0.05

Weil dieses Material für die Kultur der meisten Bakterien sehr günstig ist, besonders auch für die Heubacillen, muss sterilisiert werden. Zufügung von Natriumcarbonat ist jedoch nicht nötig. Die Bedeutung des Mannits ist darin zu suchen, dass die Pigmentbildung der Lakmusbakterie besser in schwach alkalischer oder neutraler, wie in schwach saurerer Lösung stattfindet, und die Glukose hier, wie in so vielen anderen Fällen die Säurebildung begünstigt, während aus Mannit keine Säure entsteht, obschon das Wachstum dadurch sehr gefördert wird. Ueberhaupt ist Mannit wohl als die beste aller untersuchten Kohlenstoffquellen zu betrachten. Weil aber auch Malat als solche sehr geeignet und eine gemischte Nahrung für viele Mikroben vorteilhafter ist, wie eine einseitige, so lässt sich einigermassen begreifen warum Mannit und Calciummalat zusammen wohl am günstigsten sind für die Lebensfunktionen unserer Art überhaupt.

Uebrigens geben Aussaaten auf Agarplatten, worin 0,1 % Calciummalat, 0,1 % Pepton und 0.02 % Bikaliumfosfat ohne weitere Zusätze, ebenfalls kräftige Kulturen, welche viel Lakmusblau erzeugen. Weil das Pigment wasserlöslich und sehr stabil ist, kann es leicht durch Auslaugen der Agarplatten und Ausdunsten der erhaltenen Lösung in concentrirtem Zustand erhalten werden. Als Indikator verwendet findet der Umschlag bei genau derselben Säure- und Alkaliconcentration statt, wie

beim gewöhnlichen Lakmus, dessen Absorptionsspektrum hier ebenfalls zurückgefunden wird. Obschon die Pigmentbildung durch eine alkalische Reaktion begünstigt wird, kann nicht gesagt werden, dass sie davon abhängig ist, den auf Nährböden mit Glukose entsteht ebenfalls Pigment, jedoch nicht blau sondern rot gefärbt, wegen der zugleichzeit stattfindenden Säurebildung.

Verwendet man neben Glukose Ammon- oder Kaliumnitrat als Stickstoffquelle, so erhält man violette Kulturen. Das Pepton ist also bei Gegenwart von Glukose auch für die Säurebildung als günstig zu betrachten, was übrigens nur ein neues Beispiel so zu sagen eines Naturgesetzes zu sein scheint, welches ebenso sehr gilt für die Säurebildung in unserem Magen, wie in den höheren Pflanzen und bei den Mikroben.

Auch Malzwürze-Agar ist ein ziemlich guter Kulturboden für die Erzeugung des roten Pigmentes, was wieder offenbar zusammen hängt mit dessen Gehalt an pflanzlichem Pepton und Zucker.

Um festzustellen ob COHN's Lakmusmicrococcus mit meinem Mikroben wirkliche Uebereinstimmung gehabt hat, habe ich kultiviert in reinen und in mit spontanen Bakteriengemischen versehenen Lösungen von Ammonacetat und von den weiteren von COHN angegebenen Salzen (siehe oben). Es hat sich dabei herausgestellt, dass Ammonacetat sich für Wachstum und Pigmentbildung wirklich eignet, während die anderen Lösungen kein sicheres Resultat gaben. Eine gute Anhäufungsmethode aus Erde oder anderen Naturmaterialien vermittelt einer Kulturflüssigkeit, fehlt jedoch noch, wie ich schon oben bemerkte.

Obschon der Lakmusmikrobe den Aëroben zugehört, ist es möglich dadurch allerlei Reduktionen hervorzuführen. Da ich über solche Versuche schon früher ausführlich gehandelt habe ¹⁾ wünsche ich darüber an dieser Stelle nur hervorzuheben, dass der Mikrobe wenn auch schwierig, imstande ist in Nährlösungen sein eigenes Pigment zu dem entsprechenden Leukokörper zu reduzieren, und dass er, wie zu erwarten war, dieses ebenfalls mit Handelslakmus zu tun vermag, was insoweit bemerkenswert ist, als dieser Vorgang bekanntlich nicht durch Schwefelwasserstoff oder durch andere Sulfide hervorgerufen werden kann.

¹⁾ Phénomènes de réduction produits par les microbes. Archives Néerlandaises. Sér. 2. T. 9 Pag. 131. 1904.

4. Mutation.

Die roten Kulturen haben die bemerkenswerte Eigenschaft, dass sie beim Ueberimpfen, selbst auf Kulturböden, worauf die Normalform sofort Lakmusblau erzeugt, einige Zeit als rote Modifikation weiter wachsen. Es ist als ob der Mikrobe nicht sofort seine Gewohnheit der Säurebildung ablegen kann, denn die Erscheinung dauert zu lange um etwa durch in den Keimen angehäuften Säure, welche nur langsam verarbeitet wird, erklärt werden zu können. Schliesslich werden aber z.B. auf Mannit-malatboden, die anfangs rot wachsenden Impfungen, beim Weiterwachsen blau, sodass es sich hierbei offenbar nicht um eine Modifikation oder Mutation mit erblicher Konstanz handelt, sondern um eine Fluktuation mit sehr begrenzter Erblichkeit. Weil der Lakmusfarbstoff einer der besten Indikatoren ist, dessen Umschlag mit grosser Schärfe beobachtet werden kann, dürfte die Erscheinung eine der geeignetsten sein um die schwierige Frage der fluktuierenden Erblichkeit weiter zu bringen.

Neben den hier besprochenen vorübergehenden ist es nicht schwierig bei unserem Mikroben auch eine erblich stabile Veränderung hervorzurufen, welche im mehr oder weniger vollständigen Verluste des Vermögens der Pigmentbildung überhaupt besteht. Es scheint dieses bei den verschiedenartigsten, als ungünstig zu bezeichnenden Lebensbedingungen einzutreten, wozu auch die Umstände, welche zur Säurebildung Veranlassung geben gehören. Jedenfalls geben die auf Glukose-Pepton oder auf Malzwürzeboden gezüchteten Kulturen, wenn sie darauf drei oder vier Wochen verweilt haben, beim Ueberimpfen auf Malatmannitagar, neben dem blauen Hauptstamm, gänzlich farblose Kolonien und blaue Zwischenformen mit einer sehr verschiedenen Intensität der Färbung, wobei ich zwei bis drei Stufen gut unterscheiden konnte und wegen der erblichen Konstanz auch längere Zeit in Kultur gehalten habe. Auch werden farblose Kolonien erhalten, wenn man dem Kulturboden 0,1 % Chlorcalcium zusetzt, welcher Körper das Wachstum etwas hemmt und das reine Blau des Pigmentes in Violet verwandelt. Beim Ueberimpfen auf Mannit-Malatagar ohne Chlorcalcium entwickelten sich dann daraus viel mehr farblose wie blaue Kolonien.

Obschon die Erscheinung der Hauptsache nach mit der

früher beschriebenen Mutation ¹⁾ von *Bacillus prodigiosus* zu *B. p. albus* und *B. p. roseus* 1 und 2 übereinstimmt, unterscheidet sie sich davon durch die hier viel geringere Stabilität der Pigmentbildung, wie bei *B. prodigiosus*. Dieses ist übrigens im Einklang mit der ausserordentlichen Variabilität, welche bei der Gattung *Actinomyces* beobachtet wird, und womit unser Mikrobe sicher verwandt ist. Obschon der Lakmusmikrobe dadurch ein gutes Objekt für Variabilitätsversuche ist, ist die relative Langsamkeit des Wachstums desselben ein dafür wenig günstiger Umstand.

Die Kolonien der blauen Hauptform sind etwas gerunzelt und zusammenhängend, diejenigen der farblosen Mutante gänzlich weich und, wie gewöhnliche *Micrococcus*-Kolonien, ohne jeden Zusammenhang.

5. *Actinomyces (Streptothrix) coelicolor* REINER MÜLLER.

Obschon mein Stamm nicht völlig mit der Beschreibung von REINER MÜLLER's Material übereinstimmt, und davon zum Beispiel durch das Fehlen der von MÜLLER so hübsch dargestellten Ringbildung abweicht, zögere ich nicht denselben mit dem gleichen Namen zu belegen, weil die Variabilität dieser Art sehr beträchtlich ist. Ich fand nämlich bei beinahe jeder Aussaat, wenn ein paar Wochen alt, nicht nur verschieden gestaltete Kolonien, sondern auch Sektormutanten, welche bei der Vermehrung, entweder atavierten oder erblich stabile morphologische Typen hervorbrachten. Bei einigem Suchen werden sich wie ich meine auch wohl Ring bildende Mutanten auffinden lassen.

Auch bezüglich der Pigmente finde ich nicht genau dasselbe wie MÜLLER. Ich komme nämlich bei alten Kulturen meistens (nicht immer) zum Schlusse, dass das blaue Pigment Lakmus sein muss, finde aber in Uebereinstimmung mit MÜLLER, dass junge Kulturen ein anderes, an Carotin erinnerndes Pigment enthalten ohne, dass ich imstande bin dieses mit erblicher Veränderlichkeit des Mikroben selbst in Zusammenhang zu bringen. Es dürften also noch andere mit dem Lakmus verwandte Pigmente existieren. Es ist jedoch auch möglich, dass dieses nur scheinbar richtig

¹⁾ Mutation bei Mikroben. *Folia microbiologica*, Bd. 1, Pag. 30, 1912.

ist, und dass das verschiedene Verhalten nur darauf beruht, dass der Lakmusfarbstoff, wenn frei, andere Eigenschaften zeigt, wie wenn noch an der Zelle gebunden. Die Richtigkeit der Ansicht MÜLLER's, dass das Pigment seines Stammes eine Modifikation des Anthocyans (Erythrophylls) sein sollte, konnte ich bei dem meinigen nicht überzeugend nachweisen. Ich muss aber bemerken, dass mein Stamm nur sehr schwierig Pigment erzeugt. Auf den gewöhnlichen Böden wächst derselbe farblos. Auf Mannit-Malat-Pepton-Agar ist die Pigmentbildung gut bemerkbar jedoch schwach. Am besten gelang dieselbe auf Platten von der Zusammensetzung: Leitungswasser 100, Glukose 2, Calciummalat 0,1, Ammonitrat 0,1, Bikaliumfosfat 0,05, bei 20° bis 28° C. ¹⁾ Mit der nötigen Geduld kann man in solchen Platten genug Pigment erhalten um dasselbe mit Wasser auszuziehen und sich zu überzeugen, dass darin Lakmus vorkommt. Dieser positive Nachweis hat insoweit Interesse als dadurch die Verwandtschaft des Lakmusmicrococcus mit *A. coelicolor* eine neue Stütze erhält.

5. Verwandtschaft. Aufstellung der Gattung *Actinococcus*.

Die richtige Auffassung und Umgrenzung der Actinomyceten als besondere Pflanzenfamilie ist das Verdienst von NEUMANN und LEHMANN, ²⁾ und schon in der ersten Auflage ihres hierbei genannten Buches von 1896 durchgeführt. Wie wenig dieses von anderen Autoren verstanden wurde, geht z. B. daraus hervor, dass MIGULA, weder in seinem »System der Bakterien«, noch in den für ENGLER's Pflanzenfamilien behandelten »Schizomyceten«, dieses berücksichtigt, und MACÉ noch in 1913 die echten *Actinomyces*arten mit der vollständig abweichenden Gattung *Cladothrix* zusammenfasst. ³⁾

Auch REINER MÜLLER, welcher NEUMANN und LEHMANN folgend, seinen blauen Mikroben ganz richtig als eine Diphteridee bezeichnet, hat dennoch den Fortschritt nicht bemerkt, welcher in der Aufstellung der Gattung *Mycobacterium* dieser Autoren

¹⁾ Mit Stärke als Kohlenstoffquelle war das Resultat nicht besser.

²⁾ Bakteriologische Diagnostik. 5te Aufl. Pag. 159 und 545, 1912.

³⁾ Traité de Bactériologie, 6me Ed. T. 2, pag. 720. 1913.

gelegen ist, wie aus dem von ihm gewählten Namen *Bacterium* hervorgeht. Bei MIEHE ¹⁾ fehlt ebenfalls noch die richtige Auffassung, denn zu der Familie der Mycobacteriaceae können keine bewegliche Formen gebracht werden, wie er das tut.

NEUMANN und LEHMANN bringen die drei folgenden Gattungen zu der von ihnen aufgestellten Familie:

Erstens, *Corynebacterium* mit sechs Arten, worunter *C. diphtheriae* LÖFFLER, und der Erreger des Rotzes, *C. mallei* FLÜGGE.

Zweitens, *Mycobacterium* mit mehreren Arten; worunter bemerkenswert *M. leprae* A. HANSEN, *M. tuberculosis* KOCH und *M. phlei* MOELLER. ²⁾

Drittens, *Actinomyces*, mit vielen Arten, worunter *A. bovis* HARZ—BOSTRÖM, *A. chromogenes* GASPERINI. ³⁾

Bei allen drei Gattungen handelt es sich um typisch unbewegliche Formen, welche mehr oder weniger deutlich verzweigt sein können. Die am vollständigsten ausgestattete Gattung ist *Actinomyces* mit reich verzweigtem Mycel und, bei den höheren Formen, schnurenweise angeordneten, kugelförmigen Luftconidien.

Bei *Mycobacterium* und *Corynebacterium* fehlt die Bildung von Luftconidien, während die Mycelfäden durch Fragmentation zu kleinen Stücken aus einander fallen. Beide Gattungen sind nahe verwandt, und ob ihre Trennung eine natürliche ist, muss die Zukunft lehren.

Nach meiner Ansicht stellt es sich nun als notwendig heraus diesen Gattungen noch zwei neue hinzuzufügen, welche ich *Actinobacillus* und *Actinococcus* nennen will. Auf *Actinobacillus* werde ich bei einer anderen Gelegenheit noch einmal zurück

¹⁾ Handwörterbuch der Naturwissenschaften. Band I, pag. 786. 1912.

²⁾ Letztere Art mit Fotografie: SÖHNGEN, Paraffinbakterien. Centralblatt f. Bakteriologie 2^{te} Abt. Bd. 37, Pag. 595. 1913.

³⁾ Weil der Name *Streptothrix Foersteri* schon im Jahre 1875 von COHN verwendet wurde (Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. I, pag. 186) für den von FOERSTER in 1855 (Archiv für Ophthalmologie I, 284 und weiter II, 224, und XV, 318) entdeckten Mikroben des menschlichen Thränenkanals, während der Name *Actinomyces bovis* für den von RIVOLTA in 1868, PERRONCITO in 1875 und BOLLINGER in 1877 beschriebenen Mikroben, erst in 1878 (Jahresbericht der Kön. Centralanstalt f. Thierarz. zu München) von HARZ eingeführt ist, sollte, auf Grund der Prioritätsregel, *Streptothrix* anstelle von *Actinomyces* gewählt werden müssen. Die von NEUMANN und LEHMANN getroffene Wahl des Namens *Actinomyces*, scheint mir aber in diesem Falle für ihre Nachfolger entscheidend.

kommen. Hier will ich nur bemerken, dass von dieser Gattung bisher mehrere Arten bekannt geworden sind, wovon ich eine schon früher besprochen habe, nämlich unter dem Namen *Bacillus oligocarboophilus*, wovon mir damals die natürliche Verwandtschaft nicht klar war. ¹⁾

Zur Gattung *Actinococcus* müssen diejenigen *Micrococcus*-arten der Literatur gebracht werden, welche unzweifelhafte Actinomyceten sind, und das ist sicher der Fall bei *Micrococcus cyaneus*, welcher darum weiterhin *Actinococcus cyaneus* heissen muss (Fig. 2, Taf. V). Besonders die Hauptform zeigt ihre natürliche Verwandtschaft mit den Actinomyceten so deutlich, dass jeder, welche mit den hier vorliegenden Verhältnissen bekannt ist, meine Ansicht als richtig anerkennen wird. Nicht nur die eigentümliche rauhe und gekräuselte Oberfläche der Kolonien ist hierbei maassgebend, sondern ebenfalls die von einem Centrum ausstrahlende Anordnung der Zellen in den jungen Kolonien, welche sehr deutlich, sozusagen eine Verzweigung der Strahlen anzeigt, was dasselbe ist, wie eine Veränderung in der Richtung der Ebene, worin die Zellteilung zustande kommt (Fig. 1, Taf. V).

Bei gewissen Mutationen, werden in den Kolonien längere Elemente, wie die gewöhnlichen gefunden, und darin lassen sich dann auch bisweilen Stäbchen mit Gabelungen nachweisen. (Fig. 3 u. 4, Taf. VI).

Ich komme dadurch zum Schlusse, dass die alte Gattung *Micrococcus* der Literatur, keine natürliche ist, sondern wenigstens zwei und möglich noch mehr durchaus nicht verwandte Formengruppen umfasst. Meine vorläufige Gattung *Lactococcus*, wozu die Mikroben der Rahmsäuerung, *Lactococcus lactis* sowie die Dextransäuerer, *Lactococcus dextranicus* ²⁾ gehören, müssen in eine ganz andere Verwandtschaftsgruppe untergebracht werden, wie die Actinomyceten, nämlich in diejenige der *Coli*-gruppe. Das heisst also, sie sind phylogenetisch verwandt mit beweglichen, ciliaten Bakterien, womit sie vermittelt der verschiedenartigen *Aerogenes*-arten, durch alle mögliche Uebergänge zusammenhängen. Dieses ist mit ihren physiologischen Leistungen in völliger Uebereinstimmung, weil sowohl die *Aerogenes*- wie auch alle

¹⁾ Farblose Bakterie deren Kohlenstoffnahrung aus der atmosphärischen Luft herrührt, Centralbl. f. Bakteriologie. 2e Abt., Bd. 10, Pag. 33, 1903.

²⁾ Folia microbiologica, Bd. 1, 377, 1912.

andere Arten der *Coli*-gruppe, nicht nur Milchsäure erzeugen, sondern auch einige andere in wechselnden Verhältnissen vorkommende Producte, welche auch in den echten Milchsäuregärungen erkannt sind, wie Bernsteinsäure, Acetylmethylcarbinol und Essigsäure.

Aus diesen Betrachtungen entwickelt sich nun die eigentümliche Frage ob *Actinomyces* durch progressive Variabilität aus *Actinococcus* oder, umgekehrt, ob *Actinococcus* retrogressiv aus *Actinomyces* entstanden ist. Die Antwort kann nicht zweifelhaft sein. Schon früher habe ich auf den Umstand hingewiesen, dass eine der Mutationen des Lakmusmikroben Kurzstäbchen hervorbringt, worunter gegabelte gefunden werden, was, in Verbindung mit der typischen Unbeweglichkeit, die Verwandtschaft zu der Gattung *Mycobacterium* unzweifelhaft macht. Dass diese Gattung aber aus *Actinomyces* hervorgegangen ist, wird so zu sagen erwiesen durch die Morphologie von *Actinomyces chromogenes*, dessen »Mycel« sich bei schlechter Ernährung mit staubigen, weissen Conidien bedeckt, wodurch derselbe einem Luftconidien erzeugenden Schimmelpilz ähnlich ist; bei sehr reichlicher Ernährung jedoch oidienartig aus einander fällt und so den Eindruck eines *Mycobacterium's* macht.

Ich glaube, dass wir noch einen Schritt weiter gehen müssen, und dass alle Mycologen wohl zugeben werden, dass die Gattung *Actinomyces* selbst, ein stark reduzierter Stamm irgend einer niederen Fungusgruppe ist, was zum notwendigen Schlusse führt, dass zu der durchaus künstlicher Gattung *Micrococcus* im phylogenetischen Sinne tief reduzierte höhere Fungi gehören, während, wie oben bemerkt, gegenwärtig dazu auch, zu ganz anderen Verwandtschaftsgruppen gehörige, wirkliche Bakterien gebracht werden.

Eben das Reich der niederen Pilze ist offenbar ein Gebiet, in grossem Maasstabe im Laufe der Zeiten zur Bildung neuer Arten Veranlassung gegeben hat. Zu gleicher Zeit sehen wir dort jedoch andere Formen der Variabilität wirksam, welche zur Vervollkommung schon existierender, oder zur Entstehung neuer Merkmale und neuer Genen geführt haben. So müssen die Genen der Lakmusbildung von *Actinococcus cyaneus* wohl durch eine langsame Umbildung der entsprechenden Genen von *Actinomyces coelicolor* oder einem anderen gemeinsamen Urahn entstanden sein.

FIGURENERKLÄRUNG ZU TAFEL V UND VI.

- Fig. 1. (50). Kolonien von *Actinococcus cyaneus* auf Bouillonagar.
Die kleineren mit *Micrococcusschnuren* als Ausläufer.
- » 2. (1000). *Actinococcus cyaneus* auf Bouillonagar.
 - » 3. (1000). Bacteridienzustand von *Actinococcus cyaneus* auf Mannit-Malat-Pepton-Agar.
 - » 4. (1000). Bacteridienzustand von *Actinococcus cyaneus* auf Malzwürzeagar mutirt, und Säure erzeugend.
-

I N H A L T.

1. *Micrococcus cyaneus* in der Literatur.
 2. Der *Actinomyceten* Versuch.
 3. Pigmentbildung.
 4. Mutation.
 5. *Actinomyces (Streptothrix) coelicolor* REINER MÜLLER.
 6. Verwandtschaft. Aufstellung der Gattung *Actinococcus*.
-

[Aus dem Institut für Bakteriologie und
Hygiene der Universität Groningen].

UEBER DIE METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER BAKTERIENMENGE MENSCHLICHER FÄZES

VON

Prof. A. KLEIN UND F. VISSER, *Ass. am Institut.*

Die Entdeckung der Fäzesbakterien fällt wahrscheinlich zusammen mit der Entdeckung der Bakterien überhaupt, die unser Landsmann ANTONY VAN LEEUWENHOEK um die Mitte des Septembers 1675 machte. In einer sehr interessanten Abhandlung hat BEYERINCK 1) den Beweis geliefert, dass LEEUWENHOEK in diesem Jahre, und nicht, wie man bis dahin annahm, im Jahre 1683, die Bakterien zum ersten Male sah. Die ursprüngliche Mitteilung LEEUWENHOEKS vom 9. Oktober 1676 in den »Philosophical Transactions« stand uns nicht zur Verfügung, und in dem Titel dieser Veröffentlichung, den wir BEYERINCKS Abhandlung entnehmen, wird nur gesprochen von »little animals by him observed in rain- well- sea- and snow- water, as also in water, wherin pepper had lain infused.« LÖFFLER 2) aber, bei der Besprechung von LEEUWENHOEKS Entdeckung aus der Mitte des Monats September 1675, schreibt: »Auch im Seewasser, im Brunnenwasser, in Abgüssen von Pfeffer, im Darmkanal der Pferdefliege, der Frösche, Tauben, Hühner, sowie in seinem eigenen diarrhoischen Stuhle fand LEEUWENHOEK Tierchen der verschiedensten Art« etc. Wenn LEEUWENHOEK schon damals die Bakterien in Pfefferabgüssen gesehen

1) M. W. BEYERINCK. De infusies en de ontdekking der bakteriën. Jaarboek der Kon. Akademie van Wetenschappen voor 1913.

2) F. LÖFFLER. Vorlesungen über die geschichtliche Entwicklung der Lehre von den Bakterien. Leipzig, 1887, S. 5.

hat — und daran ist nach BEYERINCK'S Forschungen nicht mehr zu zweifeln, — und auch schon zu dieser Zeit seine eigenen diarrhoischen Fäzes untersuchte, so ist es völlig ausgeschlossen, dass LEEUWENHOEK die Fäzesbakterien *nicht* gesehen hätte, denn in den menschlichen Fäzes sind soviel Bakterien vorhanden, dass sie grossenteils aus Bakterien zu bestehen scheinen.

Ein paar hundert Jahre später, in den allerersten Anfängen unserer bakteriologischen Periode, zog eben diese Erscheinung besonders die Aufmerksamkeit auf sich, und mehrere Untersucher, wie NOTHNAGEL 1), UFFELMANN 2), WOODWARD 3), ESCHERICH 4), BIENSTOCK 5), u. a., glaubten allein schon auf Grund der einfachen mikroskopischen Untersuchung der Fäzes annehmen zu dürfen, dass ein beträchtlicher Teil der Kotsubstanz aus Bakterien besteht. Diese Wahrnehmungen haben den Grund gelegt zu den zahlreichen Untersuchungen nach der Bedeutung der Fäzesbakterien, und im Zusammenhange damit nach der Rolle, welche die im Darmkanal vorhandenen Bakterien in dem Leben der Menschen wie der Tiere zu spielen haben.

Bei dem experimentellen Studium dieser, sowohl von allgemein biologischem Standpunkte, wie auch besonders für die menschliche Physiologie und Pathologie, so äusserst wichtigen Fragen, war es vor allem notwendig, über eine hinreichend genaue Methode zur Bestimmung der Zahl der in den menschlichen Fäzes vorhandenen Bakterien zu verfügen. Eine solche Methode könnte überdies noch nach mancher anderen Richtung hin von grossem Nutzen sein. Die Methode liesse sich z. B. auch anwenden bei der Bestimmung der in den verschiedenen Teilen des Darmkanals vorhandenen Bakterienmengen, um die Verbreitung der Bakterien im Darmkanal kennen zu lernen. Weiter könnte sie eine direkt praktische, klinische Bedeutung bekommen bei der Beurteilung verschiedener bakterieller Darmstörungen, bei dem Studium der Darmantiseptis, vielleicht auch bei dem Studium der Prädisposition für Darminfektionen zur Bestimmung der Intensität der im Darmkanal vorhandenen natürlichen Wehrmittel.

1) NOTHNAGEL. Zeitschrift für klin. Medizin, 3.

2) UFFELMANN. Deutsches Archiv für klin. Medizin, 28.

3) WOODWARD. The medical and surgical report of the war of rebellion, 1.

4) ESCHERICH. Die Darmbakterien des Säuglings. Stuttgart 1886.

5) BIENSTOCK. Zeitschrift für klin. Medizin, 8.

Sehr bald nachdem R. KOCH die festen Nährböden in die Bakteriologie eingeführt hatte, wandte man die Kulturmethode an, um die Bakterienmenge, welche sich in menschlichen Fäzes befindet, zu bestimmen. Von bekannten Verdünnungen der Fäzes ausgehend, wurden Platten angelegt auf verschiedenen Nährböden, und diese Platten unter verschiedenen Verhältnissen zur Entwicklung gebracht. Die Zahl der Bakterien wurde meistens per mgr frische Fäzes angegeben.

Die Ergebnisse gingen stark auseinander; die Fäzes verschiedener Personen, und auch die derselben Person zu verschiedenen Zeiten untersucht, enthielten stark wechselnde Mengen kultivierbarer Bakterien. SUCKSDORFF 1) z. B. fand ein Schwanken dieser Zahlen zwischen 25.000 und 2.300.000, und gab aus seinen Bestimmungen 380.000 kultivierbare Bakterien per mgr frische Fäzes als Durchschnittszahl an. Bei erwachsenen Individuen mit gemischter Nahrung fand einer 2) der Unsrigen auf alkalischer Nährgelatine zwischen 356 und 6.396.000 per mgr, mit einer aus einer Anzahl Bestimmungen auf 658.500 per mgr Fäzes festgesetzten Durchschnittszahl. Spätere Untersucher, wie MACNEAL, LATZER und KERR 3) fanden per mgr Fäzes kultivierbar auf alkalischer Lakmuslaktosegelatine als Maximalzahl 1.232.667, als Minimalzahl 3140, als Durchschnittszahl 128.414.

Kultivierung auf anderen Nährböden, Änderung verschiedener Lebensbedingungen (Temperatur, Anaerobiose), ergeben nicht selten andere Zahlen; jedoch sind die Schwankungen in den meisten Fällen nicht besonders gross, und jedenfalls gehen die Durchschnittszahlen einer Anzahl Bestimmungen nicht weit auseinander. Nur MATSUSHITA 4) macht hier eine Ausnahme; dieser Untersucher fand viel höhere Werte bei Kultivierung auf Leber-Galle-Agar und bei Züchtung unter anaeroben Verhältnissen. Solche grossen Zahlen wie MATSUSHITA angibt, haben keine anderen Autoren gefunden. Seine Kulturversuche auf Leber-Galle-Agar sind noch von keiner anderen Seite bestätigt

1) SUCKSDORFF. Archiv für Hygiene, 4.

2) A. KLEIN. Verslagen Kon. Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, 10; Proceedings of the meeting of Saturday, May 25, 4.

3) MACNEAL, LATZER and KERR. The Journal of Infectious Diseases, 6, p. 571.

4) MATSUSHITA. Archiv für Hygiene, 41.

worden, und seine Resultate bei Kultivierung unter anaeroben Verhältnissen lassen sich mit unseren eigenen Untersuchungen nicht vereinigen. Auch die Ergebnisse der eben genannten amerikanischen Autoren stimmen in dieser Hinsicht mit den unsrigen überein; sie finden als Durchschnittszahl aus einer grossen Reihe Bestimmungen auf Lakmuslaktoseagar bei 37° C., aerob, 116.230, auf Lakmusglykoseagar bei 37° C. anaerob, 103.903 und auf Lakmuslaktosegelatine bei 18° C., aerob, 128.414 per mgr frische Fäzes. Diese Differenzen bleiben ganz innerhalb der Fehlergrenzen der Methode.

Indem wir also MATSUSHITAS Untersuchungen weiter ausser Betracht lassen, können wir annehmen, dass die Durchschnittszahl der aus 1 mgr frischen Fäzes gesunder, erwachsener Menschen, bei gemischter Nahrung, unter den — soweit uns bekannt — günstigsten Verhältnissen, kultivierbaren Bakterien, schwankt zwischen, um einen weiten Spielraum zu lassen, 100.000 und 700.000—800.000.

Vergleichen wir die Resultate der Kulturmethode mit dem, was wir in dem von denselben Fäzes, welche wir kultiviert haben, gemachten mikroskopischen Präparate wahrnehmen, so fallen zwei Umstände auf: 1°. In dem mikroskopischen Präparate sehen wir eine grosse Mannigfaltigkeit der Formen der Bakterien, welche gegen die gleichförmige Zusammensetzung der Kulturplatten stark kontrastiert. In den letzteren fast ausschliesslich Bakterien der Koligruppe; in dem mikroskopischen Präparate dagegen neben Formen, die mit der Form der Kolibakterien ganz übereinstimmen, zahlreiche andere Formen.

2°. Sogar schon bei sehr oberflächlicher Betrachtung zeigt sich, dass die Zahl der in den mikroskopischen Präparaten wahrzunehmenden Bakterien viel grösser ist, als die Zahl der Kolonien, die sich aus derselben Quantität Fäzes, woraus das Präparat gemacht wurde, auf den Platten entwickelten. Von den Bakterien, welche mikroskopisch den Kolitypus zeigen, hat nur ein ganz kleiner Teil Kolonien geliefert; von den übrigen Bakterienformen, die man in dem mikroskopischen Felde vertreten sieht, nur wenige.

Für die Bestimmung der Mengen der Fäzesbakterien interes-

siert uns hier nur der zweite Umstand: wir finden durch die Kulturmethoden nur eine sehr kleine Fraktion der in den Fäzes vorhandenen Bakterien; die Kulturmethoden sind mithin für die Bestimmung der Gesamtzahl der in den Fäzes vorhandenen Bakterien nicht geeignet. Dass diese Kulturmethoden jedoch nach andern Seiten hin, und dabei auch nicht selten in quantitativem Sinne, von grosser Bedeutung sind, braucht wohl kaum erwähnt zu werden.

Schon EBERLE 1) hat versucht mittels Zählung des mikroskopischen Präparats die genaue Zahl der Bakterien zu bestimmen, und obgleich seine Methodik ganz unzulänglich war, konnte er doch schon zu dem Schlusse kommen, dass höchstens 4.5—10.6 % der in den Fäzes vorhandenen Bakterien auf den Platten zur Entwicklung kommt.

Nachdem einer 2) der Unsrigen die mikroskopische Zählungsmethode eingeführt hatte, die auf der Färbung der Bakterien im feuchten Zustande 3) basiert ist, liess sich diese Methode auch bei der Bestimmung der Bakterienmengen in Fäzes 4) verwerten. Die Ausführung geschieht in nachfolgender Weise:

Von den Fäzes, die sich in möglichst frischem Zustande befinden, wird 10 G abgewogen, welches in einem sterilisierten Mörser unter fraktionierter Hinzufügung von 100 ccm sterilisierter, physiol. Kochsalzlösung mittels einer sterilisierten Keule längere Zeit verrieben wird. Ist auf diese Weise in dem Mörser eine genügende Zerteilung erreicht, so bringt man 10 ccm dieser Emulsion in einen sterilisierten Kolben, in welchem sich eine grosse Anzahl sterilisierter Porzellankügelchen befinden; unter allmählicher Hinzufügung von 190 ccm sterilisierter Salzlösung wird der Kolben geraume Zeit geschüttelt. Auf diese Weise erhält man eine gleichmässige Emulsion, welche einer Verdünnung der Fäzes von 1 : 200 entspricht. Von dieser Emulsion werden die Zählungspräparate gemacht.

Eine bekannte Quantität, z. B. $\frac{1}{2}$ ccm, dieser Emulsion, wird in ein Uhrglas gebracht; mit derselben Pipette wird $\frac{1}{2}$ ccm einer frisch hergestellten Anilinwasserlösung von Methylviolett

1) EBERLE. Zentralblatt f. Bakt. und Parasitenkunde, Abt. I, 19.

2) A. KLEIN. Ebenda, Abt. I, 27.

3) A. KLEIN. Ebenda, Abt. I, 25.

4) A. KLEIN. Archiv für Hygiene, 45.

(Dahlia), welche vorher filtriert ist, der Emulsion in dem Uhrglase hinzugefügt; die Flüssigkeiten werden mit einer starken Platinöse gemischt und das Uhrglas mit einem zweiten, etwas grösseren Uhrglase bedeckt, um Verdunstung zu verhüten. Nach 2 Min. ist die Färbung der Bakterien zu stande gekommen. Auf ein gut gereinigtes und vollständig entfettetes Deckgläschen von z. B. 15 mm Diameter, wird nun eine kleine Platinöse einer geschmolzenen, aber wieder genügend abgekühlten, vollkommen klaren, neutralisierten, 5 %-igen wässrigen Gelatine-lösung deponiert. Nach genügendem Umrühren der Farbstoff-Bakterienemulsion wird mit einer Platinöse von bekannter Kapazität eine kleine Menge dieser Emulsion (0.8—1.5 mgr) in den Tropfen flüssiger Gelatine transferiert, damit gemischt, und dann das Ganze mit Hilfe der Platinöse über die Oberfläche des Deckgläschens so gleichmässig möglich ausgestrichen. Nach dem Trocknen wird das Präparat weder flambiert, noch in Wasser ausgespült, sondern sogleich in neutralreagierenden Xylol-Kanadabalsam eingeschmolzen. Man macht 2 solche Präparate und zählt in jedem 50 Gesichtsfelder. Kennt man die Grösse des Gesichtsfeldes, so ist jetzt die in 1 mgr der frischen Fäzes vorhandenen Bakterienmenge leicht zu berechnen. Nach genügender Übung kann die ganze Bestimmung in etwa $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden beendet sein.

Die amerikanischen Untersucher MACNEAL, LATZER und KERR 1), die auch nach unserer Methode die Bakterienmengen in menschlichen Fäzes bestimmten, mischen in einer Flasche $2\frac{1}{2}$ ccm der Fäzesemulsion (1 : 100), 2 ccm einer Anilinwassergentiana-violettlösung und $\frac{1}{2}$ ccm geschmolzene Nährgelatine sofort zusammen, und machen aus dieser Flüssigkeit nach 3—5 Min. die mikroskopischen Präparate; ein besonderer Vor- oder Nachteil ist mit dieser Arbeitsweise nicht verbunden.

Die Zählung der Fäzespräparate bietet im allgemeinen keine grösseren Schwierigkeiten als die Zählung der aus Bakterien-reinkulturen gemachten Präparate. Nach genügender Übung ist die Unterscheidung der Bakterien von der Detritusmasse der Fäzes ohne Schwierigkeit möglich; auch in den Verbänden lassen sich die einzelnen Organismen sehr scharf von einander

1) MACNEAL, LATZER und KERR. The Journal of Infectious Disaeses, 6, p 123.

unterscheiden. In den durch Detritusmasse zusammengehaltenen Bakterienkonglomeraten, deren man, trotz aller Anstrengung für eine feine Zerteilung der Emulsion, immer noch eine gewisse Anzahl in den Fäzespräparaten findet, sind in weitaus den meisten Fällen die einzelnen Individuen genau zu zählen. Nur in einzelnen Häufchen können die Bakterien so dicht beisammen liegen, dass eine Zählung unmöglich wird; solche Häufchen finden sich aber nur ausnahmsweise.

Dass lange Bakterien in dem Mörser zerrieben werden könnten, wie SATO 1) meint, können wir ausser Betracht lassen. Ebenso merkwürdig ist eine andere Äusserung dieses Autors. Die Ungenauigkeit der mikroskopischen Zählungsmethode sollte sich nämlich daraus ergeben, dass die Resultate, welche die verschiedenen Untersucher mit dieser Methode in Fäzes erzielten, weit auseinander gehen, worauf SATO sofort folgen lässt: „auch bei Berücksichtigung des Umstandes, dass der ursprüngliche Bakteriengehalt der verschiedenen Fäzes selbstverständlich sehr schwankend ist.“ Letzteres kann man dem Autor natürlich zugeben; aber die Ungenauigkeit der mikroskopischen Zählungsmethode würde dann u. E. besser an den Tag treten, wenn die verschiedenen Untersucher, welche die mikroskopische Zählungsmethode zur Bestimmung der Bakterienmengen in Fäzes anwendeten, eben nicht auseinandergehende, sondern ungefähr gleiche Resultate erzielt hätten.

Einige Autoren (STRASBURGER 2), SATO) haben gegen die mikroskopische Zählungsmethode das Bedenken geäussert, dass der Fehler, den man bei der Zählung macht, so bedeutend vergrössert wird; man zählt doch schliesslich nur die Bakterienmenge in einer sehr kleinen Quantität der Fäzes und muss für die Berechnung der Menge per 1 mgr Fäzes mit einer sehr grossen Zahl multiplizieren. Das ist ohne Zweifel richtig. Aber wo es sich um die Bestimmung solcher grossen Bakterienmengen handelt als in 1 mgr frischen Fäzes sich vorfinden, sind Fehler bei jeder Methode, welche man auch immer anwendet, unvermeidlich. Hauptsache aber ist, dass die Fehler einer Methode innerhalb nicht allzu weiter und genau umschriebener Grenzen bleiben. Seinerzeit haben wir die Fehlergrenzen der mikroskopischen Zählungs-

1) SATO. Zeitschr. für experimentelle Pathologie und Therapie, 7.

2) STRASBURGER. Zeitschr. für klin. Medzin., 46, S. 413.

methode von einem unserer Amsterdamer Schüler, Dr. HEHEWERTH 1), in ausführlichen Untersuchungen feststellen lassen. Dr. HEHEWERTH hat die Zählungsmethode verglichen mit der Kulturmethode, und dafür Kulturen gewählt, welche ausschliesslich lebende Individuen enthalten, z. B. Bouillonkulturen von *B. Coli*, welche jünger sind als 24 Stunden. Diese Bestimmungen lehrten, dass die mikroskopische Zählungsmethode in dergleichen Kulturen regelmässig eine grössere Anzahl ergibt als die Kulturmethode; der Unterschied beträgt durchschnittlich gut 40 %. Die Ursache dieser Differenz liegt in dem Umstande, dass mehrere Bakterien, die zu einem Verbände vereinigt sind, oder die sehr dicht beisammen liegen, nicht mehr als *eine* Kolonie bilden, während sie mikroskopisch einzeln gezählt werden. Zählt man die Verbände als Gruppen, welche nur eine einzelne Kolonie liefern können, so findet man in jungen Kulturen von *B. Coli* und *Bac. Typhosus* auf mikroskopischem Wege eine Zahl, die mit der Kulturmethode völlig übereinstimmt. Ganz in Einklang hiermit sind denn auch bei solchen Organismen, welche immer grössere Verbände bilden — Staphylokokken, Streptokokken — die Differenzen zwischen beiden Methoden weit grösser. Man sieht in den Zählungspräparaten die einzelnen Organismen der Verbände ebenso scharf begrenzt, und durch ebenso deutliche weisse Linien von einander getrennt, als in den auf die gewöhnliche Weise hergestellten und daher mit Wasser ausgespülten Präparaten. Es zeigte sich also, dass der Grad der Genauigkeit der mikroskopischen Zählungsmethode ein sehr hoher ist.

Mit Hilfe der mikroskopischen Zählungsmethode konnte einer 2) der Unsrigen in einer Reihe von Bestimmungen feststellen, dass in 1 mgr frischen Fäzes erwachsener Menschen mit gemischter Nahrung, maximal 165.614.000, minimal 20.162.000 und durchschnittlich 58.800.000 Bakterien vorhanden waren. MACNEAL, LATZER, und KERR 3) fanden nach unserer Methode ein Maximum von 816 Millionen, ein Minimum von 124 Millionen und eine Durchschnittszahl von 375.000.000 Bakterien per mgr der frischen Fäzes.

1) HEHEWERTH. Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von A. KLEIN und einige Anwendungen derselben. Archiv für Hygiene, 39.

2) A. KLEIN. L. c.

3) MACNEAL, LATZER und KERR. L. c.

Ebenso wie die durch die Kulturmethoden erlangten Resultate, gehen auch die durch mikroskopische Zählung gefundenen Zahlen sehr bedeutend auseinander. Die durch mikroskopische Zählung gefundenen Zahlen übertreffen aber sehr weit die, welche durch die Kulturmethode erhalten werden: bei der Kulturmethode höchstens 100.000—800.000, bei der mikroskopischen Zählungsmethode 58—375 Millionen Bakterien als Durchschnittszahl in 1 mgr frischen Fäzes.

STRASBURGER 1) und seine Schule 2) sind aber der Meinung, dass auch diese hohen Werte, durch die mikroskopische Zählungsmethode gefunden, noch viel zu niedrig sind: in den menschlichen Fäzes seien noch viel mehr Bakterien vorhanden. Ihre Meinung ist dabei basiert auf den Resultaten, die sie erzielten mit einer dritten Methode zur Bestimmung des Bakteriengehalts in menschlichen Fäzes, der von STRASBURGER angegebenen gravimetrischen oder Wägungsmethode. Das Prinzip dieser Methode ist sehr einfach: aus einer bekannten Quantität Fäzes werden die Bakterien isoliert, getrocknet und gewogen. Die Ausführung ist weniger einfach. Nach der ursprünglichen Angabe STRASBURGERS 3) werden 2 ccm Fäzes in einem Mörser mit 30 ccm 0.5%-iger Salzsäure verrieben, und die erhaltene Emulsion eine Minute lang zentrifugiert (± 2000 Umdrehungen in der Minute). Im Zusammenhange mit dem Unterschiede an Gewicht und Grösse der suspendierten Teilchen, treten in dem Sediment hauptsächlich Kotbestandteile, in der Flüssigkeit der Hauptsache nach die Bakterien auf. Die obenstehende Flüssigkeit wird abpipettiert. Da das Sediment auch noch Bakterien enthält, wird es aufs neue mit 30 ccm 0.5 %-iger Salzsäure verrieben und darauf wieder zentrifugiert. Die abpipettierte Flüssigkeit wird der früher erhaltenen hinzugefügt, das Sediment noch einmal ausgewaschen, u. s. w., bis die Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren nur noch mässig getrübt erscheint; im Ganzen

1) STRASBURGER. L. c.

SCHMIDT und STRASBURGER. Die Fäzes der Menschen im normalen und krankhaften Zustande. Berlin, 1910, 3e Auflage.

2) SATO. L. c.

BERGER und TSUCHIYA. Zeitschr. f. experimentelle Path. und Ther. 7, S. 437. EHRENPFORDT. Ebenda, 7, S. 454.

3) STRASBURGER, Zeitschr. f. klin. Medizin, 46, Sonderabdruck S. 6—10.

ist gewöhnlich eine vierfache Auswaschung genügend. Die gesamte bakterienhaltige Flüssigkeit wird schliesslich noch einmal mit einer geringen Anzahl Umdrehungen ausgeschleudert, um noch vorhandene gröbere Bestandteile zu entfernen.

Der bakterienhaltigen Flüssigkeit wird darauf 96 proz. Alkohol hinzugefügt, die ganze Masse wird auf einem Wasserbad von 40° C. während 24 Stunden teilweise eingeengt, dann wird nochmals mit 96 proz. Alkohol versetzt, und schliesslich werden durch Zentrifugierung die Bakterien aus dieser alkoholhaltigen Flüssigkeit niedergeschlagen. Nach Entfernung der obenstehenden Flüssigkeit wird das Bakteriensediment mit absolutem Alkohol ausgewaschen, der Alkohol durch Äther ersetzt, und den folgenden Tag der Äther entfernt, alles durch Zentrifugieren. Der entfettete Bakterienbodensatz wird dann mit ein wenig Alkohol in einem Porzellanschälchen von bekanntem Gewicht auf einem Wasserbad von 40° C. und darauf im Exsikkator getrocknet und gewogen. Ist daneben die Trockensubstanz der Fäzes bestimmt, so kann der Prozentgehalt der Kottrockensubstanz an trockenen Bakterien berechnet werden.

Die ganze Bestimmung nimmt einige Tage in Anspruch.

STRASBURGER fand nun mit Hilfe dieser Methode, dass durchschnittlich 29.6 % der Kottrockensubstanz gesunder, erwachsener Menschen aus trockenen Bakterien besteht. Zur Vergleichung seiner Methode mit der mikroskopischen Zählungsmethode berechnet STRASBURGER dann die Zahl der Bakterien aus der gewogenen Quantität der trockenen Bakterien. Für diese Berechnung nimmt er an, dass die grosse Masse der Fäzesbakterien aus *Bact. coli commune* besteht. Er nimmt weiter an, dass das Volumen dieser Bakterie gefunden werden kann, indem man den Inhalt eines Zylinders berechnet, dessen Länge und Durchmesser 2 μ und $\frac{1}{2}$ μ betragen. Schliesslich wird das spezifische Gewicht der feuchten Bakteriensubstanz auf 1.054 und der Trockensubstanzgehalt der Bakterien auf 15 % angesetzt. Auf Grund all dieser Annahmen kommt STRASBURGER zu dem Schlusse, dass mit den Fäzes eines Erwachsenen unter normalen Verhältnissen täglich 128 Billionen Bakterien ausgeschieden werden, eine Zahl, die weit höher ist als die mit der mikroskopischen Zählungsmethode gefundene.

Eine Umrechnung der Gewichte, wie STRASBURGER diese findet,

in Zahlen, wie sie die mikroskopische Zählungsmethode liefert, ist aber nicht zulässig, da diese Umrechnung auf ganz willkürlichen Faktoren, wie die Formen der Bakterien, ihre Grösse, das spezifische Gewicht und der Trockensubstanzgehalt der Bakterien, basiert ist. Als Beispiel nehmen wir nur einen dieser Faktoren: die Grösse der Bakterien. Mit STRASBURGER wollen wir einen Augenblick annehmen, dass alle Fäzesbakterien aus Kolibazillen bestehen, obgleich bei mikroskopischer Zählung noch nicht die Hälfte den Kolitypus aufweist. Die Durchschnittsgrösse dieses Organismus ist, ebenso wie die jeder andern Bakterienart, nicht konstant, weder in derselben Kultur, noch in verschiedenen Kulturen; das Alter der Kultur, die Beschaffenheit und Reaktion des Nährbodens, die Kultivierungstemperatur, etc. üben Einfluss auf die Durchschnittsgrösse. KRUSE 1) gibt für *B. Coli* 0.4—0.7 μ Diameter und 1—3 μ Länge an; GÜNTHER 2) 0.8 μ und 1—3 μ ; MACNEAL, LATZER und KERR 3) nehmen für den Kolitypus 0.4—0.9 μ Diameter und 1—2.5 μ Länge an. Mit ebenso viel Recht — eigentlich besser gesagt, mit ebenso wenig Recht, — als womit STRASBURGER die Grösse der Fäzesbakterien auf durchschnittlich 2 μ Länge und 0.5 μ Diameter ansetzt, können wir eine Durchschnittsgrösse von z.B. 2 μ Länge und 1 μ Diameter zugrunde legen. Diese Differenz von 0.5 μ Diameter ist aber, wenn wir übrigens dieselben willkürlichen Verhältnisse für spezifisches Gewicht, u. s. w. annehmen als STRASBURGER, schon Ursache, dass die von STRASBURGER aus seinen Gewichten berechnete Bakterienzahl bis auf $\frac{1}{4}$ sinkt, also von 128 Billionen auf 32 Billionen Bakterien pro Tag!

Eine Umrechnung, wie sie STRASBURGER ausführt, kann daher höchstens eine illustrative Bedeutung haben, aber sie kann ganz gewiss nicht für eine wissenschaftliche Vergleichung der STRASBURGERSchen Methode mit der mikroskopischen Zählungsmethode gebraucht werden.

Die Resultate, welche verschiedene Autoren mit der STRASBURGERSchen Methode erhielten, sind in Tabelle I im Durch-

1) KRUSE in Flügge, Die Mikroorganismen. Leipzig, 1896.

2) GÜNTHER, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig, 1906.

3) MACNEAL, LATZER und KERR. L.C.

schnittsprozentgehalt der Kottrockensubstanz an trockenen Bakterien zusammengefasst.

TABELLE I.

SCHITTENHELM und TOLLENS 1)	42.8 ‰
STRASBURGER 2)	29.6 ‰
MATTILL und HAWK 3)	27.95 ‰
MACNEAL, LATZER und KERR 4)	26.9 ‰
SATO 5)	24.39 ‰
STEELE 6)	19.1 ‰
BERGER und TSUCHIYA 7)	12.6 ‰
TOSAYA 8)	11.22 ‰
LISSAUER 9)	8.67 ‰

Hierbei wollen wir bemerken, dass SCHITTENHELM und TOLLENS den Bakteriengehalt nur eines einzelnen Kotes bestimmten, und dabei 42.8 ‰ trockene Bakterien in trockenen Fäzes fanden.

MATTILL und HAWK wogen nicht die trockenen Bakterien, sondern bestimmten nach KJELDAHL den N-Gehalt des Bakterien-sediments der alkoholischen Flüssigkeit, und berechneten daraus die Quantität der trockenen Bakterien, indem sie annahmen, das die trockenen Bakterien 10.96 ‰ N enthielten.

Auffallend sind die sehr weit auseinandergehenden Resultate der verschiedenen Autoren. Der Diätunterschied kann gewiss nicht von Einfluss sein. STRASBURGER, der einen hohen Wert fand, untersuchte die Fäzes von Menschen, die ungefähr dieselbe Nahrung bekamen, als die von BERGER und TSUCHIYA, die einen niederen Prozentsatz angeben; SATO erhielt einen hohen Durchschnittsprozentgehalt, während TOSAYA eine niedrige Ziffer fand, obgleich bei beiden die Probemenschen ungefähr die gleiche japanische Kost einnahmen.

Noch mehr aber fällt die Tatsache auf, dass ein Teil der

-
- 1) SCHITTENHELM und TOLLENS. Zentralblatt für innere Medizin, 25.
 - 2) STRASBURGER. L.C.
 - 3) MATTILL und HAWK. The Journal of experimental medicine, 14.
 - 4) MACNEAL, LATZER und KERR. L.C.
 - 5) SATO. L.C.
 - 6) STEELE. Zitiert bei MATTILL und HAWK.
 - 7) BERGER und TSUCHIYA. L.C.
 - 8) TOSAYA. Zitiert bei SATO.
 - 9) LISSAUER. Archiv für Hygiene, 58.

Forscher in ihren Einzelbestimmungen, innerhalb gewisser variierender Grenzen, regelmässig niedrige, ein anderer Teil stets hohe Werte fand. Die Ursache hiervon kann allein in der Methodik liegen, da jeder einzelne Untersucher selbstverständlich stets dieselbe Art und Weise der Ausführung anwendet.

EHRENPFORDT 1), aus dem Laboratorim SCHMIDTS, des Mitarbeiters STRASBURGERS, meint, dass die Differenzen durch den Unterschied der angewandten Zentrifugalkraft entstehen. Zwei Proben derselben Fäzesart werden von ihm auf verschiedene Weise behandelt. Die Fäzesemulsion der einen Probe wird jedesmal während 2 Min., die der anderen jedesmal während 10 Min. zentrifugiert, mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1500 Touren in der Minute. Die gesamte bakterienhaltige Flüssigkeit wird, im Gegensatz zu STRASBURGERS Verfahren, während 5 Min. mit einer grösseren Umdrehungsgeschwindigkeit (nämlich 2000 per Minute) zentrifugiert, und das so gebildete zweite Fäzesediment nochmals 3—4 Mal ausgewaschen (mit 30 ccm 0.5 % iger Salzsäure) mit einer geringeren Umdrehungsgeschwindigkeit (1500 per Minute), um niedergeschlagene Bakterien wieder in die Flüssigkeit zurückzubringen.

Bei der 2 Min.-Methode fand EHRENPFORDT wenig Bakterien in den beiden ausgewaschenen Kotsedimenten zurück, dagegen viel beigemischte Fäzesverunreinigungen in den Bakteriensedimenten, die also mit Unrecht als Bakterien mitgewogen werden; bei der 10 Min.-Methode wurden mehr Bakterien in den Fäzesedimenten angetroffen, die also für die Bakterienwägung verloren gingen, dagegen weniger Verunreinigungen in den Bakteriensedimenten. Im ersten Falle fand er hohe Werte für die trockenen Bakterien, durchschnittlich 25.31 %; in letzterem Falle niedrige Werte, durchschnittlich 14.75 % trockene Bakterien in trockenen Fäzes. Das erstere Ergebnis hält EHRENPFORDT für zu hoch, letzteres für zu niedrig; der richtige Wert liegt nach EHRENPFORDT in der Mitte zwischen beiden, beträgt daher etwa 20 %. Um möglichst richtige Werte zu erhalten, empfiehlt EHRENPFORDT schliesslich, nicht 2 oder 10 Minuten, sondern jedesmal 5 Minuten auszuschleudern. STRASBURGER erkennt jetzt diesen Fehler in der Methodik an, auf

1) EHRENPFORDT. L. c.

welchen unerseits 1) schon einige Jahre bevor noch die EHRENFORDT'schen Untersuchungen stattfanden, die Aufmerksamkeit gelenkt wurde. STRASBURGER übernimmt die nach EHRENFORDT geänderte, in der Ausführung noch weiter komplizierte Methodik, in der dritten Auflage seines mit SCHMIDT geschriebenen Werkes 2). Indessen ist hiermit der ursprüngliche, von STRASBURGER angegebene Wert nicht unbeträchtlich, näml. von 29.6 % bis auf 20 % trockene Bakterien in Kottrockensubstanz herabgesunken. Und damit sind natürlich ebenfalls die von STRASBURGER aus den Gewichten der trockenen Bakterien berechneten Zahlen, wenn schon solche Umrechnungen zulässig wären, sehr wesentlich kleiner geworden.

Die Kontrollen, die sowohl EHRENFORDT wie STRASBURGER bei der Ausführung der Wägungsmethode machten, müssen völlig ungenügend genannt werden. Das Prinzip der STRASBURGERSchen Methode doch ist hierauf basiert, dass die Bakterien soviel möglich von den übrigen Fäzesbestandteilen getrennt werden, und der Grad der Genauigkeit der Methode wird daher ganz durch die Frage beherrscht, inwiefern schliesslich in dem Bakteriensediment auf der einen Seite *alle* in einer bestimmten Quantität Fäzes vorhandenen Bakterien gewogen werden, und auf der anderen Seite in dem Bakteriensediment keine Kotbestandteile *nicht*-bakterieller Art als Bakterien mitgewogen werden. EHRENFORDT und STRASBURGER führen diese Kontrollen aus, indem sie von den Fäzessedimenten und den Bakteriensedimenten hängende Tropfen machen, oder die Flüssigkeit einfach zwischen Deckgläschen und Objektträger ausbreiten und dann mikroskopisch untersuchen, ob in den Fäzessedimenten noch Bakterien, in den Bakteriensedimenten noch andere Bestandteile als Bakterien vorhanden sind.

Wenn man von einer Fäzesemulsion oder von den nach der STRASBURGERSchen Methode abgesonderten trockenen Bakterien ein gefärbtes Präparat macht, so sieht man immer noch eine grosse Anzahl Bakterien in Häufchen beisammen liegen. Welche Methode man auch anwendet, um die Fäzes fein zu zerteilen, es gelingt nicht, alle die Konglomerate von Bakterien auseinander-

1) A. KLEIN. Zeitschrift für klin. Medizin, 48.

2) SCHMIDT und STRASBURGER. L. c.

fallen zu lassen; die Bakterien werden in vielen dieser Konglomerate durch die Zwischensubstanz so innig zusammengehalten, dass es nicht gelingt, sie zu isolieren. Eine Anzahl dieser Häufchen sind ohne Zweifel so schwer, dass sie beim Zentrifugieren in die Fäzessedimente übergehen müssen, während anderseits kleinere Kotbestandteile nicht-bakterieller Art sicher viel leichter sind als diese Bakterienkonglomerate und in den Bakteriensedimenten zurückbleiben werden. Und von den Bakterienhäufchen, die sich in dem Bakteriensediment befinden, ist es unmöglich anzugeben, welcher Teil des Gesamtgewichts dieser Häufchen von den Bakterienkörpern und welcher Teil von den übrigen Substanzen der Häufchen gebildet wird. Schon die mikroskopische Beobachtung des gefärbten Präparats lehrt, dass es unmöglich sein muss, die Bakterien auf einfach mechanischem Wege in genügendem Maasse von den Fäzesbestandteilen zu trennen.

Weiter wollen wir noch darauf hinweisen, dass lösliche Nukleoproteide, welche schon unter normalen Verhältnissen in wechselnden Quantitäten in den Fäzes vorhanden sind, durch den hinzugefügten Alkohol niederschlagen, und mit den trockenen Bakterien zusammengewogen werden; unter pathologischen Verhältnissen kann die Quantität dieser Nukleoproteide in den Fäzes beträchtlich grösser sein, und können daneben noch lösliche Eiweisse auftreten. Abgesehen noch von anderen, verunreinigenden stickstoffhaltigen Beimischungen, kann daher die N.-Bestimmung der Bakteriensedimente, welche man nach der STRASBURGERSchen Methode erhalten hat, nicht den richtigen Wert des in den Fäzes vorhandenen bakteriellen N. ergeben; eine unbekannte Quantität N. ist zu den trockenen Bakterien hinzugekommen, während ausserdem noch anderseits durch die vorangehende Behandlung mit Alkohol und Äther verschiedene lösliche N.-Verbindungen, wie Lezithin und andere Lipotide, aus den Bakterien extrahiert und entfernt sind. Noch weniger lassen sich aus den auf diese Weise gefundenen N.-Mengen, wie es MATTILL und HAWK tun, die Quantitäten der trockenen Bakterien berechnen, wenn auch diese Untersucher die Ätherextraktion umgehen, weil sie bei dieser Berechnung ausserdem noch einen ganz willkürlichen Durchschnittsgehalt an N. der Fäzesbakterien annehmen müssen.

An diese Betrachtungen anschliessend, haben wir in einer Reihe von Untersuchungen die STRASBURGERSche Methode einer mehr quantitativen Kontrolle unterzogen.

Von einer Anzahl Fäzes normaler Erwachsener mit gemischter Kost wurden die Quantitäten der trockenen Bakterien nach der STRASBURGERSchen Methode bestimmt, wobei den jüngsten Modifikationen dieser Methode, wie sie EHRENFORDT angegeben, bis in alle Einzelheiten möglichst genau nachgefolgt wurde. Die abgemessene Fäzesmenge (2 ccm) wurde in einem Mörser mit 30 ccm 0.5 %-iger Salzsäure verrieben und diese Emulsion 5 Minuten lang mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1400 in der Minute zentrifugiert; das Sediment wurde nach Entfernung der Flüssigkeit von neuem mit 30 ccm 0.5 %-iger Salzsäure verrieben und wieder ausgeschleudert (1400 Umdrehungen per Minute, 5 Minuten lang) u. s. w. Diese Prozedur wurde 6—7 mal wiederholt; die letzte Waschflüssigkeit war jedesmal noch leicht getrübt. Die gesamte bakterienhaltige Flüssigkeit wurde nun 5 Minuten lang zentrifugiert mit 1950 Umdrehungen per Minute. Das so gebildete zweite Sediment wurde wieder 4 mal mit 30 ccm 0.5 %-iger Salzsäure ausgewaschen (Zentrifugierung 5 Minuten, mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1400 per Minute); die letzte Waschflüssigkeit des zweiten Sediments wurde in allen Fällen fast vollkommen klar. Schliesslich wurde die zusammengegossene bakterienhaltige Flüssigkeit in der bekannten Weise nach STRASBURGER weiter verarbeitet.

Der Prozentgehalt trockener Fäzes an trockenen Bakterien schwankte in den verschiedenen Bestimmungen (Tabelle III, Spalte 4) zwischen 4.11 % und 23.39 %; der Durchschnittsprozentgehalt aller Bestimmungen betrug 13.94 %. Diese Durchschnittszahl bleibt also noch weit zurück hinter der, auf welche EHRENFORDT aus seinen beiden Bestimmungsgruppen schliesst, näml. 20 %; dieser Durchschnittsgehalt ist sogar noch etwas niedriger als der, den EHRENFORDT in seiner Gruppe der untersten Werte fand (Ausschleuderungszeit 10 Minuten).

Zunächst untersuchten wir nun, wieviel Bakterien in den Fäzesedimenten zurückbleiben, und mithin nicht mit dem Bakteriensediment als trockene Bakterien mitgewogen werden

Zu dem Ende wurde jedes der beiden Fäzesedimente ein-

zeln in Mörsern mit bekannten Mengen sterilisierter, physiologischer Salzlösung verrieben, und in Kolben mit Glaskügelchen zu gleichmässigen Emulsionen verarbeitet; von diesen Emulsionen wurden mikroskopische Zählungspräparate hergestellt, und die Zahl der darin befindlichen Bakterien bestimmt. Zur Vergleichung wurde von denselben Fäzes mittels der mikroskopischen Zählungsmethode die Gesamtmenge der vorhandenen Bakterien bestimmt. (Siehe Tabelle II).

Es zeigt sich (Spalten 6 und 10), dass in beiden Sedimenten eine sehr beträchtliche Bakterienzahl zurückbleibt. In Prozenten der Gesamtzahl der in den Fäzes vorhandenen Bakterien berechnet (Spalten 9 und 13), schwanken die zurückgebliebenen Bakterien in dem ersten Sediment zwischen einem Minimum von 12 % und einem Maximum von 25 %; im zweiten Sediment zwischen einem Minimum von 0.8 % und einem Maximum von 2.7 %. Ein grosser und wechselnder Bruchteil [in den beiden Sedimenten zusammenengenommen (Spalte 14) schwankend zwischen 12.5 % und 27.7 %] der Gesamtmenge der in den Fäzes vorhandenen Bakterien, wird in den Fäzessedimenten zurückgefunden, und geht daher für die Wägung der trockenen Bakterien verloren. Wie wir erwarteten, spielen hierbei die in den Fäzes befindlichen Konglomerate von Bakterien eine grosse Rolle: infolge ihres Gewichtes geraten sie beim Ausschleudern zum Teil in die Fäzessedimente. Die Zahl der Bakterienhäufchen ist in den verschiedenen Spalten (4, 7 und 11) auf 1000 vorhandenen Bakterien berechnet, also in einer Promillezahl angegeben. In den Zählungspräparaten der Fäzes schwankt diese Zahl zwischen einem Minimum von 4 ‰ und einem Maximum von 31 ‰, mit einer Durchschnittszahl in den sieben Bestimmungen von 15 ‰. In dem ersten Fäzessediment beträgt die Minimalzahl gegenüber der Gesamtmenge der in diesem Sediment vorhandenen Bakterien 21 ‰, das Maximum 60 ‰ mit einer Durchschnittszahl von 43 ‰. In dem zweiten Fäzessediment sind diese Zahlen 39 ‰ Minimum, 81 ‰ Maximum und 58 ‰ im Durchschnitt. Es besteht ein regelmässiges Verhältnis zwischen der Zahl der in den ursprünglichen Fäzes vorhandenen Bakterienkonglomerate und dem Gesamtprozent der Bakterien, das in den Fäzessedimenten zurückbleibt.

TABELLE II.

No.	FÄZES.				ERSTES FÄZESSEDIMENT.				ZWEITES FÄZESSEDIMENT.				Prozentgehalt der beiden Bodensätze zusammen zur Gesamtzahl der Fäzesbakterien. (14)
	(2) Gesamtzahl Bakterien in 2 cm ³ frischer Kot. × 10 ⁶ .	(3) Bakterienzahl in 1 cm ³ frischer Kot. × 10 ⁶ .	(4) Gehalt an Hautchen. 0/100	(5) Gehalt an Sporen. 0/100	(6) Gesamtzahl Bakterien. × 10 ⁶ .	(7) Gehalt an Hautchen. 0/100	(8) Gehalt an Sporen. 0/100	(9) Prozentgehalt zur Gesamtzahl der Fäzesbakterien.	(10) Gesamtzahl Bakterien. × 10 ⁶ .	(11) Gehalt an Hautchen. 0/100	(12) Gehalt an Sporen. 0/100	(13) Prozentgehalt zur Gesamtzahl der Fäzesbakterien.	
VII.	402.985	201	6	2.5	55.274	26	8	13.5	5.089	39	15	1.2	14.7
VIII.	268.330	134	4	3	31.257	21	14	12	3.836	42	29	1.5	13.5
IX.	342.470	171	10	0.6	51.241	43	7	15	2.517	55	17	0.8	15.8
X.	308.540	154	6	10	51.083	45	23	13	6.994	51	32	2.3	15.3
XI.	160.390	80	31	3	41.114	58	12	25	4.287	81	34	2.7	27.7
XII.	447.730	223	16	4	76.852	48	14	17	5.579	71	11	1.3	18.3
XIII.	195.280	98	30	8	42.331	60	11	21.5	4.536	70	41	2.3	23.8
Mittel.	303.675	151	15	4.5	49.878	43	13	16.7	4.691	58	26	1.7	18.4

Dauersporen, die schwerer sind als die Bakterien, zeigen ein ähnliches Verhalten wie die Bakterienhäufchen; sie sind in der Tabelle ebenfalls per 1000 vorhandene Bakterien angegeben (Spalten 5, 8 und 12). In den Zählungspräparaten der Fäzes beträgt die Zahl der Sporen durchschnittlich 4.5 ‰; im ersten Fäzessediment wird diese Durchschnittszahl 13 ‰, im zweiten 26 ‰.

Zweitens haben wir untersucht, welche Quantität verunreinigender Beimischungen sich in den Bakteriensedimenten vorfindet, und daher mit Unrecht als trockene Bakterien mitgewogen wird. Zu diesem Zwecke haben wir die Bakterien in den Bakteriensedimenten mittelst Antiformin aufgelöst und die zurückbleibenden Bestandteile nach Trocknung gewogen. Die Bakteriensedimente wurden in einem Mörser zu einem sehr feinen Pulver zerrieben; darauf wurde 10 ccm einer bestimmten Antiforminlösung hinzugefügt, die wir, unter beständigem Umrühren und Verreiben noch vorhandener Bröckchen, eine gewisse Zeit einwirken liessen. Nach dieser Zeit wurde ein Überschuss von sterilisiertem, destilliertem Wasser hinzugefügt, und eine halbe Stunde lang zentrifugiert mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 5000 in der Minute. Die obenstehende Flüssigkeit wurde ganz entfernt, und das Sediment, nachdem es nicht selten nochmals mit sterilisiertem, destilliertem Wasser ausgewaschen war, mit ein wenig Alkohol von 96 % in ein Porzellanschälchen von bekanntem Gewichte übergebracht, auf einem Wasserbad von 40° C. und im Exsikkator getrocknet und gewogen. Von den übrigbleibenden Sedimenten wurden stets gefärbte Präparate gemacht, um in diesen auf mikroskopischem Wege die völlige Abwesenheit von Bakterien zu konstatieren.

UHLENHUTH und XYLANDER 1) haben gezeigt, dass die Bakterien der Koli-Typhusgruppe in einer 5 %-igen Antiforminlösung nach 10—15 Min. vollständig aufgelöst werden. Liessen wir auf unsere Bakteriensedimente eine 5 %-ige Antiforminlösung während 15 Min. einwirken, so war zwar eine grosse Anzahl der Bakterien aufgelöst, aber es waren auch noch sehr viele zurückgeblieben. Auch war das noch der Fall, obwohl die Zahl der übrigbleibenden Bakterien kleiner geworden

1) UHLENHUTH und XYLANDER. Arbeiten aus dem Kais. Gesundh. Amt, 32.

war, wenn eine 10 %-ige Antiforminlösung während 15 Min. einwirkte. Erst eine 15 %-ige Antiforminlösung führte nach einer Einwirkungszeit von 15 Min. zu dem gewünschten Ziele: alle Bakterien waren ohne Ausnahme aufgelöst; in den mikroskopischen Präparaten waren keine Bakterien mehr zurückzufinden.

Diese starke Antiforminkonzentration ist nötig, um die Konglomerate aufzuschliessen und die darin befindlichen Bakterien für die Einwirkung des Antiformins zugänglich zu machen. Der Farbstoff der Fäzes, das Urobilin, löst sich in die grossen Alkoholquantitäten, mit denen die Bakteriensedimente bei der Trennung und Reinigung behandelt werden, auf; diese Alkoholflüssigkeit ist denn auch rot gefärbt. Dennoch haben die getrockneten Bakteriensedimente noch eine dunkelbraune bis schwarze Farbe, welche von dem Urobilin herrührt, das der Alkohol nicht extrahieren konnte. Dieses Urobilin kommt erst frei, nachdem die Bakterienkonglomerate unter dem Einfluss des Antiformins auseinanderfallen. Gebraucht man eine 5 %-ige Antiforminlösung, so wird diese Flüssigkeit hellrot gefärbt; die getrockneten Überreste sind ebenfalls noch gefärbt. Bei Verwendung einer 10 %-igen und 15 %-igen Antiforminlösung nimmt die Flüssigkeit eine intensiv rote Farbe an, während der zurückbleibende Überrest nach der Einwirkung einer 15 %-igen Lösung während 15 Minuten völlig entfärbt ist und eine grauweiße Farbe aufweist. Erst mit der vollständigen Vernichtung der Häufchen geht also alles Urobilin in die Antiforminlösung über, und erst dann sind alle Bakterien, die in den Häufchen enthalten waren, dem Antiformin zugänglich. Hieraus zeigt sich aufs neue, wie innig diese Häufchen zusammenhängen; es ist daher die Möglichkeit ganz ausgeschlossen auf einfach mechanischem Wege die Bakterien aus solchen Häufchen zu isolieren. (Siehe Tabelle III).

In der 5. Spalte der Tabelle findet man in mgr die Gewichte der Überreste, welche nach der Antiforminbehandlung zurückbleiben; in der letzten Spalte diese Gewichte in Prozenten der Quantität gewogener, trockener Bakterien angegeben: diese Prozentzahlen schwanken in den verschiedenen Bestimmungen zwischen 4 % und 25 %. Der Durchschnittsprozentgehalt trockener Fäzes an trockenen Bakterien sinkt dadurch von 13.94 % auf 12.35 % herab (Spalte 7).

TABELLE III.

No.	<i>Trockener Kot</i> in 2 ccm (mgr)	<i>Trackene</i> <i>Bakterien</i> in 2 ccm (mgr)	<i>Prozentgehalt</i> des Trockenkotes an trockenen Bakterien.	<i>Uebersrest</i> nach der Anti- forminbehandlung. (mgr)	<i>Reduziertes Gewicht</i> der trockenen Bakterien in 2 ccm (mgr)	<i>Reduzierter</i> <i>Prozentgehalt</i> des Trockenkotes an trockenen Bakterien.	<i>Prozentgehalt</i> der trockenen Bakterien an trockenem Anti- forminubersrest.
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
I	589.3	108.3	18.39	22.3	86	14.61	21
II	735.7	112.6	15.30	5.7	107.2	14.57	5
III	527.9	39.8	7.58	8.5	31.3	5.93	21
IV	716.6	48.2	6.73	7.0	41.2	5.75	15
V	559.5	109	19.66	7.5	101.5	18.14	7
VI	631.8	26	4.11	6.5	19.5	3.08	25
VII	489.4	73.8	15.08	2.5	71.3	14.57	4
VIII	445.2	62.3	13.99	4.2	58.1	13.05	7
IX	746.2	135.1	18.10	10.9	124.2	16.65	8
X	567.0	132.6	23.39	10.4	122.2	21.58	8
XI	475.6	67.7	14.23	9.4	58.3	12.26	14
XII	749.7	97.9	13.06	14.2	83.7	11.16	15
XIII	556.9	65.1	11.69	13.2	51.9	9.32	20
Mittel			13.94			12.35	13

Die gefundenen Werte der Antiforminüberreste stellen jedoch nur einen Bruchteil der in den Bakteriensedimenten vorhandenen beigemischten Verunreinigungen dar. Auch von diesen Verunreinigungen wird ja ein Teil in das 15 %-ige Antiformin aufgelöst. Wir sahen dies schon mit dem Urobilin geschehen, das mit den trockenen Bakterien mitgewogen wurde; ohne Zweifel werden auch noch andere verunreinigende Bestandteile der sehr fein zerteilten trockenen Bakterienmasse zur Auflösung gebracht, wodurch u. a. das Auseinanderfallen der Häufchen ermöglicht wird. Vorhandene Nukleoproteide werden gleichfalls zur Auflösung gebracht etc. In einigen Fällen gelang es auch nicht, den gesamten Antiforminüberrest zu versammeln; die Masse war nach der Antiforminbehandlung so schleimig geworden, dass die Flüssigkeit, auch nach sehr langem Ausschleudern mit grosser Umdrehungsgeschwindigkeit, nicht völlig klar wurde; wir mussten uns in solchen Fällen mit dem nur teilweise sedimentierten Antiforminüberreste begnügen. Die von uns gefundenen Werte stellen mithin nur Minimalwerte dar; die wirklichen Quantitäten beigemischter Verunreinigungen in den Bakteriensedimenten sind ohne Zweifel noch viel grösser.

Wir sehen also wie bei der Anwendung der STRASBURGERschen Methode, ausgeführt nach den jüngsten von EHRENFORDT angegebenen Modifikationen, auf der einen Seite ein grosser und wechselnder Bruchteil der Fäzesbakterien in den Fäzessedimenten zurückbleibt und für die Wägung der Bakterien verloren geht; andererseits sehen wir, wie in den Bakteriensedimenten ohne Ausnahme eine grosse und wechselnde Quantität beigemischter Verunreinigungen vorkommt, die mit Unrecht als trockene Bakterien mitgewogen wird. Die Wägungsmethode nach STRASBURGER ist mithin nicht im stande, die Gewichte der trockenen Bakterien in einer bestimmten Quantität Fäzes auch nur annähernd festzustellen.

STRASBURGER hat mit Hilfe seiner Methode auch eine Reihe Bestimmungen in pathologischen Fällen ausgeführt und auf Grund der erlangten Resultate weitreichende Schlüsse gezogen in Bezug auf die Pathogenese einiger Störungen im Darmkanal. So fand er bei chronischen Darmstörungen mit Fäulnis oder Gärung der Fäzes, ohne dass stärkere Diarrhoen bestanden, stets

eine Vermehrung der ausgeschiedenen Bakterienmenge. Diese Störungen sind immer verbunden mit einer schlechteren Ausnützung der Nahrung im Darmkanal: es sind viel mehr Speisereste in den Fäzes vorhanden als normal. STRASBURGER will es hier dahingestellt lassen, ob die schlechtere Ausnützung der Nahrung das primäre Moment ist und hierdurch den Bakterien mehr Nahrungsmaterial geboten wird, wodurch eine stärkere Vermehrung dieser Organismen zu stande käme, oder ob der Darm primär durch die Bakterien geschädigt wird, und infolgedessen die Verdauung und Resorption der Nährstoffe leidet. Nach ihm findet wahrscheinlich beides zugleich statt.

Bei habitueller Obstipation fand er stets eine Verminderung der Quantität ausgeschiedener Bakterien. Bei dieser Störung kommt eine bessere Ausnützung der Nahrung zu stande; viel weniger Nahrungsreste lassen sich bei mikroskopischer Untersuchung in den Fäzes nachweisen als unter normalen Bedingungen. STRASBURGER ist der Ansicht, dass hier die verbesserte Ausnützung der Nahrung das primäre Moment ist; dadurch ist weniger Nahrungsmaterial für die Bakterien vorhanden, sie vermehren sich weniger stark, es entstehen weniger Umsetzungsprodukte der Bakterien, und so fällt nach STRASBURGER ein normales Moment, ein physiologischer Reiz, für die Anregung der Darmperistaltik aus; daher die Obstipation. Dieser Zusammenhang ist ganz gewiss nicht richtig. Wenn die Fäzes eines an habitueller Obstipation leidenden Patienten in einem genügend verdünnten Zustand bei 37° C. aufbewahrt werden, so tritt eine starke Vermehrung der Fäzesbakterien auf; das aus dem Darmkanal übriggebliebene Nahrungsmaterial wird also noch stark verdünnt, und trotzdem sehen wir, dass noch eine genügende Quantität vorhanden ist, um eine beträchtliche Vermehrung der lebenden Kotbakterien zu stande kommen zu lassen.

Ausserdem müssen die Ergebnisse STRASBURGERS in einer ganz anderen Weise gedeutet werden. Bei chronischen Darmstörungen, mit einer schlechteren Ausnützung der Nahrung, wiegt STRASBURGER mit seinen trockenen Bakterien eine grosse Menge Beimischungen; bei habitueller Obstipation, mit weniger Nahrungsresten in den Fäzes, eine kleinere Quantität beigemischter Verunreinigungen. Diese Auffassung erklärt zugleich die regelmässigen Ergebnisse: bei den chronischen Darmstörungen stets

mehr, bei habitueller Obstipation stets weniger trockene Bakterien als normal.

Auf ganz dieselbe Weise sind die kleineren Gewichte zu erklären, die STRASBURGER bei leicht assimilierbarer Kost, oder bei Verminderung der Quantität der zugeführten Nahrung, beim Hungern, findet; diese kleineren Zahlen finden nicht, wie S. meint, ihren Grund in einer geringeren Bakterienvermehrung, infolge des Fehlens einer genügenden Quantität Nahrungsmaterial, sondern sie sind die Folge der geringeren Menge verunreinigender Beimischungen in der von ihm gewogenen Masse.

Für das experimentelle Studium der Darmantiseptis hat sich, die STRASBURGERSche Methode ebenfalls völlig unzureichend gezeigt. STRASBURGER und SCHÖNEBORN, und FEIGEN finden z. B. bei dem Kalomel, dem klassischen Darmantiseptikum, eine Vermehrung der ausgeschiedenen Bakterienmenge, BERGER und TSUCHIYA dagegen eine Verminderung.

Zusammenfassung.

1^o. Die Kulturmethode kann nur einen sehr kleinen und überdies noch stark wechselnden *Bruchteil* der in den menschlichen Fäzes vorhandenen Bakterien nachweisen.

2^o. Die Wägungsmethode nach STRASBURGER ist *ungeeignet* zur Bestimmung der Bakterienmenge in menschlichen Fäzes; die mit dieser Methode gefundenen Resultate und die auf diesen beruhenden Schlüsse sind unrichtig.

3^o. Die mikroskopische Zählungsmethode 1) ist bis jetzt die einzig richtige Methode, um die *Gesamtzahl* der in den menschlichen Fäzes vorhandenen Bakterien kennen zu lernen

1) Die mikroskopische Zählungsmethode, auf der Färbung der Bakterien im feuchten Zustande basiert, wurde kürzlich aufs neue erfunden von OLAV SKAR (Milchwirtschaftliches Zentralblatt, 41), zur Bestimmung der Bakterienmenge in Milch; auch PAUL TH. MÜLLER benutzt die mikroskopische Zählungsmethode zur Bestimmung der Bakterienzahl in Wasser; das Neue in MÜLLERS Methode ist die Konzentrierung der Bakterien im Wasser (Münchener med. Wochenschrift 1911; Archiv für Hygiene, 75).

EINE FÜR DIE PRAXIS BRAUCHBARE AKTIVE IMMUNITÄT, ERREGT DURCH SERUMIMPfung, VEREINIGT MIT NATÜRLICHER INFEKTION,

VON

Prof. Dr. J. POELS,

Direktor des Reichsseruminstituts in Rotterdam.

Es ist schon lang eine konstatierte Tatsache, dass man Tiere zur Produktion von Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen anregen kann, mittels parenteraler Einspritzung dieses Antigens.

Diese Einspritzung findet in den Serumanstalten hauptsächlich subkutan oder intravenös statt. Es ist unter andern, um ein Beispiel zu nennen, bekannt, dass Pferde, oder andere Tiere, welche in steigende Dosis mit Diphtherietoxin derartig behandelt werden, schliesslich ein Serum produzieren, das reich an Antitoxin ist, und nicht geringen therapeutischen Wert besitzt, aber auch präventiv in Anwendung kommt.

Die Bildung des Antitoxins gründet sich, der Theorie EHRLICHS gemäss, auf die Eigenschaft des Diphtherietoxins, einen Defekt hervorzurufen in die Rezeptoren bestimmter Zellen, welche Zellen darauf reagieren mit der Produktion eines Antikörpers, der wegen seiner giftneutralisierenden Wirkung mit dem Namen »Antitoxin« bezeichnet worden ist.

Obgleich das Vorkommen von Diphtherie beim Pferde unbekannt ist, scheinen dennoch die Zellen dieses Tieres, welche das Antitoxin produzieren, Rezeptoren zu besitzen, welche sich mit dem Toxin verbinden, denn sonst könnten wir nicht gut erklären, wie diese Antitoxinproduktion vor sich geht.

So wissen wir auch, wenn das Pferd eingespritzt wird mit Rotlaufbazillen des Schweines, dass dieses Tier ein Serum produziert grosser therapeutischen Bedeutung.

Trotzdem ist es bekannt, dass auch der Rotlauf beim Pferde nicht vorkommt.

Wir sind aber verpflichtet anzunehmen, dass auch die Zellen des Pferdes, welche die Produktion von Antikörpern veranlassen, zugänglich sind für das Antigen (bezw. Antigene), anwesend in den Rotlaufbazillen, sonst wäre es nicht klar, dass nach der Injektion dieser Bazillen ein Serum produziert werden kann eines sehr hohen kurativen Wertes. Wir kennen noch viele andere Antigene, welche das Vermögen besitzen, bei Versuchstieren eingespritzt, Antikörper zu erregen, welche von einem kurativen oder präventiven Standpunkt in Verwendung kommen, obgleich diese Versuchstiere nicht empfänglich sind für eine spontane Infektion des Mikroorganismus, der das Antigen liefert.

Wenn wir aber die Antigene, die in dieser Hinsicht die grösste Bedeutung haben, beobachten, so sind es, soweit unsre Kenntnis ein Urteil gestattet, besonders Antigene, welche aus Bakterien bestehen, oder aus toxischen Stoffen, welche von Bakterien produziert werden, und obgleich das Vermögen, viele Antikörper nach der Injektion eines Bakteriantigens zu produzieren, nicht bei allen Tieren gleich stark entwickelt ist, scheint es dennoch eine Tatsache zu sein, dass die gewöhnlichen Versuchstiere, mit dem Pferde anzufangen und abzustiegen bis an die Maus, dieses Vermögen in mehrerem oder weniger Masse scheinen zu besitzen, gleichviel ob das Tier, welches die Antikörper produziert, spontan empfänglich ist für den Mikroorganismus, der als Antigen gebraucht wird.

Es ist aber gewisz nicht möglich z.B. mittels der Schildkröte Tetanusantitoxin anzufertigen, weil die Schildkröte offenbar keine Rezeptoren besitzt, welche für das Tetanustoxin zugänglich sind.

Man darf, schon aus theoretischen Gründen annehmen, dass dieses Tier nicht imstande ist Antitoxin gegen das Tetanustoxin zu produzieren.

Welches Tier zur Produktion von Antikörpern, nach der Injektion eines Antigens, am besten geeignet ist, wissen wir anfangs nicht; dies musz sich aus der Untersuchung herausstellen. Das Pferd ist aber für die Serumproduktion so ausserordentlich geeignet, dass es unsre Gewohnheit ist zu diesem Tier die Zuflucht zu nehmen und, wenn die Anaphylaxie, welche auf eine wiederholte Injektion Pferdeserums bei Rindern folgen kann, uns nicht im Wege stände, so würden wir auch alle Sera,

zur Bekämpfung der Bakterienkrankheiten bei diesen Tieren, mittels Pferden anfertigen.

Das Pferd ist imstande, besonders für die Praxis, gegen viele pathogenen Mikroorganismen Antikörper zu liefern, wenigstens, wenn diese Mikroorganismen zu den Bakterien gehören.

Wie ist es in dieser Hinsicht bestellt mit der Produktion von Antikörpern den Antigenen gegenüber, welche vorkommen in ultramikroskopischen Ansteckungsstoffen?

Sei das Pferd auch das Tier wie kein andres, um gegen letztgenannte Antigene Antikörper zu produzieren, wir stehen, bezüglich dieses Punktes, obgleich wir schon über zahlreiche Untersuchungen verfügen können, in Bezug auf die aktive Immunisation mittels ultramikroskopischer Krankheitskeimen auf einem Gebiete, auf dem noch nicht viel gearbeitet worden ist, hauptsächlich, weil wir die ultramikroskopischen Krankheitskeimen nicht künstlich züchten können und deshalb nicht imstande sind grosse Quantitäten von denselben bei Versuchstieren oder z. B. beim Pferde einzuspritzen.

Dennoch haben wir jetzt, besonders 2 ultramikroskopische Krankheitskeimen, welche, obgleich sie nicht künstlich gezüchtet werden können, doch in Verwendung kommen für die Serumproduktion. Dies ist das ultramikroskopische Virus der Maul- und Klauenseuche und das der Schweinepest.

Wie bekommt man bei diesen zwei Krankheiten das Antigen?

Bei der Maul- und Klauenseuche kommt es in grosser Quantität vor in dem Inhalt der Blasen, welche sich bei dieser Krankheit, besonders in dem Mund, entwickeln. Es scheint, dass es LOEFFLER gelungen ist, laut einer speziellen Methode, auch mittels des Pferdes ein Serum anzufertigen gegen die Maul- und Klauenseuche, das einige immunisierende Wirkung hat.

Ich werde hierauf nicht weiter eingehen, aber wenn dies wirklich so ist, so wäre damit der Beweis geliefert, dass das Pferd auch imstande ist, Antikörper gegen das filtrierbare Virus der Maul- und Klauenseuche zu produzieren, abgesehen von dem Umstand, dass dieses Serum schwerlich beim Rinde in Grosse in Verwendung kommen kan, wegen der Gefahr für Anaphylaxie nach wiederholter Injektion. Dieses Serum scheint aber mehr Wert zu haben gegen die Maul- und Klauenseuche der Schafe und Schweine, als gegen diese Krank-

heit beim Rinde. Das Maul- und Klauenseucheserum, angefertigt mittels des Rindes, ist dagegen wirksamer beim Rinde. Übrigens ist es bekannt, dass das Pferd, in seltenen Fällen, von Maul- und Klauenseuche angegriffen werden kann.

In Bezug auf die Serumanfertigung gegen die Schweinepest kommt das ultramikroskopische Virus besonders im Blut vor und deshalb wird das defibrierte Blut oder das Serum gebraucht um das dazu geeignete Tier, das für die Bildung von Antikörpern in Betracht kommt, zu hyperimmunisieren.

Jetzt kommt die Frage auf: Ist es auch wieder das Pferd oder das Rind, welches das Vermögen hat Antikörper gegen das ultramikroskopische Virus der Schweinepest zu bilden?

Wenn man Pferde oder Rinder mit grossen Quantitäten Schweineserum, welches das ultramikroskopische Virus enthält, einspritzt, ist das bekommenene Serum von derartig behandelten Pferden oder Rindern, ganz wertlos. Wenn man Schweine mit diesem Serum einspritzt und sie darauf der Infektion aussetzt, sterben sie eben so schnell wie die nicht eingespritzten Kontrollschweine.

Die Ursache dieser Unwirksamkeit ist nicht mit Gewissheit bekannt und die Möglichkeit, dass in dem Pferdekörper und in dem Körper der Rinder keine Antikörper gegen das filtrierbare Virus gebildet werden, oder dass derartige Antikörper nur hauptsächlich als sessile Ambozeptoren mit den Zellen verbunden bleiben, ist nicht ausgeschlossen.

Auch kann die Frage in Erwägung gezogen werden, ob im Körper des Schweines wohl ein passendes Komplement anwesend ist für die Antikörper, welche vom Pferde oder Rinde produziert werden. Dieser letzte Punkt darf nicht ausser Acht gelassen werden, weil das Schweinepestserum, ohne der bakteriotropischen Wirkung bestimmter Sera Abbruch zu tun, zweifellos gerechnet werden muss zu gehören zu den baktericiden, etw. mikrobiciden Sera, deren Wirkung sich gründet auf die Kombination eines spezifischen Ambozeptors und eines passenden Komplements. Obgleich das Virus der Schweinepest noch völlig unbekannt ist und den von UHLENHUTH gefundenen Körperchen, welche er vergleicht mit den Chlamydozoen von VON PROWAZEK, noch nur einen beschränkten Wert beigelegt werden kann, ist es dennoch erklärlich, dass die Wirkung des Schweinepestserums

von einem theoretischen Standpunkt betrachtet werden muss wie die der übrigen baktericiden Sera.

Es ist übrigens von bestimmten Sera bekannt, dass sie eine immunisierende Wirkung haben bei einem Tier und nicht bei dem andern.

Von SOBERNHEIM wissen wir unter andern, dass ein von Schafen bekommenes Immuneserum gegen Milzbrand, mit dem man Schafe passiv immunisieren kann, bei Kaninchen, sogar in grosser Quantität, fast ganz unwirksam ist, offenbar, weil der von dem Schafe produzierte Ambozeptor im Körper des Kaninchens kein passendes Komplement findet.

WECHSBERG hat weiter konstatiert, dass bei der Immunisation von Tauben gegen *Vibrio METSCHNIKOFF* in das Taubenserum ein Ambozeptor entsteht, welcher im Taubenkörper ein passendes Komplement findet; der Ambozeptor, welcher man bekommt mit demselben Antigen bei Kaninchen, besitzt nicht das Vermögen eine Taube zu retten von der tödlichen Infektion durch *Vibrio METSCHNIKOFF*, während dies wohl gelingt mit Taubenserum. Auch ist es bekannt, dass man mit einem Immuneserum, bekommen von Pferden, durch Einspritzung dieser Tiere mit den bipolaren Bazillen, Mäuse leicht beschützen kann, dagegen Kaninchen mit weit weniger Sicherheit. Wir wissen weiter, dass die sehr empfängliche Maus, nach Injektion von Menschenblut, in dem sich Pneumokokken befinden, meistens nicht stirbt, während das Kaninchen an einer derartigen Infektion verendet. Man ist der Meinung, dass die Antikörper des derartig infizierten Menschenblutes die übrigens sehr empfängliche Maus immunisiert, während das Kaninchen dadurch offenbar weniger schnell immun wird.

Dennoch ist es bekannt, dass auch Kaninchen gegen Pneumokokkeninfektionen sehr gut zu immunisieren sind.

Wenn ich hier nun zufüge die Beobachtung, dass ein Serum, bekommen mittels Schweinen, durch Einspritzung dieser Tiere mit dem filtrierbaren Virus der Schweinepest, imstande ist Schweine zu schützen und das ein Serum auf dieselbe Weise angefertigt mittels Pferden oder Rindern, wie ich schon gesagt habe, diese Eigenschaft nicht besitzt, so erhellt sich daraus, dass man bei der Serumanfertigung zur Bekämpfung der Infektionskrankheiten diesen Tatsachen Rechnung tragen muss. Könnte man

jedes Serum anfertigen mittels des Tieres, bzw. des Menschen, bei dem die Krankheit, gegen welche man auftreten will, spontan vorkommt, so würde sich dies wahrscheinlich in vielen Fällen empfehlen.

Weiter empfiehlt sich die Anfertigung polyvalenter oder multipartialer Sera; leider ist die Anfertigung dieser Sera mit einem grossen Verlust von Serumtieren verbunden.

So ist es auffallend wie wenig kurative und auch präventive Wirkung ein monovalentes (monopartiales) Serum besitzt z. B. gegen die Kolibacilliose der Kälber und gegen die Schweineseuche.

Mann könnte die Frage stellen: findet denn das monovalente Serum im Körper des Kalbes oder des Schweines kein passendes Komplement?

Zu diesem Ausspruch würde man gewisz nicht berechtigt sein und es scheint, dasz dieser Umstand wirklich anders erklärt werden musz. Hier soll offenbar die Ursache nicht in dem Komplement, sondern in dem Antikörper selbst gesucht werden.

Die Antigene verschiedener Stämme eines selben Mikroorganismus scheinen nicht immer völlig identisch mit einander zu sein und es ist nicht klar, ob dieser Unterschied quantitativer oder qualitativer Art ist, aber die Serumtherapie lehrt uns, dasz die kurative Wirkung eines Serums, bekommen durch Einspritzung einer Anzahl Stämme eines spezifiken Mikroorganismus grösser ist, als wenn man dazu einen einzigen Stamm gebraucht.

Die Antikörper scheinen dermaszen spezifiek zu sein, dasz sie sogar abhängig sind von ziemlich kleinen Unterschieden in dem Antigen, anwesend in den Stämmen eines selben Mikroorganismus.

Der Gebrauch einer Anzahl Stämme hat also in hohem Masze Einfluss auf die Wirksamkeit bestimmter Sera, einerlei ob diese Sera eine bactericide oder eine bacteriotrope Wirkung haben. Dasz diesem Umstand zu Grunde liegt, dasz die Antigene bestimmter Stämme nicht gleichwertig sind, unterliegt keinem Zweifel, was folgende Beobachtungen ausweisen werden.

Ein Rind, welches gegen verschiedene Stämme der Euterstreptokokken immunisiert worden ist, erhält an einem bestimmten Tage, um die Polyvalentie des Serums noch mehr

zu fördern, eine Streptokokkenkultur, welche von einer Uterusstreptomykose herrührt.

Das Tier, das die ersten Injektionen gut vertragen hatte, stirbt jetzt an einer allgemeinen Streptokokkeninfektion. Bei dem Tiere, das immun war gegen Euterstreptokokken, waren offenbar keine Antikörper anwesend für jedes Antigen, welches sich in dem neuen Stamm befand.

Ein Pferd, welches immunisiert worden ist gegen *Streptococcus equi*, kann auf einen *Streptococcus equi*, der aus einem ganz anderen Ort herrührt, stärker reagieren.

Ein Pferd, das schon hoch immunisiert worden ist gegen einen bestimmten Rotlaufstamm, erhält einen ganz anderen Stamm. Dieses Tier reagiert auf diese Injektion bisweilen weit heftiger, aber nicht immer.

Es ist bei der Serumanfertigung bekannt, dass man weniger Serumtiere verlieren wird, wenn man wenig neue Stämme einspritzt.

Spritzt man wiederholt andere Stämme ein, so wird das Serum besser, aber die Anzahl Sterbefälle unter den Tieren, welche das Serum produzieren, wird meistens grösser.

Lehrt die Serumtherapie, dass der Gebrauch verschiedener Stämme bei der Anfertigung den Wert des Serums erhöht, wir besitzen auch von einem epidemiologischen Standpunkt Angaben, welche an etwas Analoges denken machen und welche ausweisen, dass eine Immunität gegen einen Stamm eines Mikroorganismus nicht schützt gegen einen anderen Stamm desselben Mikroorganismus.

So ist es bekannt, dass nach dem Überstehen von Gonorrhoe eine ziemlich hohe Immunität auftritt gegen den homologen Stamm aber nicht gegen den heterologen Stamm. Hieraus muss man wohl schliessen, dass die Antigene der Gonococcenstämme nicht ganz identisch mit einander sind und dass deshalb die gebildeten Antikörper in Funktion einigermassen von einander abweichen müssen.

Auch ist es bekannt, dass bei einigen Krankheiten, unter andern beim infektiösen Abortus des Rindes und auch bei der Influenza des Menschen, in vielen Fällen keine Immunität eintritt, nachdem die Krankheit einmal überstanden worden ist.

Beim Abortus des Rindes wissen wir, dass das Rind nicht

selten zweimal, aber auch drei-, vier- sogar fünfmal von dieser Krankheit ergriffen wird ehe Immunität eintritt.

Und dennoch ist es auffallend, dasz eine graduelle Immunität nach jedem Krankheitsprozesz zur Entwicklung kommt, bis endlich das Tier nicht mehr erkrankt.

Es ist nicht bekannt, ob wir das wiederholt Entstehen der Krankheit zurückführen müssen auf eine Infektion durch dieselben Stämme, oder durch neue Stämme oder eventuell durch Passagestämme.

Man huldigt der Meinung, dasz das wiederholt Verwerfen beruhen soll auf Abortusbazillen, welche von einem früheren Abortus übriggeblieben sind.

In diesem Fall müszte der Mangel an genügender Immunität sich gründen auf den Umstand, dasz zu wenig Antikörper anwesend gewesen sind. Dasz es übrigens bei der Serumanfertigung öfters vorkommt, dasz gewisse Serumpferde keine, oder ganz ungenügend Antikörper bilden ist gewisz wohl in jedem Seruminstitut konstatiert worden, und man darf also auch die Möglichkeit annehmen, dasz in einigen Fällen, nachdem eine Infektionskrankheit überstanden ist, eine genügende Bildung der Antikörper ausbleibt.

Wenn wir weiter das Auge richten auf verschiedene Stämme der bipolaren Bazillen, welche bei Tieren besonders als Pneumonieerreger bekannt sind, so stöszt man dabei auf eine Eigentümlichkeit, welche ausweist, dasz sogar die Stammunterschiede in hohem Masze stabil sind und weiter, dasz die Injektion bestimmter Stämme eine Immunität zu Folge haben kann, welche vollkommen ist gegenüber den Stamm, welcher zu der Immunisation gebraucht wurde, aber unvollkommen gegenüber einem andern Stamm desselben Mikroorganismus.

Bekannt ist es, dasz durch diese bipolaren Bazillen, welche von einer Pneumonie des Schweines herrühren, bei Impfung in eine Hauttasche am Ohr eines Kaninchens, dieses Tier innerhalb 14—24—36 Stunden verendet an einer generalen Blutinfektion.

Dieser Mikroorganismus besitzt in hohem Masze das Vermögen direkt in das Blut zu treten und ohne bedeutende lokale Reaktion.

Und dennoch kommt es öfters vor, dasz diese Mikroorganismen, welche ebenfalls von Pneumonien der Schweine stammen, und

welche Pneumonien mit groszer Malignität verliefen, bei derselben Impfung Kaninchen nicht töten, sondern eine gewaltige lokale Reaktion im Ohr hervorrufen, wobei das Ohr riesig an Umfang zunimmt und von der das Kaninchen sich gewöhnlich wieder erholt.

Derartige Stämme betragen sich, ganz in Abweichung vieler andern Stämme dieses Mikroorganismus, als hätten sie eine Abneigung gegen das Blut, denn eine Blutinfektion tritt hier nicht ein.

Wenn ein Kaninchen mit einem derartig angeschwollenen Ohr sich erholt, ist es immun geworden gegen den Stamm, mit dem es eingespritzt wurde und meistens nicht immun oder nur partiell immun gegen den Stamm, welcher die Eigenschaft besitzt schnell in das Blut zu treten.

Spritzt man ein derartig immunisiertes Kaninchen ein mit dem letztgenannten Stamm, so stirbt das Tier meistens an einer allgemeinen Infektion oder es entsteht an der Injektionsstelle ein Abszess, in dem sich die bipolaren Bazillen befinden.

Werden diese Bazillen, aus dem Abszess in Reinkultur gezüchtet, eingespritzt bei einem nicht immunisierten Kaninchen, so stellt sich heraus, dass sie ihre ursprüngliche Eigenschaft behalten haben. Das eingespritzte Tier stirbt bald an einer generalen Sepsis. Hieraus darf man wohl schliessen, dass man Stammunterschieden bei der Anfertigung baktericider Sera, Rechnung tragen muss.

Haben wir bei der Wirkung, wenigsten der baktericiden Sera ein passendes Komplement zu berücksichtigen, gewisz haben wir dabei auch den Wert der Ambozeptoren nicht zu vernachlässigen.

In Bezug auf den ersten Punkt müssen wir unsre Wahl besonders richten auf die richtige Tiergattung, welche das Serum liefern muss, und in Bezug auf den zweiten Punkt müssen wir ausserdem Rücksicht nehmen auf die Stämme des Mikroorganismus, welche bei der Immunisation gebraucht werden.

Soweit unsre Beobachtungen ein Urteil gestatten, kann das Serum gegen die Schweinepest, wie ich schon gesagt habe, nur mittels Schweinen angefertigt werden.

Erwachsene Schweine werden zu diesem Zwecke hoch immunisiert durch wiederholte Einspritzung des filtrierbaren Virus, das die Ursache der Schweinepest ist. Dieses Virus, das in Wirkung nicht immer gleich ist, bekommt man durch Infektion

junger Schweine mit Schweinepest, sei es dasz man sie in einen infektierten Stall bringt, sei es dasz man sie subkutan einspritzt mit dem defibrinierten Blut von Schweinen, welche an Schweinepest leiden, und welche Tiere in dem akuten Stadium der Krankheit geschlachtet werden.

Das Blut derartiger jungen Schweine, die mit Schweinepest behaftet sind, wird gesammelt, defibriniert und mit diesem Blut werden erwachsene Schweine, welche Immunität besitzen oder immunisiert worden sind gegen Schweinepest, in zunehmender Quantität subkutan eingespritzt, sodasz jedes Schwein in einer Periode von ungefähr 3 Monaten einen Liter virulentes, defibriniertes Blut erhält. Alsdann ist das Schwein zur Serumproduktion fertig.

Nun fängt man an Blut zu lassen aus dem Schwanz, indem man ein kleines Stück des Schwanzes entfernt. Dies wird jede 4 Tage wiederholt bis der Schwanz verbraucht ist und dann wird das Schwein geschlachtet und alles Blut gesammelt.

Auf diese Weise bekommt man soviel Blut, dasz man ungefähr 6 Liter Serum hat aus einem Schwein.

Dieses Serum wirkt in hohem Masze präventiv, unter der Bedingung, dasz es eingespritzt wird bei Schweinen, welche der Infektion ausgesetzt sind.

Ich will Ihre Aufmerksamkeit darauf lenken, dasz man in der Immunitätslehre eine passive und eine aktive Immunität unterscheidet.

Nun ist es bekannt, dasz man blosz mit Serum gewöhnlich eine passive Immunität erregen kann, welche natürlich von kurzer Dauer ist.

Dies ist auch der Fall mit Schweinepestserum, wenn dieses Serum eingespritzt wird bei gesunden und nicht infektierten Schweinen. Derartige Tiere bekommen nur eine Immunität gegen die Schweinepest von ungefähr 3 Wochen. Aber, wenn man mit dem Serum gesunde Schweine, welche der Infektion ausgesetzt sind, einspritzt, (gesunde Schweine, welche das Virus der Schweinepest aufgenommen haben), so entsteht eine aktive Immunität, welche lebenslänglich dauern kann.

Wie soll das erklärt werden?

Beim Rotlauf ist es bekannt, dasz man, um eine länger dauernde Immunität zu erregen, das Schwein nicht nur mit Serum, sondern auch mit Kultur einspritzen musz, und es ist diese Kultur, welche eine aktive oder länger dauernde Immunität hervorruft.

Bei der aktiven Immunität wird das Tier selbst angeregt

Antikörper zu bilden, während bei der passiven Immunität, nämlich bloß durch das Serum, die Antikörper bei dem Tier eingespritzt werden, welche Antikörper nach Verlauf von einigen Wochen wieder aus dem Tiere verschwinden.

Das Serum allein erregt niemals eine aktive Immunität; dazu ist immer nötig die Kultur oder namentlich das Virus der Krankheit.

Nun haben wir bei der Schweinepest keine Kultur zu unsrer Verfügung; wir sind nicht imstande das filtrierbare Virus der Schweinepest künstlich zu züchten.

Die aktive Immunität bei der Schweinepestseruminjektion wird erregt von dem Virus, das die Schweine auf den infizierten Höfen per os aufnehmen und das eingespritzte Serum ist die Ursache, dasz die Krankheit nicht ausbricht. Die Kultur bei der Rotlaufimpfung wird bei der Schweinepestinjektion von der natürlichen Infektion vertreten. Offenbar gelingt dies bei nicht einer Krankheit so leicht wie bei Schweinepest, obgleich man zugeben musz, dasz auch bei der Druse der Pferde mit dem Serum ungefähr dasselbe zu erreichen ist, wenigstens, wenn derartige Pferde in der Lage sind Drusestreptokokken aufzunehmen. Durch die präventive Anwendung dieses Serums bei unsern Kriegspferden, ist das Auftreten der Druse unter diesen Tieren auf ein Minimum herabgesetzt. Dasz der präventive und kurative Wert, welcher auch von Privatseiten dem Druseserum beigelegt wird, nicht gering ist, möge die Tatsache ausweisen, dasz ein Pferdehändler im Ausland in ungefähr 3 Jahren von dem Reichsseruminstitut erhielt 48 Liter Serum, für welche er 4800 Gulden zahlte, nämlich 100 Gulden per Liter. Dieses Serum wird von ihm benutzt um seine eignen Pferde einspritzen zu lassen.

Aus vorstehenden Mitteilungen geht hervor, dasz die Serum-anwendung gegen Schweinepest mit groszer Sorgfalt geschehen musz. Es soll nämlich nicht in Anwendung kommen bei gesunden Schweinen, welche nicht der Infektion ausgesetzt sind, denn dann dauert die Immunität nur 3 Wochen. Es kommt in Verwendung bei gesunden Schweinen auf einem Hofe, sobald ein Fall der Schweinepest vorgekommen ist. Wenn auf einem Hofe ein Krankheitsfall konstatiert worden ist und sind die gesunden Schweine sofort eingespritzt mit Serum und stellt sich später heraus, dasz der Krankheitsfall keine Schweinepest war, so müssen die Schweine auf diesem Hofe wieder mit Serum injiziert

werden, sobald ein wirklicher Fall der Schweinepest ausbricht.

Es empfiehlt sich weiter, dasz die schwer erkrankten Schweine von den eingespritzten Tieren separiert werden, weil, wenn auch eine Infektion notwendig ist, eine zu heftige Infektion nicht wünschenswert ist für die eingespritzten Schweine. Denn bei andern Impfungen, bei denen Serum und Kultur eingespritzt werden, ist die Quantität Kultur auch immer ziemlich klein. Eine zu grosze Quantität Kultur könnte bedenkliche Folgen haben. Etwas Ähnliches besteht bei der Pestimpfung; hier soll die natürliche Infektion nur mässig sein.

Hieraus ergibt sich, wenn man mit dem Serum gute Resultate bekommen will, dasz man vernünftig vorgehen musz. Derjenige, der dies macht, wird auf günstige Resultate rechnen können; dagegen wird im entgegengesetzten Fall die Injektion den Erwartungen nicht entsprechen. Nun stellt sich weiter heraus, dasz Schweine, bei denen die Schweinepest schon ausgebrochen ist, noch durch das Serum genesen können, nämlich wenn sie sich noch befinden in dem ersten Stadium der Krankheit und eine secundaire Infektion noch nicht eingetreten ist.

Haemorrhagische Formen der Schweinepest, welche akut verlaufen, können auch ohne dasz eine secundaire Infektion eingetreten ist, gewöhnlich nicht durch das Serum genesen.

Schweine, bei denen die Krankheit weniger heftig auftritt, können gerettet werden.

Es scheint, dasz derartige Schweine, ehe eine secundäre Infektion eintritt, sich durch Einspritzung des Serums erholen.

Daraus erhellt, dasz das Serum auch präventiv wirkt gegen die secundäre Infektion der Pestbazillen und der bipolaren Bazillen. Dem Ausbruch der secundären Schweineseuche wird deshalb von Schweinepestserum, wenn dies rechtzeitig in Anwendung kommt, vorgebeugt.

Die Simultanimpfung bei Schweinepest, nämlich gleichzeitige und subkutane Injektion des Virus und des Serums, scheint vorläufig noch bedenkliche Folge veranlassen zu können, obgleich man schon über günstige Resultate verfügen kann. Im Reichseruminstitut werden Versuche angestellt durch eine künstliche Infektion per os und eine gleichzeitige subkutane Serumeinspritzung, eine Immunität zu erregen. Hierbei wird die natürliche Infektion möglichst treu nachgeahmt.

Aus dem Immunitätslaboratorium des
Reichsseruminstituts in Rotterdam.

UEBER LEUKOCYTOLYTISCHES SERUM

VON

Dr. H. E. REESER.

Wenn man die thermostabilen phagocytosebefördernden Immunstoffe (Bakteriotropine) identifiziert mit lytischen Ambozeptoren, so muss man auch annehmen, dass dieselben in den Leukocyten ein passendes Komplement finden und dass durch Zusammenwirkung dieser beiden Körper eine Auflösung der in die Leukocyten aufgenommenen Elemente stattfindet. Tritt dagegen in den Phagocyten kein Komplement in Wirkung, so darf man auch die Bakteriotropine nicht wie Ambozeptoren betrachten, weil wir darunter Körper verstehen, welche die Funktion besitzen eine Bakterie oder eine Zelle unter Einwirkung des Komplements anzugreifen.

Nun sind die Beziehungen der Leukocyten zu dem Komplement schon den Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, wobei man gewöhnlich 2 Fragen unterscheidet:

a. ob die Leukocyten Komplement sezernieren (BUCHNERS Hypothese);

b. ob die Leukocyten, beim Zugrundegehen (innerhalb oder ausserhalb des Körpers), das in ihnen enthaltene Komplement in das Serum übergehen lassen (METCHNIKOFFS Hypothese). Was die Herkunft des Komplements betrifft, darüber besteht eine sehr grosse Literatur, es liegen darüber ausgezeichnete zusammenfassende Darstellungen zum Teile der letzten Zeit vor. Ich nenne z. B. die Monographien von METCHNIKOFF, FRIEDBERGER und HAHN in KOLLE-WASSERMANN'S Handbuch, Bd. IV; die Monographie von SACHS in LUBARSCH-OSTERTAGS Ergeb-

nissen; die Verhandlungen des hygienischen Kongresses im Jahre 1903 in Brüssel, und auch die Arbeit von SCHNEIDER (1) (Die Praexistenz des Alexins im zirkulierenden Blut).

DENYS, KAISIN und HAVET (2) fanden zuerst das leukocytenreiche Exsudate stärker bakterizid waren als die entsprechenden Blutsera.

BUCHNER (3), der dieselbe Beobachtung machte, konstatierte dass Erwärmung auf 56° C. auch den leukocytenhaltigen Flüssigkeiten das bakterizide Vermögen beraubt und er folgerte daraus die Identität der bakterienvernichtenden Stoffe des Serums und der leukocytenreichen Exsudate. Durch diese Untersuchungen sah er sich veranlasst die Leukocyten als die Bildungsstätte der Alexine anzusehen, weshalb er diesen Zellen den Namen »Alexocyten« gab. BUCHNER bestreitet jedoch entschieden, dass die Leukocyten eine aktive phagocytäre Rolle bei der Bakterizidie spielen. Er und seine Schüler wiesen nach, auf Grund einer Reihe von weiteren Untersuchungen, dass es nur physiologische Sekretionsprodukte der Leukocyten sind, welche die erwähnte Wirkung hervorbringen. Nach BUCHNERS Anschauungen findet die Sekretion der Wirksamen Stoffe aus den lebenden Leukocyten statt und ist als Ausdruck einer physiologischen, vitalen Funktion anzusehen; zum Teil werden aber die Alexine auch bei dem in dem Organismus immer stattfindenden Zerfall von Leukocyten an das Serum abgegeben. Was weiter die Hypothese von BUCHNER betrifft, die Verhältnisse zwischen Komplement und Leukocyten, können am besten studiert werden bei den roten Blutkörperchen und so giebt es über die Frage, ob die Leukocyten haemolytisches Komplement sezernieren auch Untersuchungen von GRUBER, VON HOHE, NEUFELD und anderen.

GRUBER 4) brachte in vitro sensibilisierte Blutkörperchen mit Leukocyten zusammen, welche in Kochsalzlösung oder inaktivem Serum aufgeschwemmt waren und studierte die hierbei eintretende Phagocytose. Er stellte fest, dass bei dieser Versuchsanordnung die extracellulär gelegenen Blutkörperchen keine Hämolyse erkennen liessen.

HOHE (5) versetzte einige ccm. frischen Kaninchenserums mit Leukocyten, die er aus der Brusthöhle desselben Tieres, von dem das Serum stammte, durch Aleuronatinjektion erhalten hatte, liess das Gemisch $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° C. stehen und

zentrifugierte die Zellen ab. Nun prüfte er die überstehende Flüssigkeit auf ihre hämolytische Kraft gegenüber Meerschweinchenblut, indem er zum Vergleich das frische, unbehandelte Kaninchenserum heranzog. Es ergab sich, dass die hämolytische Wirkung des Serums durch die Behandlung mit Leukocyten nicht zu-, sondern abgenommen hatte, und weitere Versuche lehrten, dass diese Abnahme auf Verringerung des Komplementgehaltes beruhte. Die Leukocyten hatten also nicht nur kein hämolytisches Komplement sezerniert, sondern sogar einen Teil des im Serum vorhandenen absorbiert.

Derartige Versuche wurden auch von NEUFELD angestellt. Auch er sah in Leukocytenaufschwemmungen mit sensibilisierten Hammelblutkörperchen nie Hämolyse auftreten, und konstatierte, ebenso wie HOHE, durch Leukocyten eine Hemmung der Hämolyse (Komplementabsorption). Auch NEUFELD nahm darum an, dass die Leukocyten keine nennenswerten Quantitäten Komplement sezernierten, dass also gar nicht die Rede davon sein kann, dass alles im Serum vorhandene Komplement durch Sekretion der Leukocyten seine Entstehung verdankt.

Eine von der BUCHNERSchen in wesentlichen Punkten abweichende Anschauung vertritt METCHNIKOFF. (6)

Seine Hypothese, bei deren die Leukocyten, erst wenn sie absterben, ihr Komplement abgeben sollten, berührt den Kern der humoralen Immunitätslehre. Unter normalen Umständen würden die Alexine nie frei in den Körpersäften zirkulieren, sondern in die Phagocyten eingeschlossen sein; im Organismus sollten also, unter den normalen Bedingungen, allein die Phagocyten zur Vernichtung der Keime befähigt sein, da im intakten Körper, nach METCHNIKOFF, keine freien, im Blut zirkulierenden Alexine vorhanden sein können. Das zirkulierende Blut ist seiner Meinung nach vollkommen alexinfrei.

Die Alexine sollten nur dort, wo Leukocyten zufälligerweise zu Grunde gehen (Phagolyse) in die Körperflüssigkeiten übergehen. Es sollte nämlich das Komplement sein, worauf die Vernichtung der in die Leukocyten gelangten Bakterien zurückzuführen wäre.

Ebenso wie die Reaktion nach PFEIFFER nur durch Phagolyse zustande kommen sollte, so sollte man auch, nach METCHNIKOFFS Lehre, die bakterizide Kraft des Serums einer

Anzahl Leukocyten verdanken, welche beim Gerinnen des Blutes zu Grunde gehen und dann Komplement an das Serum abgeben. (Der grösste Teil der Physiologen nimmt gegenwärtig aber an, dass beim Gerinnen des Blutes kein Zerfall von Leukocyten stattfindet.) Wäre die Theorie METCHNIKOFFS ohnehin richtig, so müsste zwischen dem Blutplasma und dem Blutserum ein sehr grosser Unterschied in bakterizider Fähigkeit zu bemerken sein, was zahlreiche Versuche mehrerer Forscher als nicht zu treffend stipuliert haben.

Diese viel bekämpfte Hypothese METCHNIKOFFS lässt sich nun unter exakten Bedingungen einer Prüfung an Blutkörperchen unterziehen. Die bisherigen Versuche, aus den Leukocyten hämolytisches Komplement zu extrahieren, haben zu negativen Ergebnissen geführt; LANDSTEINER (7) und LAMBOTTE und STIENNON (8) fanden, dass solche Extrakte im Gegensatz zu dem Blutserum und der Exsudatflüssigkeit desselben Tieres nicht imstande waren inaktiviertes, hämolytisches Serum zu komplettieren.

NEUFELD (9) berechnete dass, der Lehre METCHNIKOFFS nach, ein Makrophag soviel Komplement enthalten sollte, 8000—10,000 sensibilisierte rote Blutkörperchen momentan aufzulösen. Er untersuchte nun im hängenden Tropfen Leukocyten, welche ein oder mehrere sensibilisierte, rote Blutkörperchen in sich aufgenommen hatten und konstatierte kein einziges Mal, dass die Blutkörperchen so schnell in die Phagocyten aufgelöst wurden, dass sie innerhalb einiger Minuten in Schatten verwandelt waren, wie bei extracellulärer Hämolyse wahrgenommen wird.

Die Verdauung der roten Blutkörperchen geschah äusserst langsam; nach einigen Stunden konnte NEUFELD den grössten Teil der roten Blutkörperchen noch normal in den Leukocyten nachweisen. Auch GRUBER erhielt derartige Erfolge wie NEUFELD. Die intracelluläre und extracelluläre Auflösung der Blutkörperchen scheinen deshalb zwei völlig von einander verschiedene Prozesse zu sein; die intracelluläre Auflösung ist mehr einer Verdauung ähnlich, welche sehr wahrscheinlich zurückzuführen ist auf die vitale Wirksamkeit der Zelle und verläuft zweifellos ohne Mitwirkung des Komplements

Insoweit stimmen METCHNIKOFF und BUCHNER, trotz prinzi-

pieller Gegensätze, überein, dass beide die bakterievernichtenden Eigenschaften des Blutes mit den Leukocyten in enger Zusammenhang bringen. PFEIFFER sowie MOXTER (10) dagegen, konnten keineswegs einen Zusammenhang der bakteriziden Eigenschaften mit den Leukocyten beobachten. Die Untersuchungen der beiden genannten Autoren sind nicht die einzigen geblieben, welche die Lehre vom Zusammenhang der Leukocyten mit den Alexinen ins Wanken brachten. Es liegen eine grosse Reihe von weiteren Arbeiten vor, die keineswegs für einen Zusammenhang der Alexine mit den Leukocyten sprechen. Es lohnte daher die Mühe einmal nachzuforschen ob es vielleicht gelingen würde aus Leukocyten mit Hilfe eines spezifischen leukocytenauflösenden Serums, Komplement auszuschneiden.

Der Gedanke, übermässig gewucherte Zellen durch Cytolysinen zur Auflösung zu bringen, ist, ausser bei der Behandlung von Karzinom unter andern auch versucht bei den Krankheiten, welche auf eine pathologische Wucherung der Blutelemente beruhen.

Den Weg, welchen man zuerst einschlug war diesen, dass man Blutbestandteile oder blutbildende Organe injizierte, in der Hoffnung spezifische Sera zu bekommen. Der erste, der versuchte ein antileukocytäres Serum zu bereiten, war METCHNIKOFF.

Durch subkutane Injektion einer Rattenmilz bei Meerschweinchen bekam er ein Serum, das agglutinierend und auflösend wirkte auf Rattenleukocyten. Die mononukleären wurden zuerst angegriffen und veränderten in klare Bläschen mit sehr sichtbarem Kern, darauf kamen die polynukleären Leukocyten in die Reihe, welche dieselbe Veränderungen erfuhren, indem schliesslich die Zellen von EHRlich (Mastzellen) angegriffen wurden. Das Serum der vorbehandelten Meerschweinchen enthielt also ein sehr aktives Leukozidin. Spritzte er nur mononukleäre Leukocyten ein, so beobachtete er doch, dass das Serum auch auflösend wirkte auf die polynukleären. Weiter stellte sich heraus, dass diese Wirkung streng spezifisch war; das Serum, das schnell Rattenleukocyten vernichtete, erwies sich fast unwirksam gegen Mäuseleukocyten; ein gegen Kaninchenleukocyten prepariertes Serum löste nur diese Leukocyten auf und nicht die der Ratten und umgekehrt.

DELEZENNE (12) teilt in seinen Beiträgen zum Studium der antileukocytären Sera mit, dass er durch die Injektion von

Hundeserum ein nur gegen den Hund gerichtetes Leukotoxin bekommen habe.

FUNCK (13) injizierte intraperitoneal bei Meerschweinchen Kaninchenmilz. Angefangen mit einer halben Milz und gestiegen bis eine ganze Milz, spritzte er die Tiere in Zwischenräumen von 8—10 Tagen 6 Mal ein, worauf das Serum gesammelt wurde, welches auf seine leukotoxische Wirkung sowohl in vivo (Bauchhöhle Kaninchen) als in vitro (peritoneales Exsudat des Kaninchens) kontrolliert wurde.

In vitro beobachtete er nach 2 Stunden eine Degeneration der Leukocyten, welche Degeneration nach 24 Stunden mit einer vollkommenen Vernichtung der Leukocyten, sowohl der mononukleären als der polynukleären, endete. Normales Meerschweinchen Serum hatte auf die Kaninchenleukocyten gar keine Wirkung. Ähnliche Resultate erzielte BIERRY (14) der auch konstatierte, dass das Serum von Tieren, welche intraperitoneal mit Leukocyten vorbehandelt waren, die Leukocyten unbeweglich machte und dieselben in runde Kugeln verwandelte.

Es wäre zu viel alle Studien über Leukotoxine hier zu besprechen. Ich will nur die Aufmerksamkeit lenken auf die Artikel von FLEXNER (15), CHRISTIAN (16), CESARIS, DEMEL und SOTTI (17), FRANÇA (18), LESCHKE (19), u. s. w., welche alle über Leukotoxine handeln.

Zu meinen Versuchen gebrauchte ich leukocytolytisches Serum gegen Pferde- und Meerschweinchenleukocyten. Das erstere bekam ich, indem ich Kaninchen intravenös mit Pferdeleukocyten injizierte, welche Leukocyten folgenderweise gesammelt wurden. In eine Flasche mit 15 cM³ 10 % Natriumcitratlösung wurde 100 cM³ Pferdeblut steril aufgefangen, welches Blut einige Stunden ruhig stehen blieb, worauf die roten Blutkörperchen sich in einer dichten Schicht auf den Boden der Flasche abgesetzt hatten. Das trübe, gelbe Plasma wurde mittels einer Pipette abgesogen und dies wurde in einer Zentrifuge mit geringer Tourenzahl zentrifugiert, worauf die Leukocyten, nachdem sie dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen waren, von dem anhängenden Plasma befreit wurden.

Die Leukocyten, welche sich auf dem Boden der Zentrifugegläser befanden, wurden in 10 cM³ physiologischer Kochsalzlösung gesammelt, welche Quantität als erste Injektion intra-

venös bei einem Kaninchen eingespritzt wurde. Die zweite Injektion fand nach 8 Tagen ebenso intravenös statt; die injizierten Leukocyten stammten von 200 c.M³ Pferdeblut; die dritte Injektion geschah 8 Tage nach der zweiten mit 300 c.M³ und so hintereinander, bis das Tier bei der sechsten Injektion intravenös die Leukocyten von 600 c.M³ Pferdeblut empfangen hatte. Die gebrauchten Kaninchen, welche die Injektionen ohne heftige Reaktionserscheinungen vertragen hatten, wurden 10 Tage nach der letzten Einspritzung durch Verblutung aus der Carotis getötet. Das steril gesammelte Blut blieb 2 Tage ruhig stehen, vorauf das leukocytolytische Serum, das sich ausschied, in kleinen Flasschen im Eisschrank aufbewahrt wurde.

Die Leukocyten, welche nötig waren für die Bereitung eines leukocytolytischen Serums gegen Meerschweinchenleukocyten, erhielt ich durch intraperitoneale Injektion von Meerschweinchen mit 20 c.M³ Pepton-Na Cl-lösung; nach 6 Stunden wurde diese, nun leukocytenreiche Flüssigkeit, mit einer Kanüle, wieder aus der Bauchhöhle gesammelt. Für die erste Injektion meiner Kaninchen gebrauchte ich die Leukocyten von *einem* Meerschweinchen; für die folgenden Einspritzungen, welche 8 Tage nach der vorhergehenden Injektion statt fanden, benutzte ich die Leukocyten von je einem Meerschweinchen mehr, sodass bei der sechsten Injektion die Leukocyten von 6 Meerschweinchen injiziert wurden. Die Verblutung der Tiere fand auch hier 10 Tage nach der letzten Injektion statt.

Weil ich nun im Besitz war dieser antileukocytären Sera, kam die Frage auf, ob diese Sera wirklich Leukocyten auflösten, und bejahendenfalls, in welcher Quantität. Um dies zu kontrollieren müssen, ausser dem spezifischen Serum, noch zwei Stoffe anwesend sein, nämlich Leukocyten (in unsrem Fall eines Pferdes oder eines Meerschweinchens) und Komplement. Die Pferde- und Meerschweinchenleukocyten erhielt ich auf die obenerwähnte Weise. Besonders für diese Versuche ist es notwendig Leukocyten zu bekommen, welche nichts oder sehr wenig von ihren vitalen Eigenschaften eingebüßt haben. Hier musz deshalb speziell beachtet werden, dass die Leukocyten tüchtig gewaschen und von der anhängenden Flüssigkeit befreit werden. Dies ist ein besonders wichtiger Punkt, da wir die Anwesenheit von kleinen Mengen eines andern Serums und vor allem von Komplement ausschlieszen müssen.

In der Regel wird es genügen die Zellen zweimal zu waschen; doch kann man ohne Schaden das Waschen noch öfters wiederholen; zulange fortgesetztes Zentrifugieren kann dagegen zu einer Schädigung der Leukocyten führen. Man muss möglichst frisch entnommene Leukocyten benutzen; die im Eisschrank aufgehobenen Zellen zeigen ihre Fähigkeit noch nach 24—28 Stunden.

Das gebrauchte Meerschweinchenkomplement, wurde in der gewöhnlichen Weise erhalten, indem das Blut eines Meerschweinchens in eine sterile Schale gesammelt wurde, um nach dem Gerinnen das Serum ausscheiden zu lassen.

Nun wurden, zur Kontrolle auf das leukocytolytische Vermögen des bereiteten Serums, verschiedenen Röhrchen, welche 1 cM³ Pferdeleukocytenemulsion nebst einer genügenden Quantität Meerschweinchenkomplement (0.3 cM³) enthielten, abnehmende Quantitäten leukocytolytisches Serum für Pferdeleukocyten beigelegt, während zur Kontrolle einige Röhrchen mit leukocytenauflösendem Serum für Meerschweinchenleukocyten, einige Röhrchen mit normalem Kaninchenserum und ein Röhrchen ohne Komplement bei dem Versuch gebraucht wurden, wie unterstehende Tabelle deutlich ausweist.

No.	Komplement.	Leukocytol. Serum Pferd.	Leukocytenemuls. Pferd.	Resultat.
1	0.3 cM ³ .	0.5 cM ³ .	1 cM ³ .	++
2	0.3 »	0.4 »	1 »	++
3	0.3 »	0.3 »	1 »	++
4	0.3 »	0.2 »	1 »	+
5	0.3 »	0.1 »	1 »	±
6	0.3 »	0.05 »	1 »	—
7	— »	0.5 »	1 »	—
Leukocytol. Serum Meerschw.				
8	0.3 »	0.5 cM ³ .	1 »	±
9	0.3 »	0.4 »	1 »	±
10	0.3 »	0.3 »	1 »	—
11	0.3 »	0.2 »	1 »	—
12	0.3 »	0.1 »	1 »	—
Normalserum Kaninchen.				
13	0.3 »	0.5 cM ³ .	1 »	±
14	0.3 »	0.4 »	1 »	—
15	0.3 »	0.3 »	1 »	—
16	0.3 »	0.2 »	1 »	—
17	0.3 »	0.1 »	1 »	—

Bei obenstehendem Versuch muss noch bemerkt werden, dass die Röhrrchen bei 37° C. hingestellt wurden, während zu verschiedenen Zeiten, zwischen 1 und 24 Stunden, ein Tropfen für die mikroskopische Untersuchung den verschiedenen Röhrrchen entzogen wurde. Aus dieser Untersuchung (Färbung nach GIEMSA und MAY—GRÜNWALD) ergab sich, dass in den Röhrrchen 1, 2 und 3 eine sehr starke Leukocytolyse statt gefunden hatte; nach 2 Stunden konnte man schon in diesen Röhrrchen eine beginnende Degeneration der Leukocyten wahrnehmen, während nach 24 Stunden der leukocytolytische Prozess vollkommen beendet war. In Röhrrchen 4 konnte noch eine ziemlich gut sichtbare, aber dennoch schwächere Leukocytolyse konstatiert worden als in den ersten drei Röhrrchen; die Reaktion trat hier erst nach 4 Stunden ein. In Röhrrchen 5 konnte eine zweifelhafte Reaktion festgestellt werden, und in Röhrrchen 6 und 7 war keine Auflösung der Leukocyten wahrzunehmen.

Was die Kontrolle betrifft, so konnte nur mit den grösseren Dosen, 0.50 M^3 und 0.4 c.M^3 bei dem leukocytolytischen Serum gegen Meerschweinchenleucocyten und 0.5 c.M^3 bei normalen Kaninchenserum eine äusserst schwache Leukocytolyse mikroskopisch beobachtet werden. Mit kleineren Quantitäten als die obenerwähnten, fiel eine Reaktion ganz negativ aus.

Die Alteration der Leukocyten geht immer weiter und man kann allen Phasen des Prozesses in den Präparaten folgen, wenn man sie mit Alkoholäther fixiert und mit Giemsa färbt. Zuerst beobachtet man, dass sich die Kerne schwerer und schwächer färben; es tritt eine Abblassung der Kerne ein, wobei sich die verschiedenen Kernteile zu 1 oder 2 grösseren Kernteilen vereinigen; auch ändern sich die Konturen der Leukocyten, die Grenzen werden mehr oder wenig gekerbt und die schwachgefärbten Kerne scheinen sich gegen den Rand der Leukocyten auszubreiten. Das Zellprotoplasma wird granulös, wobei ein Auftreten eosinophiler Granula stattfindet. Schliesslich verschwinden die Kerne ganz und werden die Leukocyten durchscheinend; eine vollkommene Auflösung der Leukocyten kommt aber nicht zu Stande. Die Schatten der Leukocyten, in denen meistens auch noch der Umriss eines Kerns zu beobachten ist, bleiben zurück. Derselbe Prozess wurde konstatiert, wenn das leukocytolytische Serum gegen Meerschweinchenleukocyten auf

diese Leukocyten einwirkte. Obgleich hier die Reaktion einigermaßen schwächer ausfiel als bei den Pferdeleukocyten, was zweifellos auf die Bereitung des leukocytolytischen Serums zurückzuführen ist, (bei der Bereitung des leukocytolytischen Serums gegen Pferdeleukocyten, wurden verhältnismässig weit grözere Dosen Leukocyten injiziert als bei der Bereitung des Meerschweinchen leukocytolytischen Serums,) war dennoch die Leukocytolyse sehr gut in den Präparaten wahr zu nehmen. Auch hier gab das artfremde Serum und das Normalserum nur in der Dosis von 0.5 c.M³ eine schwache Degeneration der Leukocyten.

Aus untenstehender Tabelle geht eines und das andre hervor, sodass eine Schilderung des Prozesses als überflüssig betrachtet werden kann.

No.	Komplement.	Leukocytol. Serum Meerschw.	Leukocytenemuls. Meerschw.	Resultat.
1	0.3 cM ³ .	0.5 cM ³ .	1 cM ³ .	++
4	0.3 »	0.4 »	1 »	++
3	0.3 »	0.3 »	1 »	+
4	0.3 »	0.2 »	1 »	±
	0.3 »	0.1 »	1 »	—
6	0.3 »	0.05 »	1 »	—
7	—	0.5 »	1 »	—
		Leukocytol. Serum Pferd.		
8	0.3 »	0.5 cM ³ .	1 »	±
9	0.3 »	0.4 »	1 »	—
10	0.3 »	0.3 »	1 »	—
11	0.3 »	0.2 »	1 »	—
12	0.3 »	0.1 »	1 »	—
13	0.3 »	0.05 »	1 »	—
		Normalserum Kaninchen.		
14	0.3 »	0.5 cM ³ .	1 »	±
15	0.3 »	0.4 »	1 »	—
16	0.3 »	0.3 »	1 »	—
17	0.3 »	0.2 »	1 »	—
18	0.3 »	0.1 »	1 »	—
19	0.3 »	0.05 »	1 »	—

Aus der Untersuchung ergab sich auch, dass beide Sera, und besonders das leukocytolytische Pferdeserum, ausser antileukocy-

tären Immunkörpern, auch haemolytische Immunkörper enthielten, aus welchem Umstand, meiner Meinung nach, nicht die Schlussforderung zu ziehen ist, dass weisse und rote Blutkörperchen eine Menge Rezeptorentypen mit einander gemein haben.

(V. DUNGERN, METCHNIKOFF, MOXTER bekamen, bei einer Vorbehandlung mit Flimmerepithelien, Milch und Spermatozoën, Haemolysine). Vielmehr führe ich die Anwesenheit der Haemolysine im leukocytolytischen Serum zurück auf die Bereitung und zwar darauf dass das Plasma, das bei den Kaninchen intravenös injiziert wurde, ausser einer überwiegenden Anzahl weisse, auch noch eine gewisse Menge rote Blutkörperchen enthielt, welche sich noch nicht auf den Boden abgesetzt hatten. Die Kaninchen wurden in dieser Weise einer Vorbehandlung mit 2 Antigenen unterworfen. Dass dies wahrscheinlich wohl die Ursache der haemolytischen Wirkung der beiden Sera sein wird, wies weiter der Umstand aus, dass das leukocytolytische Pferdeserum viel stärker haemolytisch wirkte, als das leukocytolytische Serum gegen Meerschweinchenleukocyten, was wieder seine Ursache findet in der Tatsache, dass das Pferdeplasma, das bei den Kaninchen eingespritzt wurde, bei mikroskopischer Untersuchung eine weit grössere Anzahl rote Blutkörperchen enthielt als die Peritonealflüssigkeit des Meerschweinchens. Während das leukocytolytische Pferdeserum noch haemolytisch wirkte in einer Dosis von 0.005 c.M^3 , gab das leukocytolytische Meerschweinchen Serum nur Haemolyse bei Anwendung von 0.1 c.M^3 . Auch ergab sich hieraus, dass trotz bei der Injektion die weissen Blutkörperchen den roten weit überlegen waren, dennoch das Serum (besonders das leukocytolytische Pferdeserum) in einer Dosis von 0.005 c.M^3 haemolytisch wirkte, wobei die leukocytenauflösende Wirkung schon lang versagt hatte.

Auch stellte sich heraus, dass das leukocytolytische Pferdeserum nicht haemolytisch wirkte gegen Meerschweinchenblut und umgekehrt.

Dass wir in einem leukocytolytischen Serum ein spezifisches Immuneserum besitzen und die leukocytolytischen Stoffe echten Ambozeptoren gleichgestellt werden können, geht aus dem Umstand hervor, dass dieselben, ausser einer artspezifische Leukocytolyse, auch die verschiedenen andern Immunitäts-

reaktionen geben (Agglutination, Präzipitation, Komplementbindung) was ich hier kurz mitteilen will.

Das zu der Präzipitation erforderliche Leukocytenfiltrat wurde erhalten, indem ich Leukocyten in einem Mörser mit Quarzsand und Na Cl-lösung, 15 Minuten lang, zerrieb und diese Aufschwemmung darauf filtrierte. Durch Beifügung des artgleichen Serums, wurde an der Grenze der beiden Flüssigkeiten ein sehr schöner Ring sichtbar; wenn stärkere Verdünnungen des Filtrats gebraucht wurden, so fiel die Reaktion negativ aus. Vollkommen negativ war die Reaktion, wenn dem Leukocytenfiltrat des Pferdes z. B. das leukocytenauflösende Serum gegen Meerschweinchenleukocyten beigefügt wurde und umgekehrt.

Bei der Beurteilung der Agglutination musz man vorsichtig sein.

Jeder der mit Leukocyten gearbeitet hat wird die Erfahrung gemacht haben, dass sie schon von selbst leicht an einander kleben, sodass man sehr leicht falsche Schlussfolgerungen ziehen kann. Um eine homogene Aufschwemmung von Leukocyten zu bekommen ist es nötig dieselben wenigstens dreimal gut zu waschen sodasz alle anhängende Stoffe entfernt werden. Auch empfiehlt es sich die Aufschwemmung nicht zu dicht zu machen, sonst sieht man die Leukocyten schon von selbst zu Boden sinken. Zieht man diese Fürsorgen in Betracht, so kann man beobachten, dass das leukocytolytische Serum auch agglutinierend wirkt und auszerdem, dass diese Agglutinine wieder spezifisch sind für bestimmte Leukocyten. Niemals habe ich wahrgenommen, dass das leukocytolytische Serum für Meerschweinchenleukocyten Pferdeleukocyten agglutinierte und umgekehrt. Der Titer dieser beiden Sera ist aber nicht hoch; 1:100 ist gewöhnlich schon die minimale Grenze der Agglutination.

Und nun die dritte Immunitätsreaktion, die Komplementbindung.

Als Extrakt wurde ein klares Leukocytenextrakt gebraucht und zwar in abnehmenden Quantitäten von 0.5 c.M³ bis 0.05 c.M³. Als Sera wurden die inaktiven leukocytolytischen Sera benutzt, in Quantitäten von 0.2 und 0.1 c.M³, während ich mich für das Komplement des Meerschweinchenserums bediente, von dem der Titer bei dem vorher angestellten Versuch auf 0.05 c.M³ festgesetzt wurde. Wenn dieses Ganze (die verschiedenen Röhren angefüllt mit physiologischer Na Cl-lösung bis zum gleichen

Volumen) 1 Stunde lang bei 37° C gestellt worden war, und darauf 1 c.M³ einer 5 % Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen und eine bestimmte Dosis des haemolytischen Serums demselben beigefügt worden war, so stellte sich heraus, (wieder nachdem diese Gemische eine Stunde bei einer Temperatur von 37° C gestanden hatten), dass sich in den Röhren, in denen das Antiserum auf die Leukocyten eingewirkt hatte, Komplement gebunden hatte, während eine schöne Haemolyse beobachtet wurde in den Kontrollröhren mit Normalserum und in denen wo das artfremde Serum auf die Leukocyten eingewirkt hatte.

Mit diesen Leukocytenlösenden Sera (die sich darin befindenden leukocytolytischen Stoffen müssen, in Bezug auf das Obenerwähnte, als echte Ambozeptoren aufgefasst werden) mussten nun Leukocyten aufgelöst und die daraus freikommenden Stoffe weiter untersucht werden. Da diese Untersuchung stattfinden würde mit Bakterien, so war es in erster Linie notwendig sterile Flüssigkeiten zu bekommen und so steril als möglich zu arbeiten. Wenn in dieser Hinsicht die erforderlichen Vorkehrungen getroffen wurden, so musste den sterilen Flüssigkeiten eine gewisse Anzahl Bakterien beigefügt werden und nachdem die Flüssigkeiten einige Zeit auf die Bakterien eingewirkt hatten, so musste die Anzahl Bakterien aus den verschiedenen Röhren gezählt werden. Wenn mittels des leukocytolytischen Serums Komplement oder andere baktericide Stoffe aus den Leukocyten entfernt werden, so durfte man erwarten, dass in diesen Röhren eine geringere Anzahl Bakterien gefunden würde. Hier will ich auch einen Augenblick die Aufmerksamkeit auf die Versuche von WASSERMANN lenken, welcher beobachtete, dass nach Leukocyteninjektionen Antikomplemente entstanden, was ihm Beweis genug war, dass die Leukocyten Komplement sezernierten.

Dass ein leukocytolytisches Serum wirklich Antikomplemente enthält, konnte ich auch folgenderweise konstatieren. Nachdem ich die minimale Quantität Komplement festgestellt hatte (0.04 c.M³) welche imstande war 1 c.M³ einer Aufschwemmung von roten Hammelblutkörperchen (mit dem doppelten Titer haemolytischen Serums sensibilisiert) aufzulösen, so fügte ich, bei dem nächsten Versuch, dieser minimalen Komplementmenge eine

gewisse Quantität Leukocytolytischen Serums gegen Meerschweinleukocyten zu und nun beobachtete ich in den verschiedenen Röhrcn Hemmung der Haemolyse, während die Röhrcn, welche normales Kaninchenserum enthielten, eine schöne Haemolyse zeigten, wie untenstehende Tabelle ausweist.

No.	Komplement.	Leukocytol. Serum Meerschw.	5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung.	Phys. Na Cl.	Inakt. Haem. Serum.	Resultat.	
1	0.04 c.M ³ .	0.3	1 c.M ³ .	Anfüllen zu gleichem Volumen.	0.0015	Hemmung	
2	0.04 »	0.2	1 »		0.0015	»	
3	0.04 »	0.1	1 »		0.0015	»	
4	0.04 »	0.05	1 »		0.0015	(teilw.)»	
5	0.04 »	0.03	1 »		0.0015	» »	
6	0.04 »	0.02	1 »		0.0015	Hämolyse	
7	0.04 »	0.01	1 »		0.0015	»	
		Normales Kaninchenserum.					
8	0.04 »	0.3	1 »		0.0015	(teilw.)»	
9	0.04 »	0.2	1 »		0.0015	Hämolyse	
10	0.04 »	0.1	1 »		0.0015	»	
11	0.04 »	0.05	1 »		0.0015	»	
12	0.04 »	0.03	1 »		0.0015	»	
13	0.04 »	0.02	1 »		0.0015	»	
14	0.04 »	0.01	1 »	0.0015	»		

Später wiesen aber GAY, MORESCHE u.a. nach, dass die Injektion aller Körpereiwesarten die Bildung komplementbindender Antikörper veranlaszt, sodass die Versuche WASSERMANN'S kein Beweis waren, dass die Leukocyten Komplement enthalten.

Kehren wir nur wieder zurück zu unsren soeben mitgeteilten Versuchen mit leukocytolytischen Sera, Leukocyten und Bakteriën, und betrachten wir die damit erzielten Resultate genauer.

Diese Versuche fanden folgenderweise statt:

Einer gewissen Quantität sterilen leukocytolytischen Serums gegen Meerschweinleukocyten (0.4 c.M³) wurde eine steril erhaltene Meerschweinleukocytenemulsion (1 c.M³) und in abnehmenden Quantitäten Komplement beigefügt. Die Kontrollversuche wurden mit normalem Kaninchenserum angestellt.

No.	Komplement.	Leukocyten- emulsion Meerschweinchen.	Leukocytol. Serum Meerschweinchen.	Resultat.
1	0.5 c.M ³	1 c.M ³	0.4 c.M ³	+ +
2	0.1 »	1 »	0.4 »	+ +
3	0.3 »	1 »	0.4 »	+ +
4	0.2 »	1 »	0.4 »	+ +
5	0.1 »	1 »	0.4 »	+
6	0.05 »	1 »	0.4 »	+
			Normales Kaninchenserum.	
7	0.5 »	1 »	0.4 c.M ³	—
8	0.4 »	1 »	0.4 »	—
9	0.3 »	1 »	0.4 »	—
10	0.2 »	1 »	0.4 »	—
11	0.1 »	1 »	0.4 »	—
12	0.05 »	1 »	0.4 »	—

Nach 16 Stunden wurden Präparate gemacht aus den verschiedenen Röhrcn und die Leukocytolyse beobachtet. Die Röhrcn 1, 2, 3 und 4 enthielten eine sehr grosse Anzahl stark degenerierte Leukocyten, während in den Röhrcn 5 und 6 eine nicht so schöne Leukocytolyse wahrzunehmen war. Betreffs der Röhrcn 7—12 mit normalem Kaninchenserum war, wie man erwarten konnte, gar nicht die Rede von Leukocyten-Degeneration. Aus jedem dieser 12 Röhrcn wurde 1 c.M³ der überstehenden, klaren Flüssigkeit genommen und diese versetzt mit 1 c.M³ einer sehr stark verdünnten Typhusbazillenkultur, worauf die Röhrcn bei 37° C. gestellt wurden. Zu verschiedenen Zeiten zwischen 2 und 24 Stunden wurden Kulturen aus den verschiedenen Röhrcn angelegt, um die Menge der Bakterien in den Röhrcn zu zählen. Um kurz zu sein, das Resultat war, dass absolut keine Differenz der Bakterienzahl in den verschiedenen Röhrcn beobachtet werden konnte. Als ich den Versuch ganz in derselben Weise wiederholte, aber nun mit Pferdeleukocyten und leukocytolytischem Serum gegen diese Leukocyten, erzielte ich ein ähnliches Resultat. Obgleich es deshalb in dieser Weise nicht gelang eine Einwirkung von Komplement oder bakteriziden Stoffen auf Bakterien nachzuweisen so ist es dagegen nicht unmöglich, dass das leuko-

cytolytische Serum das eventuelle Komplement in den Leukocyten gebunden oder vielleicht sogar vernichtet hat. Dasselbe wäre zu bemerken hinsichtlich der Versuche verschiedener Autoren, welche die Herkunft des Komplements studierten. So z. B. benutzten LIPPMANN & PLESCH (20) bei ihrem Studium die Eigenschaft des Thorium X in grossen Dosen die Leukocyten aus dem Organismus zu vernichten, und zogen dann, aus der trotzdem doch konstanten Quantität des Komplements den Schluss, dass die Leukocyten nicht als Ursprungsstätte des Komplements betrachtet werden müssen.

Gelingt es also nicht in vitro das Freiwerden von Komplement nachzuweisen, so kommt die Frage auf, ob dies vielleicht in vivo möglich ist. Die Versuche darüber wurden bei 2 Gruppen von Meerschweinchen ausgeführt. Verschiedenen Meerschweinchen wurde an 2 verschiedenen Tagen ein wenig Blut entnommen, und die minimale Quantität Komplement bestimmt, um mit einer gewissen Quantität inaktiven, haemolytischen Serums 1 c.M³ einer 5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung zu lösen. Es stellte sich heraus, dass an diesen 2 verschiedenen Tagen die bestimmten Komplementdosen bei demselben Meerschweinchen gerade gleich waren. Als der Komplementtiter der Tiere bestimmt war, so wurden einige (Gruppe A) intraperitoneal eingespritzt mit 6 c.M³ leukocytolytischen Serums gegen Meerschweinchenleukocyten und andere (Gruppe B) mit 6 c.M³ leukocytolytischen Serums gegen Pferdeleukocyten, nach welcher Injektion bei den Meerschweinchen der Gruppe A am nächsten Tage eine sehr starke Leukocytolyse zu beobachten war. 24 Stunden nach der intraperitonealen Injektion des Serums wurden alle Tiere getötet. Das erste was die Aufmerksamkeit auf sich zog war, dass alle Tiere der Gruppe A ein stark hämolytisches (weinfarbiges Serum) lieferten, was seine Ursache fand in dem Umstand, dass das eingespritzte Serum ausser leukocytolytisch auf die weisse Blutkörperchen auch hämolytisch wirkt auf die gleichartige rote Blutkörperchen, weil nicht nur weisse, sondern auch rote Blutkörperchen bei der Vorbereitung gebraucht wurden. Nun wurde die minimale Quantität des Komplements der verschiedenen Meerschweinchen aufs neue geprüft, und es stellte sich heraus, dass nicht nur die verschiedenen minimalen Komplementdosen der Gruppe B ganz dieselben geblieben waren, was zu erwarten war, sondern auch, dass bei den verschiedenen Tieren der

Gruppe A vor und nach der Injektion des leukocytolytischen Serums absolut keine Änderung in der Quantität des Komplements statt gefunden hatte, sodass ich mich, wenn die Möglichkeit einer Komplementbindung mittels des leukocytolytischen Serums beiseite gelassen wird, mit Rücksicht auf diese Versuche, rechne zu denjenigen, welche die Leukocyten nicht als die Ursprungsstätte des Komplements betrachten.

LITERATUR.

1. SCHNEIDER. Archiv f. Hyg. 1908. Bd 65 S. 305.
 2. DENYS, KAISIN und HAVET. La cellule 1892. T. 9 & 10.
 3. BÜCHNER. Münch. med. Wochenschr. 1894. S. 469.
 4. GRUBER. Wiener Klin. Wochenschr. 1903.
 5. HOKE. Zentr. bl. f. Bakt. Orig. Bd. 34. S. 692.
 6. METCHNIKOFF. Ann. de l'Inst. Pasteur 1893. 1894. 1895.
 7. LANDSTEINER. Zentr. bl. f. Bakt. Orig. Bd. 25. S. 548.
 8. LAMBOTTE und STIENNON. Zentr. bl. f. Bakt. Orig. Bd. 40. S. 224, 393, 503.
 9. NEUFELD. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. 28. S. 125.
 10. MOXTER. Deutsche med. Wochenschr. 1899. S. 687.
 11. METCHNIKOFF. Ann. de l'Inst. Pasteur. Bd. 13. 1899.
 12. DELEZENNE. Compt. rend. de l'Acad. d. Sciences. 1900. Bd. 130.
 13. FUNCK. Zentr. bl. f. Bakt. 1900. Bd. 27.
 14. BIERRY. C. R. Soc. de Biol. 1902. Bd. 26.
 15. FLEXNER, University of Pennsylvania med. bull. 1902. no. 9.
 16. CHRISTIAN. Deutsch. Archiv f. Klin. Med. 1904. Bd. 53.
 17. CESARIS, DEMEL und SOTTI. Archiv per le science med. 1907. Bd. 31.
 18. FRANÇA. Soc. de Biol. 2 Mars 1901.
 19. LESCHKE. Zeitschr. f. Imm. forsch. Bd. 16 p. 627.
 20. LIPPMANN und PLESCH. Zeitschr. f. Imm. forsch. Bd. 17 p. 548.
-

ANALOGIE ZWISCHEN NÄHRUNGSWERT VERSCHIEDENER KÖRPER FÜR *Penicillium glaucum* UND IHRE NARKOTISCHE WIRKUNG.

VON

DR. H. I. WATERMAN.

E. OVERTON, HANS MEYER und dessen Schüler haben für das Zustandekommen der Narkose bei mehreren Organismen Gesetze allgemeiner Gültigkeit gegeben. Festgestellt wurde, dass die narkotische Wirkung wässriger Lösungen neutral reagirender Körper nur durch das Verhältnis der Löslichkeiten der gelösten Substanz in Lipoid und in Wasser bedingt wird. Je grösser der Teilungskoeffizient Lipoid : Wasser, desto kräftiger ist die narkotische Wirkung. 1)

Während OVERTON diesen Satz hauptsächlich in qualitativer Hinsicht ausgearbeitet hat, ist die quantitative Seite grösztenteils von HANS MEYER c. s. studiert worden.

Die genannten Forscher haben die Narkose hauptsächlich bei Kaulquappen in Anschauung genommen, während ich die hemmende Wirkung von verschiedenen Körpern in wässriger Lösung auf die Entwicklung von *Penicillium glaucum* beobachtet habe.

Für die ausführliche Beschreibung meiner Versuche verweise ich nach meiner Dissertation 2).

Ich beobachtete, dass auch die hemmende Wirkung auf die Entwicklung von *Penicillium* nur bedingt wird durch das

1) Zwar gibt es Ausnahmen, diese können aber in einfacher Weise erklärt werden.

2) Over eenige factoren, die de ontwikkeling van *Penicillium glaucum* beïnvloeden, Delft 1913.

Verhältnis der Löslichkeiten der betreffenden Verbindungen in Öl resp. Lipoid und in Wasser.

Einige der wichtigsten Beispiele findet man in der Tabelle.

TABELLE.

NAMEN DER VERBINDUNG.	TEILUNGSZAHL 1) BEI 25°.	HEMMENDE WIRKUNG.
o. — Toluylsäure	40,5	++++
p. — Toluylsäure	29,5	++++
Benzoësäure	12,6	+++
Salicylsäure	11,8	+++
Phenol	9—10,3	++
Terephtalsäure	9—9,5	++
Guajacolcarbonsäure	3,7	++
2.4 — Dioxybenzoësäure	1,0	+
p. — Oxybenzoësäure	0,6	—
m. — Oxybenzoësäure	0,4	—
2.5 — Dioxybenzoësäure	0,3	—
3.4 — Dioxybenzoësäure	0,06	—
Resorcin	0,04	—
3.4.5 — Trioxybenzoësäure	0,025	—
o. — Phtalsäure	0,01	—

Ebenso wie die narkotische Wirkung wässriger Lösungen neutral reagirender Körper auf Kaulquappen ist also die hemmende Wirkung auf die Entwicklung von *Penicillium glaucum* nur abhängig von der Verteilung der gelösten Substanz zwischen Lipoid und Wasser.

Ja, die Analogie ist sogar noch grösser. Ich beobachtete nämlich, dass die hemmende Wirkung auf *Pen. gl.* und die narkotische auf Kaulquappen bei Konzentrationen derselben Gröszenordnung auftreten. Dies ist z. B. bei Methylalkohol, Aethylalkohol und Phenol der Fall. 2)

1) Teilungszahl: $\frac{\text{Gramme der gelösten Substanz pro 100 Gr. Olivenöl.}}{\text{Gramme der gelösten Substanz pro 100 Gr. Wasser.}}$

2) E. OVERTON, Studien über die Narkose, Jena 1901.

Auf Grund dieser Tatsachen glaube ich mich zur Annahme berechtigt, dass die hemmende Wirkung resp. das nicht zur Entwicklung kommen von *Pen. gl.* auf wässerigen Lösungen der narkotischen Wirkung der betreffenden Substanz zuzuschreiben ist.

Vielleicht wird man noch einmal im Stande sein auf direktem Wege Narkose bei *Penicillium glaucum* zu beobachten.

Eine sehr bemerkenswerte Tatsache ist es, dass wässrige Lösungen vieler Narkotica für *Pen. gl.* bei niedrigen Konzentrationen ausgezeichnete Kohlenstoffquellen sind. Dieses habe ich z. B. für Phenol, Para- und Metaoxybenzoësäure und zahlreiche andre Narkotica festgestellt.

Hierdurch was es auch auszerordentlich leicht nach zu forschen ob Zusammenhang besteht zwischen dem Nahrungswert der betreffenden Körper für *Penicillium* und ihrer narkotischen Wirkung. Wässrige Lösungen der hierzu geeigneten anorganischen Nährsalzen wurden mit Sporen des Pilzes geimpft und die Entwicklung unter dem Einfluss und auf Kosten des betreffenden organischen Körpers bei verschiedener Konzentration beobachtet.

Als Beispiel wähle ich an erster Stelle die Meta-oxybenzoësäure ($C_6 H_4 \cdot O H \cdot C O O H$.)

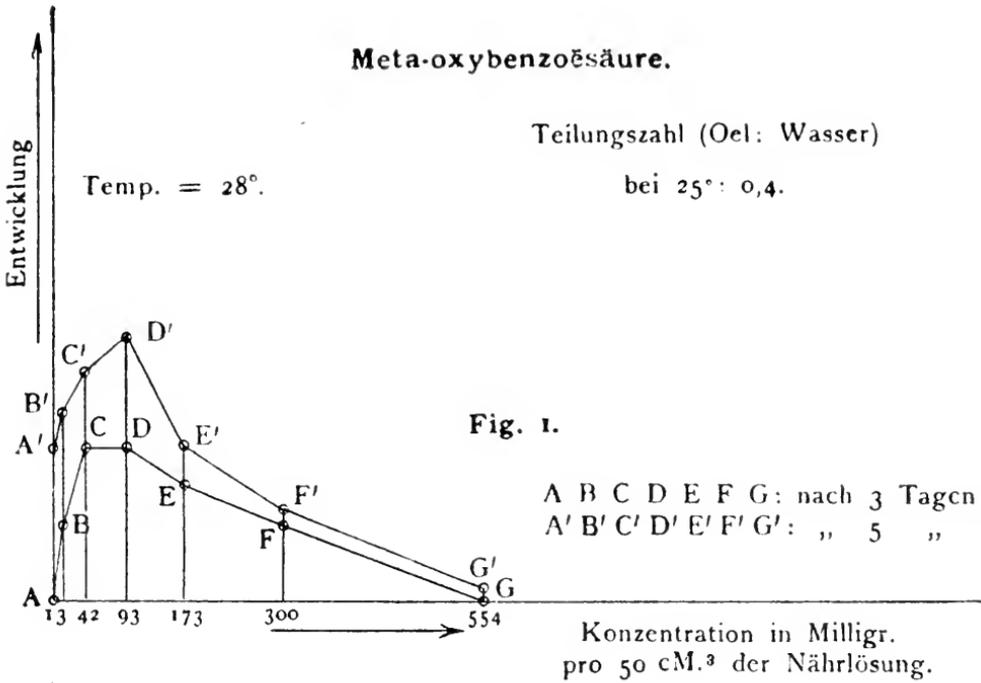
Der Grad der Entwicklung auf Lösungen von resp. 4, 13, 42, 93, 173, 300 and 554 Milligrammen Metaoxybenzoësäure pro 50 cM.³ wird durch die Grösze der Ordinate angegeben. (Fig. 1).

Die Kurve A B C D E F G (nach 3 Tagen) gibt also an die Abhängigkeit der Quantität der gebildeten Pilzsubstanz von der Konzentration der Lösung, während A¹, B¹, C¹, D¹, E¹, F¹, G¹ die Sachlage nach 5 Tagen darstellt.

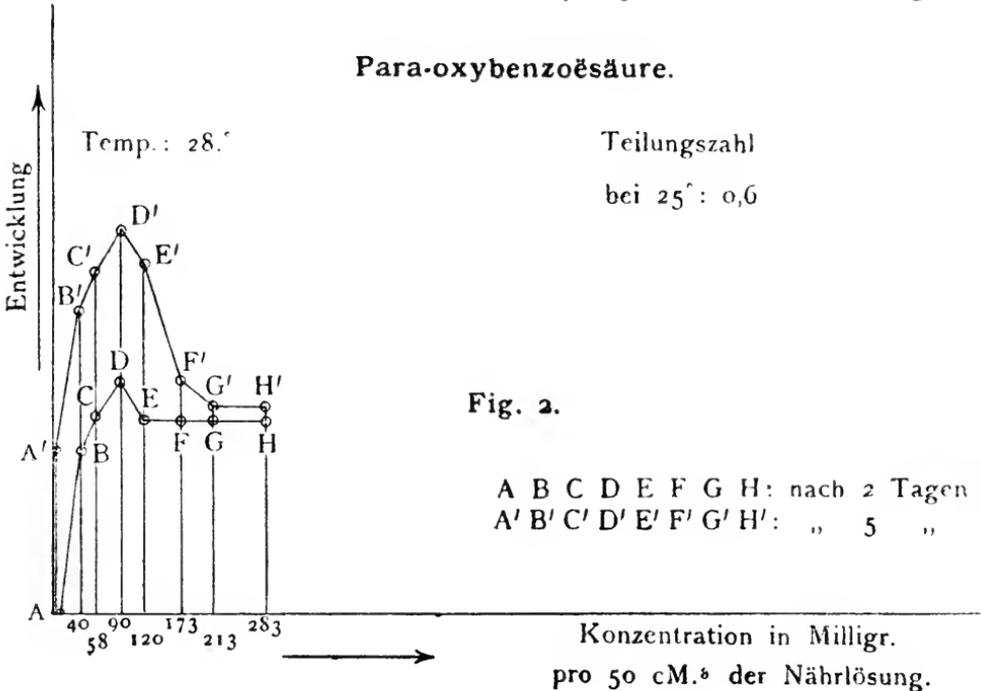
Diese graphischen Darstellungen haben nur qualitativen und keinen quantitativen Wert, da die Quantität der gebildeten Pilzsubstanz mit dem Auge geschätzt worden ist.

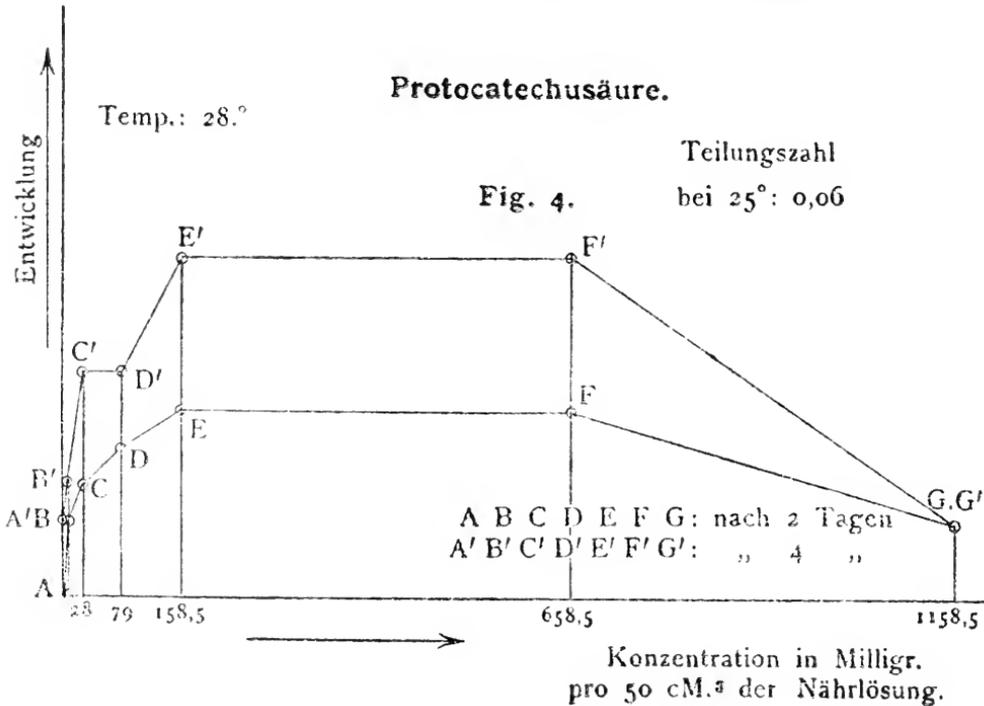
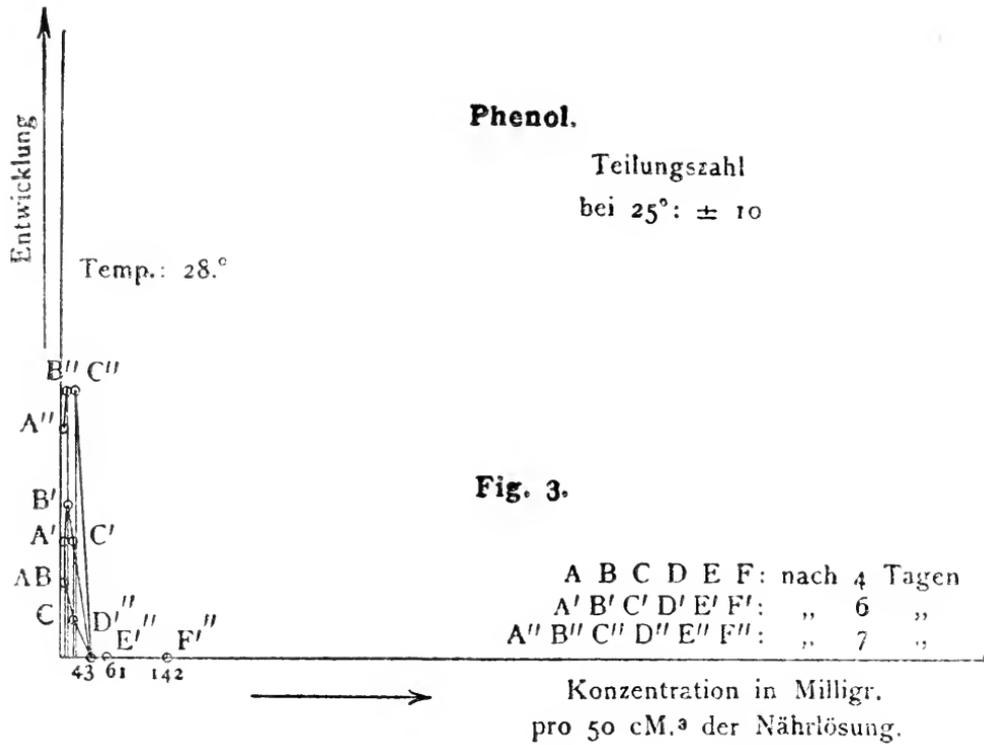
Eine genaue Wägung würde übrigens wegen des geringen Gewichtes der entstandenen Pilzsubstanz nicht möglich sein, wenigstens nicht bei einer solchen kurzen Versuchsdauer. Die letztere kann nl. nicht zu lange sein, da sonst die Konzentrationserniedrigungen in Folge der Assimilation der Kohlenstoffquelle, eine weitere Vergleichung verhindern.

Meta-oxybenzoësäure.



Para-oxybenzoësäure.





Eine Erhöhung der Konzentration der Metaoxybenzoësäure hat also eine raschere Entwicklung des Pilzes zufolge (A—B—C). Erst in D (ca 0,2% Lösung) wird ein Maximum erreicht. Dies ist also die für eine rasche Entwicklung günstigste Konzentration. Bei noch grösseren Konzentrationen beobachtet man schon eine deutliche Hemmung der Entwicklung und bei G hat gar keine Entwicklung stattgefunden. Hier sind wir vom Narkosezustand nicht weit entfernt. Doch beginnt nach 5 Tagen eine, sei es auch, spärliche Entwicklung.

Der Verlauf der Kurve A B C D E F G ist massgebend für den Nahrungswert der betreffenden Substanz. Wir können n., wie wir oben gesehen haben, aus diesem Verlaufe schliessen bei welcher Konzentration rasche Entwicklung stattfinden wird.

Die Lage von A B C D E F G wird einzig und allein bedingt durch den Endpunkt d. i. der Punkt, wo diese Kurve die horizontale Achse schneidet. In Fig. 1 ist dieser Punkt: G. Oder, mit andren Worten: der Nahrungswert der in Tabelle I genannten, sich für *Pen. gl.* neutral verhaltenden Körper, ist abhängig von ihrer narkotischen Wirkung.

Um diesen Satz mit einigen Beispielen zu erläutern findet man in Fig. 2, 3 und 4 die analogen Nahrungswertkurven oder Narkotisierungskurven der Paraoxybenzoësäure, des Phenols und der Protocatechusäure.

Man sieht, dass bei der Paraoxybenzoësäure, einer Substanz mit einer der Metaoxybenzoësäure praktisch gleichen narkotischen Wirkung (T. z. = 0,6), die Kurve mit dem Nahrungswertkurve des letzteren Körpers (Fig. 1) fast identisch ist.

Beim Phenol (Fig. 3) ist die Sachlage eine ganz andre. Der Narkosezustand tritt hier schon viel früher ein (Punkt D). Bei der Protocatechusäure ist der Narkosezustand, der niedrigen Teilungszahl (0,06) wegen, sehr stark nach rechts verschoben.

Die günstigste Konzentration, wo die Entwicklung rasch eintritt, ist also nur bedingt durch die narkotische Wirkung der betreffenden Verbindungen. Je stärker das Narkotikum, bei desto niedrigeren Konzentrationen liegt das Maximum der Kurve. Rechts vom Maximum hat die narkotische Wirkung eine Hemmung der Entwicklung zufolge, in den Figuren angegeben durch das kleiner Werden der Ordinate bei Zunahme der Konzentration.

Dies ist die notwendige Konsequenz der Tatsache, dass die

Organismen nicht sofort auf einmal narkotisiert werden, sondern in zunehmendem Maße bei Erhöhung der Konzentration des Narkotikums. An der linken Seite des Maximums übt die narkotische Wirkung einen günstigen Einfluß aus und letzterer ist schon bei sehr geringen Konzentrationen merkbar, wenn die narkotische Wirkung sehr stark ist.

Diesem Umstande müssen wir es auch zuschreiben, daß kleine Quantitäten Phenol, Salicylsäure, viel rascher Entwicklung veranlassen als gleich konzentrierte Lösungen anderer Verbindungen mit niedriger Teilungszahl Oel: Wasser, wie Paraoxybenzoesäure, Gallussäure, Protocatechusäure. Kleine Quantitäten Paraoxybenzoesäure geben wegen desselben Umstandes raschere Entwicklung als die Gallussäure und Protocatechusäure.

Mit diesen Beispielen meine ich in befriedigender Weise die Analogie, welche zwischen Nährwert und Narkose besteht, dargelegt zu haben.

Meine Betrachtungen gelten aber nur für die neutralen Narkotica d. h. diejenige, welche nicht wegen grosser Wasserstoff- oder Hydroxylionenkonzentration, oder wegen einer ausgeprägten chemischen Reaktionsfähigkeit u. s. w. schon bei niedrigen Konzentrationen aus anderem Grunde einen schädlichen Einfluß ausüben. Bei den neutralen Narkotica haben wir immer gesehen, daß ein Übermaß schadet, daß kleine Quantitäten keinen schädlichen, sondern einen günstigen Einfluß ausüben.

Wir finden diesen Satz zurück, auch bei in Lipoid nicht löslichen Substanzen. Ich denke hier an erster Stelle an meine Versuche mit *Aspergillus niger*, welche dargetan haben, daß in vielen Hinsichten ein Übermaß aller Nahrungsstoffe: der Kohlenstoffquelle, des Phosphors, des Stickstoffs, der Gifte u. s. w. immer in derselben Weise wirksam ist.

Nur die Grenzen der Gebiete verschiedener physiologischer Wirksamkeit wechseln bei den chemischen Verbindungen. Es ist nun unsere Aufgabe diese Grenzen bei vielen Organismen festzustellen. In zweierlei Hinsicht wird dies zumal bei den Narkotica Bedeutung haben: erstens zur Bekämpfung vieler schädlichen Organismen und zweitens um für andre vorteilhafte Lebensbedingungen zu erhalten.

[Aus dem Laboratorium für Vergleichende Pathologie in *Leiden* und dem Institut für Parasitäre und Infektionskrankheiten in *Utrecht*,
Direktor: Prof. dr. D. A. DE JONG].

INDOLREAKTIONEN BEI PROTEUSBACILLEN,

VON

Dr. E. A. R. F. BAUDET.

Bei Untersuchung auf Indolbildung eines *Proteus vulgaris*, aus dem Harn eines Patienten der chirurgischen Klinik von Prof. KORTEWEG in *Leiden* gezüchtet, ergab sich, dass die Nitrosoindolreaktion (SALKOWSKI-KITASATO) positiv ausfiel, jedoch die Reaktion EHRLICH negativ.

Schon mehrere Forscher erwähnten analoge Befunde.

STEENSMA (1) hat in einem Fall von Pneumatric aus dem Harn einen *Proteusbacillus* gezüchtet, welcher nach der Methode SALKOWSKI eine rote Farbe zeigte. Diese Farbe wurde jedoch, wie der Verfasser ausführlich betont nicht von Indol veranlasst. Im *Destillat* war denn auch kein Indol nachzuweisen.

VAN LOGHEM und VAN LOGHEM—POUW (2 u. 3) züchteten aus einem Abzes einen *Proteusbacillus*, welcher kein Indol bildete und von ihnen *Proteus anindologenes* genannt wurde.

Nach der Methode SALKOWSKI bildete dieser anindologene Stamm jedoch eine rote Farbe, ein wenig stärker als die des Indols, während alle anderen Indolreaktionen negativ verliefen. Auch im *Destillat* konnte man kein Indol nachweisen.

Später untersuchten sie 30 *Proteus*-Stämme, welche aus Darminhalt und Faeces isoliert waren, wovon 27 Indol bildeten. Die 3 übrigen zeigten nach SALKOWSKI eine rote Verfärbung, intensiver als das Indolrot, welcher Stoff jedoch nicht im *Destillat* zu finden war.

Die Methode SALKOWSKI war also nicht zuverlässig.

Es wurden von mir verschiedene der bekannten Indolreak-

tionen nachgeprüft, hauptsächlich an 5 *Proteus*-Stämmen, wovon 4 anindologene:

I. *Proteus indologenes* von KRÁL, mir, ebenso wie Stamm II in liebenswürdiger Weise von Herrn Dr. J. J. VAN LOGHEM überlassen.

II. *Proteus anindologenes* aus einem Fall von Pneumaturie.

III. *Proteus anindologenes* aus Harn.

IV. *Proteus anindologenes* aus Harn.

V. *Proteus anindologenes* aus einen Fall von Lungenempyem. Nos. III, IV u. V würden aus Material der chirurgischen Klinik von Prof. KORTÉWEG in Leiden gezüchtet.

Also waren unter 30 *Proteus*-Stämmen, welche VAN LOGHEM aus Darminhalt isolierte, nur 3 anindogene, während die 4 *Proteus*-Stämme aus Harn und Lungenempyem obengenannt, alle anindologen waren.

Die anindologischen Stämme wird man also vielleicht am häufigsten ausser dem Darminhalt finden können.

Der Nachweis des Indols geschah:

A. In der üblichen *Pepton-Kochsalz Nährlösung* (1 % Pepton und $\frac{1}{2}$ % Na Cl.).

B. Im *Destillat* der Kulturen.

C. In der Nährlösung von ZIPFEL.

D. In dem Nährboden von BERTHELOT.

Als dann wurden die folgenden Reaktionen angewandt:

1^o. Die *Nitrosoindolreaktion* (SALKOWSKI (31):

Bei 10 cc. Kulturflüssigkeit wird zugesetzt: 1 ccm. einer 0.02 % Schwefelsäure. Bei positiver Reaktion tritt eine rotviolette Farbe auf (Nitrosoindol).

2^o. *Methode EHRlich* (4):

Bei 10 ccm. Kulturflüssigkeit wird zugesetzt: 5 ccm. einer Paradimethylamidobenzaldehydlösung und 5 cc. einer gesättigten Lösung Kaliumpersulfats.

Die erste Lösung enthält P.-dimethylamidobenzaldehyd 4, Alkohol (96 %) 380 und konzentrierte Salzsäure 80. Bei positiver Reaktion tritt eine rotviolette Farbe auf.

3^o. *Nitroprussid-Reaktion*:

Zusatz bei 10 ccm. Kulturflüssigkeit von 1 cc. Natronlauge 20 %, 1 cc. Nitroprussidnatrium 1—2 % (frisch bereitet) und Eissesig im Ueberschuss. Bei positiver Reaktion entsteht ein hell blaue Farbe.

4°. *Methode MORELI* (4):

Streifen Fliesspapier mit gesättigter Oxalsäurelösung getränkt, nachher getrocknet und dann über der Kultur zwischen Wattendropf und Glaswand geklemmt. Bei positiver Reaktion entsteht eine rotviolette Farbe des Fliesspapiers.

A. **Nachweis des Indols in den Pepton-Kochsalzlösungen.**

1°. Die Versuche wurden in der Weise angestellt dass gleichzeitig verschiedene Röhrchen mit 10 ccm. Pepton-Kochsalzlösung mit einer Oese der Proteus-Kulturen geimpft, bei 37° C gebrüet und nun täglich oder zweitäglich auf kvalitative Indolbildung mittels den 4 obengenannten Reaktionen untersucht wurden. Bei der Methode SALKOWSKI ergab sich dass bei den 4 anindologen Stämmen einige Male eine rote Farbe entstand, eine positive Indolreaktion vortäuschend, welche um so stärker wurde je älter die Kultur und je grösser die Konzentration der zugesetzten Schwefelsäure war.

Diese anscheinend positive Indolreaktion entstand:

Bei Stamm II nach 2 Tagen

» » III » 3 »

» » IV » 5 »

Diese rote Farbe war jedoch nicht die typische Nitrosoindol-Farbe, sondern mehr hellrot. Auch bei diesen scheinbaren positiven Indolreaktionen konnte man die rote Farbe etwas intensiver machen durch leichtes Erwärmen, wie auch von NONOTTE und DEMANCHE (6) bei positiven Indolreaktionen beschrieben wird.

Nach PETRI (7) soll bei der Nitroso-Indolreaktion auch das Verhältnis von Schwefelsäure und Nitrit ein bestimmtes sein, namentlich wenn der Nährboden gelblich gefärbt ist, weil sonst nimmer schöne Reaktionen auftreten. Er beschreibt eine alte Milzbrandkultur, welche nach Beimischung von 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 0.01 % Nitrit eine schwache rosa Farbe zeigte. Diese Farbe ist jedoch meiner Meinung nach vielleicht der starken Konzentration der Schwefelsäure zuzuschreiben da ich öfters beobachten konnte, dass wenige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure in dem Nährboden eine braunrote Farbe veranlassen können. MAASZEN (17) hat ähnliches

erwähnt. Mit Pepton-Kochsalzkulturen von *Bacillus Proteus* anindologenes (Stamm II), stellte ich folgenden Versuch an:

Täglich wurden 2 Kulturen nach der Methode SALKOWSKI auf Indol geprüft: die eine erhielt 1 ccm. Nitrit und 1 ccm. konzentrierte Schwefelsäure, die andere 1 ccm. Nitrit und 1 ccm. 10 prozentige Schwefelsäure. Am 3^{ten} Tag beobachtete man in der 2^{ten} Kultur nach Anwendung der Reaktion keine Verfärbung, während die erste eine deutliche dunkelrote Farbe zeigte, welche nach leichter Erwärmung stärker wurde, und sich zum Teil in Amylalkohol löste.

Bei einer Typhuskultur, zwei Paratyphuskulturen und dem anindologen Stamm I in Pepton-Kochsalzlösung geimpft, welche während 10 Tage gleichzeitig täglich auf Indolbildung untersucht wurden, ergab die Nitrosoindolreaktion bei den drei ersten immer negative Resultate, während die Kulturen des I Stammes schon nach 24 Stunden eine intensiv rotviolette Farbe zeigte. Aus diesem Versuch geht hervor, dass bei anindologischen *Proteus* Kulturen in Pepton-Kochsalzlösungen nach der Methode SALKOWSKI positive Indolreaktionen auftreten können. Später werden wir sehen, dass diese Reaktionen nicht durch Indol veranlasst werden.

29. Mit der Methode EHRlich bekam ich immer richtige Resultate. Bei den anindologischen Stämmen gab sie negative Reaktionen, während sie in der Kultur des indologischen Stammes nach 18 Stunden eine intensive Reaktion hervorrief.

Wie auch GAUTHIER (8) behauptet, verläuft die Reaktion auch richtig ohne Zusatz von Kaluimpersulfat.

Die Salzsäure habe ich, wie auch ZIPFEL (9) erwähnt, getrennt zugesetzt. Sie wurde mittels einer Pipette auf den Boden des Kulturröhrchen gebracht und bei Anwesenheit von Indol erhielt man einen scharfen rotvioletten Ring.

Es gibt noch einige Stoffe welche mit Paradimethylamido benzaldehyd eine ähnliche Reaktion zeigen wie mit Indol, z. B.: Phloroglucine (GAUTHIER 8), Phenylmethylpyragalon (ZIPFEL 9), Acetylglucosamine (RHODE 10), aber diese Stoffe kommen praktisch nicht in Betracht.

Der Amylalkohol, welche fast immer noch zum Ausschütteln des Farbstoffes bei der EHRlich'schen Methode angewandt wird, soll aber mit Vorsicht benutzt werden, da ich bei einer Unter-

suchung auf Indolbildung des Stammes II folgendes beobachtete:

Die Kulturen wurden während 18 Tage täglich auf Indol geprüft, gleichzeitig in Pepton-Kochsalzlösungen und mittels Destillation, und nach Zusatz der EHRlich'schen Lösung an die Kulturen mit Amylalkohol ausgeschüttelt. Vom 6^{ten} Tag ab sah man nach dem Ausschütteln mit Amylalkohol intensiv rote Verfärbungen, während im Destillat kein Indol nachzuweisen war. Nun ergab sich das der Amylalkohol, welchen ich diesen Tag neu erhalten hatte, mit EHRlich's Reagens eine Farbe zeigte, der Indolreaktion ähnlich. Dass in den ersten Tagen keine Reaktion in den Röhren aufgetreten war, ist also dem Amylalkohol zuzuschreiben, da man nicht mit allen Amylalkoholen die Reaktion erhält. Von 5 verschiedenen Amylalkoholproben, welche ich mit EHRlich's Reagens untersuchte, zeigten 2 eine Indolähnliche Reaktion.

PORCHER (1) und TELLE und HÜBER (2) haben also mit Recht auf diese wichtige Tatsache schon hingewiesen.

Ebenso wenig eignet sich Benzin zum Ausschütteln des Farbstoffes, da die meisten Handelsbenzine mit Salzsäure eine rote Farbe zeigen. DENIGÈS (13).

3^o. Die Nitroprussid Reaktion ist auch zu empfehlen. Sie gibt richtige Resultate, ist aber nicht so empfindlich wie die Ehrliche Reaktion. Die Nitroprussidlösung soll immer frisch bereitet sein, sonst kann ohne Indol nach Zusatz von Eisessig eine blaue Farbe auftreten.

4^o. Bei der methode MORELLI (14) wird die positive Reaktion (rotviolette Verfärbung des Fliesspapiers), veranlasst durch das flüchtige Indol. Diese Reaktion, welche natürlich abhängig ist von der Menge Indols welche gebildet wird, tritt nicht so schnell auf (innerhalb einigen Stunden bis einigen Tagen), aber sie ist doch immer zuverlässig. Da die Menge des Indols mit dem Alter der Kulturen steigt, wie auch DE GRAAFF (15) erwähnt beim *Bacillus Coli*, so kann bei der Methode MORELLI die Reaktion einige Zeit ausbleiben.

B. Nachweis des Indols im Destillat der Kulturen.

Die Destillation des Indols, welche angewand wird zur Bestimmung der *quantitativen* Indolmenge (STEENSMA (1), DE

GRAAFF (15), eignet sich auch sehr gut zur *kwalitativen* Indolbestimmung. Ich habe die Methode gefolgt, welche DE GRAAFF bei der Destillation seiner Kulturen angewandt hat; diese ist folgende: (Vergleiche die Figur). In die 2te Kolbe bringt man 50 ccm. der zu untersuchen Kulturlösung (1 % Pepton — $\frac{1}{2}$ % Kochsalz) und 100 ccm destilliertes Wasser. In der erste Kolbe befindet sich nur destilliertes Wasser. Beide Kolben werden zum Kochen gebracht und dann mit einander durch ein Gummischlauch verbunden, während die 2te Kolbe nun auch mit einem Wasserkühlapparat in Verbindung gebracht wird. Das Destillat wird in einem Glas mit ein wenig destilliertem Wasser aufgefangen. An der 1sten Kolbe befindet sich noch ein ziemlich langer Glasrohr, welcher als Sicherheitsapparat dient.

Bei Anwesenheit des Indols kann das schon in den ersten Tropfen des Destillats mittels einer der genannten Methoden gezeigt werden, mit Ausnahme derjenigen des MORELLI (14). Bei letzterer Methode kann das Auftreten der Reaktion einige Stunden ausbleiben. Wenn nun eine positive Indol Reaktion auftritt, kann diese nur von Indol veranlasst sein. Bei allen anindologenen Stämmen sah man negative Resultate, ebenso wie bei den Typhus- und 2 Paratyphusstämmen. Auch bei längeren Wachstum der Kulturen (die Destillation der Kulturen geschah innerhalb 20 Tage 5 mal) erwies sich das Resultat negativ.

Die Indolbildenden Kulturen: 2 Colistämme und Proteus Stamm I, ergaben wie schon erwähnt in den ersten Tropfen des Destillats eine intensive Reaktion.

PORCHER (16) hat nun behauptet, dass bei der Destillation positive Indolreaktionen entstehen können, selbst wenn kein Indolbildender Microorganismus anwesend ist. So hat er bei Destillation der Kulturen von Milzbrandbacillen, Staphylococcus aureus, Bac. enteritidis GÄRTNER und Varietäten des Bacillus faecalis, Indol gefunden. Nach ihm können diese Bakterien unter normalen Umstände das Eiweiss aus dem Nährboden zerlegen bis »indolcarbonique«. Letzteres wird nun durch die Wärme der Destillation gespalten in Kohlensäure und Indol. Ausserdem können nach PORCHER und PANISSET (18) die meisten Peptone kleine Mengen Indol enthalten, welche man, um keine Fehler bei der Indolreaktion zu erhalten, vorher durch Aetherextraktion entfernen soll. Nach ZIPFEL (9) aber unterscheidet sich die in

einer Peptonnährlösung auftretende Farbstoff von dem welche durch Indol veranlasst wird, dadurch, dass die erstere nicht löst in Chloroform und nach Zusatz von Nitrit blau wird, während bei Indol eine intensiv rote Farbe auftritt.

Ich habe 10 Milzbrand Kulturen und 8 Staphylococcus aureus Kulturen (1—21 Tage alt) mittels Dampf destilliert, einige so weit wie möglich, ohne dass Indol im Destillat nachzuweisen war.

Die Möglichkeit bleibt aber bestehen dass bei der lang fortgesetzten Destillation für die *kwantitative* Indolbestimmung durch die entstehende Wärme eine Abspaltung des Eiweisses bis »Indol« stattfinden kann, während die Kultur unter normalen Umständen kein Indol bildet. Zur *kwalitativen* Indolbestimmung genügt es wenn man nur kurze Zeit destilliert, sodass die Gefahr für Weitere Zerlegung des Eiweisses aus den Nährboden gering ist.

Die Destillation der Kulturen ist nach meiner Meinung eine der besten Methoden zur kwalitativen Indolbestimmung.

C. Nachweis des Indols in der Nährlösung von ZIPFEL.

Die Destillation der Kulturen, obwohl eine sehr gute, bleibt jedoch immer eine zeitraubende Methode. Es ist darum, dass eine Methode von ZIPFEL (9) beschrieben, als mehr praktisch im Laboratorium, zu benutzen ist.

In seiner Arbeit sagt er:

»Die indolpositiven Mikroorganismen decken, wenn ihnen gleichzeitig verschiedene Stickstoffquellen dargeboten werden, ihren Stickstoff bedarf vornehmlich aus der im Tryptophanmoleküle enthaltenen Aminogruppe, indem sie das Tryptophanmolekül sprengen und daraus Indol frei machen, das wir dann mit unseren Reagentiën nachweisen können, den indolnegativen Organismen sagt diese Stickstoffquelle nicht zu.«

ZIPFEL hat daher eine Tryptophanlösung zusammengesetzt, worin bei Kultivierung indolpositiver Mikroorganismen, der Indol nur aus dem Tryptophan gebildet werden kann.

Erst nahm er folgende Lösung:

Asparaginum.

Ammon. lactic. aà 5.

Dikaliumphosph. 2.

Magnesiumsulf. 0.2.

Aqua dest. ad 1000.

und hierbei Tryptophan bis eine 0.03 % Lösung entsteht. Später hat er die Lösung ein wenig geändert, wie folgt:

Tryptophan 0.3 g.

Ammon. lactic.

Kalium phosphor. secc. à 5.0.

Magnes. sulf. 0.3 g.

Aqua dest. 1000.

Ich habe faktisch nur die letztere Lösung benutzt.

Die Vorteile dieser Lösung sind:

1^o. Wegen seiner Klarheit wird, wie im Destillat, die geringste Verfärbung in der Lösung bemerkt.

2^o. Die Indolreaktion kann nur entstehen durch das freimachen des Indols aus dem Tryptophan, also wie ZIPFEL sagt, bedarf es keine weitere Identifizierung des entstandenen roten Farbstoffes.

Die Proteusstämme, 2 Coli- und 2 Paratyphusstämmen und 1 Typhusstamm wurden von mir in die ZIPFEL'sche Lösung geimpft, von jedem 10 Röhrchen. Der Hälfte der Röhrchen war 2 % Traubenzucker zugesetzt um nach ZIPFEL das Wachstum zu fördern.

Alle Kulturen waren nach 24 Stunden gleichmäßig getrübt und die Kulturen mit Traubenzucker zeigten ein üppiges Wachstum.

Nach 15 Stunden wurden die 4 Reaktionen angestellt. Sie waren bei den indolpositiven Kulturen noch nicht deutlich, bei den nicht indolbildenden Kulturen negativ.

Nach 30 Stunden zeigten die indolpositiven Kulturen eine intensive Indolreaktion mit den 4 erwähnten Methoden. Die indolnegativen Kulturen ergaben alle wieder negative Resultate. Auch bei älteren Kulturen erhielt man immer richtige Resultate.

Die Methode SALKOWSKI, welche in den Pepton-Kochsalzlösungen bei Stamm II, III und IV unrichtig angezeigt hatte, verlief hier negativ.

Die Lösung von ZIPFEL ist also sehr zu empfehlen.

Der Vollständigkeit halber erwähne ich hier noch eine Methode von RIVAS (19), welcher Pepton, das vorher mit Trypsin digeriert ist, als Nährsubstrat verwendet. Es gelang ihm auf diese Weise schon nach 6 Stunden Indol in Coli-Kulturen nachzuweisen.

D. Nachweis des Indols in den Nährboden von Berthelot.

Neulich hat BERTHELOT (20) mitgeteilt, dass er durch Impfung in einen bestimmten Nährboden, den *Proteus anindologenes* wieder in einen indologenen *Proteus* übergeführt hat. Dieser Nährboden war folgenden:

Wasser 1000.

Di-Kaliumphosphat 1.50.

Magnesiumsulfat 50.

Tryptophan 1.50.

Glycocolum 1.00.

Glutarsäure 0.30.

Natrium asparaginicum 1.00.

Alanin 0.50.

Calciumchlorat 0.02.

Ausserdem wurde noch 50 Gr. reine Gelatine (welche kein Tryptophan enthielt) zugesetzt.

In diesen Nährboden sind die 4 anindogene *Proteus* Stämme geimpft, die Hälfte der Kulturen bei 22° C. und die übrigen bei 37° C. gestellt. Die Kulturen zeigten aber noch einigen Tagen nur geringes Wachstum. Als aber die Stämme später in denselben Nährboden, welche vorher ein wenig alkalisch gemacht worden war, geimpft wurden, so sah man nach 24 Stunden ein üppiges Wachstum. Nun wurde destilliert nach 4, 8 und 12 Tagen, aber niemals habe ich Indol in Destillat nachzuweisen können, obschon BERTHELOT innerhalb dieser Zeit positive Resultate bekam.

Ich habe also die von BERTHELOT erhaltenen Resultate nicht bestätigen können.

Zusammenfassung.

Um bei der praktischen qualitativen Indolbestimmung zuverlässige Resultate zu erhalten, sind folgende Punkte zu beobachten:

1°. Das P.-dimethylamidobenzaldehyd-Reagens nach EHRlich ist wegen seiner Empfindlichkeit zu empfehlen.

2°. Als *Nährlösung* ist immer die ZIPFEL'sche Lösung zu verwenden.

3°. In *Ermanglung* der ZIPFEL'schen Lösung, werden nur mittels *Destillation* der Kulturen richtige Resultate erhalten.

L I T E R A T U R.

1. STEENSMA. *Centrallbl. f. Bakt. u. s. w. Origin.* Bd. 41, p. 295.
 2. J. J. v. LOGHEM. *Id. id. u. s. w. Origin.* Bd. 38, p. 425.
 3. SALKOWSKI. *Id. id. Origin.* Bd. 51, p. 476.
 4. EHRLICH. *Id. id. Origin.* Bd. 40, p. 219.
 5. v. LOGHEM u. v. LOGHEM—POUW. *Id. id. Origin.* Bd. 66, p. 19.
 6. NONOTTE et DEMANCHE. *C. R. Soc. de Biol.*, p. 658. 1908.
 7. PETRI. *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt.* Bd. 6, p. 7.
 8. GAUTHIER. Thèse par Louis Gauthier, Université de Lyon.
 9. ZIPFEL. *Centralbl. f. Bakt. u. s. w. Origin.* Bd. 64 u. Bd. 67, pg. 572.
 10. RHODE. *Zeitschr. phys. Chem.* Bd. 44, p. 161.
 11. PORCHER. *Communication de la Soc. chim. de France.* Mars 1910.
 12. TELLE u. HUBER. *Centralbl. f. Bakt. u. s. w. Origin.* Bd. 58, p. 70.
 13. DENIGÈS. *C. R. Soc. Biol.* Février. 1908.
 14. MORELLI. *Centralbl. f. Bakt. u. s. w. Origin.* Bd. 50, p. 413.
 15. DE GRAAFF. *Id. id. Origin.* Bd. 49, p. 175.
 16. PORCHER. *De la présence des corps indologènes dans les bouillons de cultures.* 17 Mai 1909.
 17. MAASZEN. *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.amt.* Bd. 9, p. 403.
 18. PORCHER et PANISSET. *C. R. Soc. Biol.* T. 66, p. 624.
 19. RIVAS. *Centralbl. f. Bakt. u. s. w. Origin.* Bd. 63, p. 547.
 20. BERTHELOT. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 1903, No. 8.
C. R. de Soc. Biol. 20 Avril 1912.
-

(Aus dem pathol. anatomischen Institut
der Universität Groningen).

**ÜBER EINEN FALL VON PRIMÄRER, SEHR AUS-
GEBREITETER, ULCERÖSER DARMTUBER-
KULOSE BEI EINEM ERWACHSENEN,
MIT BESONDERER RÜCKSICHT AUF
DIE PATHOGENESE.**

VON

M. J. ROESSINGH, *assistant.*

Seitdem ROBERT KOCH auf dem dadurch berühmt gewordenen Congress in London die medizinische Welt überraschte mit der Mitteilung über die Verschiedenheit der Menschen- und Rindertuberkulose und aus der Seltenheit der primären Darmtuberkulose die Unschädlichkeit der Perlsucht der Rinder für den Menschen beweisen wollte, haben an erster Reihe HELLER und ORTH gegen diesen KOCHSchen Satz Einspruch erhoben. Es war besonders der Erste, welcher mit grosser Sorgfalt sein Material auf primäre Darmtuberkulose untersuchte und zum Schluss kam, dass sie gar nicht so selten war; indem ORTH in zahlreichen Reden und Aufsätzen auf Grund vieler Experimente und pathologisch-anatomischer und bakteriologischer Tatsachen dafür warnte den Streit gegen die Rindertuberkulose nicht zu vernachlässigen. Obgleich die Zahlen der Statistiken über die Häufigkeit der primären Darmtuberkulose aus den verschiedenen Instituten noch ziemlich weit auseinandergehen, kann man doch im allgemeinen die KOCHSche Meinung als widerlegt betrachten. Aber auch jetzt noch bietet die Pathogenese jedes Falles soviel Wichtigkeit und Interesse in pathologischer und hygienischer Hinsicht, dass man Bekanntmachung nicht unterlassen sollte, umsomehr als jeder neuer Fall als Stütze derjenigen Statistiken

dienen kann, die die Seltenheit des Vorkommens dieser Krankheit bestreiten wollen.

Und gewiss hat unser Fall noch mehr Recht veröffentlicht zu werden, weil sich hier die Entzündung durch ihre Form und Ausbreitung sehr unterschied von der primären Darmtuberkulose wie man sie gewöhnlich in der Literatur beschrieben findet. Ausserdem waren dergleiche Schwierigkeiten an der Aufstellung der Pathogenese der Krankheit verbunden, dass wir nicht im stande waren dieselbe ganz und gar zu klären. Vielleicht dass sich dazu die Gelegenheit bieten wird, wenn mehrere solche Fälle in der Literatur bekannt werden. Deshalb fühle ich mich zur Mitteilung des Falles berechtigt.

Das Auffällige nämlich war die ausserordentliche Ausbreitung der Darmgeschwüre, die bei der Schlucktuberkulose durch Sputa sehr bekannt, bei der primären Darmtuberkulose aber sehr selten ist. Einen in mancher Hinsicht hiermit übereinstimmenden Fall veröffentlichte z. B. ECKSTEIN 1) aus dem Kieler Institut. Es möchte also eine Warnung sein, dass auch die primäre Darmtuberkulose sehr grosse Zerstörungen der Schleimhaut veranlassen kann mit allen Folgen derselben. Die Übereinstimmung mit sekundärer Schlucktuberkulose besteht auch darin, dass die Mesenterialdrüsen hier nur wenige, akute Veränderungen darboten, wie sie auch bei jener vorkommen, bei primärer Tuberkulose aber sehr selten sind, wo man gewöhnlich stark vergrösserte, verkäste oder verkalkte Drüsenpackete findet.

Zunächst möchte ich den Fall vorführen und etwas aus der Krankengeschichte sowie aus dem Sektionsprotokoll mitteilen um nachher meine Bemerkungen daran zu verknüpfen. Die mir freundlichst von Herrn Prof. HYMANS VAN DEN BERGH, Direktor der Medizinischen Klinik, überlassenen Berichte aus der Zeit, die Patient im Akademischen Krankenhaus in Groningen verbrachte, geben wenige Anhaltspunkte über mögliche, jugendliche Krankheiten des 18-jährigen Mannes A. P. Er gibt an im Alter von 5 Jahren eine schwere Darmentzündung durchgemacht zu haben, worüber er keine näheren Erklärungen zu geben vermochte. Als er in die Klinik kam, klagte Patient, während ich einige weniger wichtige Beschwerden ausser Betracht lasse, dass allmählich

1) ECKSTEIN, Ein Fall von primärer Darmtuberkulose. Dissert, Kiel 1902. Vergl. Hof, Über prim. Darmtuberk. nach r. 15000 Sektionen. Dissert. Kiel 1903.

ein zu häufiger Stuhlgang eingetreten sei, der ihm keinen Schmerz verursachte und wobei er niemals Blut gesehen hatte.

Der *Status praesens* gibt unter mehr an: Patient ist infantil, sehr zart gebaut mit schlecht entwickelten Muskeln. Keine Bart-, Achsel oder Schamhaare. Die Stimme ist hoch. Während des Monats, den er in der Klinik zubrachte, wurden in den Lungen und am Herzen keine nennenswerten Veränderungen nachgewiesen. Der Bauch war anfangs etwas aufgetrieben, später nicht mehr. Schmerzhaft war er bei Druck wenig oder gar nicht. Der Stuhlgang war dünnbreiig aber wenig frequent; es wurden darin keine Tuberkelbacillen gefunden. Wohl war einige Male Blut chemisch und mikroskopisch nachzuweisen. Die Reaktion von v. PIRQUET war stark positiv. Es bestand ein hektisches Fieber bis zu $39\frac{1}{2}^{\circ}$, das nur die letzten zwei Wochen etwas niedriger wurde. Während Patient so einige Zeit in einem leidlichen Zustand blieb, bekam er den dritten Oktober 1912 ein Erysipelas faciei, das nach einer Woche wieder genesen war, aber seine Lage doch sehr verschlechterte. Die Temperatur, die mit Pyramidon ungefähr normal geworden war, stieg wieder etwas und unter zunehmenden Diarrhöen starb Patient den 14^{ten} Oktober.

Die *pathologisch-anatomische Diagnosis* wurde gestellt auf: Infantilismus. Tuberculosis ulcerosa intestini tenuis. Tuberculosis lymphoglandularum mesentericarum acuta. Peritonitis tuberculosa.

Aus dem Protokoll der Sektion, die von Dr. T. S. STEENHUIS, assistent-prosektor am hiesigen Institut, gemacht wurde, hebe ich nur das Wichtigste hervor:

Leiche eines 18jährigen, sehr zart gebauten Mannes. Das Fettpolster und die Muskeln sind sehr wenig entwickelt. Die Achseln, die Wangen, Lippen und die Genitalien sind unbehaart. Der Penis ist klein (5 c.M.); das Skrotum ist ebenfalls klein. In der Peritonealhöhle befindet sich mehr als 1 L. klare, gelbliche Flüssigkeit. Das Peritoneum parietale ist glatt und glänzend. Das Peritoneum viscerale zeigt zahlreiche, grauweiße Knötchen, circulär um den Darm verlaufend. An einigen Stellen sind diese zu grösseren Convoluten vereinigt. Das Netz ist fettreich; enthält keine Knötchen. Das Mesenterium ist ziemlich gross und lang, fettreich mit etwas durchscheinend aussehenden Drüsen, die zahlreich und gross sind und kleine Knötchen mit hier und da Verkäsung auf der Schnittfläche zeigen. Es gibt auch einige mehr braunrote, bluthaltige Drüsen, in welchen man makroskopisch keine Verkäsung sieht.

Das Diaphragma steht sehr hoch; links bis zum oberen Rand der 4ten, rechts bis zur 3ten Rippe.

Beim Eröffnen der Brusthöhle fallen die Lungen gut zusammen. Die linke ist etwas mit der Brustwand verwachsen. Die linke Pleurahöhle enthält \pm 25 cc. die rechte \pm 50 cc. braune, klare Flüssigkeit.

Herz und Halsorgane ohne Befund.

Die Bronchialdrüsen sind nicht vergrössert und zeigen ebenso wie die Lungen keine Spur von Tuberkulose. Die linke Lunge hat normale Grösse und Form. Auf der Pleura pulmonalis einige Neomembranen; übrigens ist diese glatt. Die Schnittfläche zeigt normalen Luftgehalt und ist blutreich. Die rechte Lunge hat eine glatte Pleura. Die Schnittfläche ist glatt und zeigt eine unregelmässige Blutverteilung. Bei Druck rechts und links überall etwas schäumende Flüssigkeit.

Milz, Nebennieren, Nieren, Magen, Duodenum, Pankreas, Blase, Testis, Epididymis und Prostata geben keine Veranlassung zu besonderen Bemerkungen. Leber und Gallenblase sind frei von Tuberkulose, die Lymphdrüsen an der Porta hepatis sind etwas vergrössert, zeigen aber keine Tuberkulose.

Im untersten Teil des Jejunums und im Ileum, kommen circuläre Ulcera vor mit überhängendem, unterminiertem Rande von graugrüner Farbe, deren Boden von einem grauen Belag bedeckt ist, worin einige Tuberkeln. Diese Geschwüre werden zahlreicher und breiter, je mehr man den Dickdarm nähert; neben den vollkommen circulären kommen auch kleinere nicht circuläre vor. In der Nähe der Valvula ileocaecalis sind die Geschwüre zur einer grossen, ulcerierenden Fläche vereinigt. Sie nehmen den ganzen Darm ein, und zeigen nur noch vereinzelte Schleimbautinseln.

Das Coecum, der Processus vermiformis, das weitere Colon und das Rektum haben eine glatte Schleimhaut und sind frei von Tuberkulose.

Die Gehirns substanz sieht einigermassen gelatinös aus und gleicht der eines Kindergehirns. Die Schnittflächen zeigen keine makroskopischen Veränderungen.

Die Mesenterialdrüsen sind zum Teil auf 4 Meerschweinchen verimpft worden. Alle 4 zeigten nach einigen Wochen eine deutliche, allgemeine Tuberkulose, deren Ausbreitung bei allen ungefähr gleichen Schritt hielt. Sowohl in den mikroskopischen Schnitten des Darmes und der Mesenterialdrüsen, wie in den Organen der geimpften Meerschweinchen wurden reichlich Tuberkelbacillen gefunden. Das weitere Material ist dem hygienischen Institut überwiesen worden, wo Prof. KLEIN es bakteriologisch untersucht hat. Es hat sich als Resultat ergeben, dass

der Darmprozess durch den humanen Tuberkelbacillus verursacht worden ist. Siehe am Schluss dieser Abhandlung den »Anhang« von Prof. A. KLEIN: *Feststellung des Typus*.

Wenn man behaupten will, dass es hier einen wirklichen Fall gibt von primärer Darmtuberkulose, so muss man sich zuerst natürlich klar machen, was darunter verstanden wird. Durch verschiedene Auffassung dieses Begriffes ist schon mancher Streit entstanden und es wird dadurch der Unterschied in den Angaben über die Häufigkeit des Vorkommens der primären Darmtuberkulose, den man in den Statistiken finden kann, vielleicht teilweise erklärt. HELLER hat dann als primäre Darmtuberkulose diejenigen Fälle zusammengefasst, wo die ersten Veränderungen in der Mucosa intestinalis, in den Mesenterialdrüsen oder im Peritoneum zu finden sind.

Die Feststellung dieser Tatsache kann eigentlich nur bis zu einem gewissen Grade statt finden. Wollte man ganz sicher sein, so sollte man Serienschritte machen von der fraglichen Leiche, eine Arbeit, die wahrscheinlich mehr als ein Jahr in Anspruch nehmen würde. Und so kann ich nur sagen, dass hier nach einer durchaus exakten Untersuchung kein anderer Herd gefunden worden ist, sodass dieser Fall wohl mit Recht mit dem obigen Namen bezeichnet worden ist.

Kommen wir jetzt zu einer Erklärung unseres Falles, so ergibt sich aus den Untersuchungen des letzten Jahrzehnts, dass unsere Kenntnisse von den Möglichkeiten der Entstehung der primären sowie der sekundären Darmtuberkulose sehr zugenommen sind. Wir werden diesen Möglichkeiten also Rechnung tragen müssen und ihnen deshalb zuerst eine kurze Besprechung widmen.

Für die sekundäre Darmtuberkulose wird noch immer der Entstehung durch Einschlucken tuberkulöser Sputa ein grosser Platz eingeräumt, und mit Recht, denn man findet die grösste Prozentzahl bei schon bestehender Lungenphthisis und dann ist dieser Weg wohl der wahrscheinlichste, obgleich es unzweifelbar, wie wir nachher sehen werden, auch andere Möglichkeiten gibt.

Der Erste, der an diese Frage durch experimentelle Arbeiten näher herangetreten ist, war MOSLER, der im Jahre 1873

von seinem Schüler WINIECKI 1) in einer Dissertation einige Resultate bekannt machen liess. Es handelte sich um einen Patienten mit käsiger Pneumonie, der nachher reichliche Diarrhöen bekam und wo man nun den bekannten Zusammenhang annahm. Man machte jetzt Fütterungsversuche mit tuberkulösen Sputis bei Hunden und Hühnern, aber die Resultate waren sehr gering, möglicherweise wohl wegen der geringen Empfänglichkeit dieser Tiere. Nachher hat MOSLER 2) diese Frage weiter ausgearbeitet. Er zog auch Schweine in seinen Versuchskreis hinein. Aber, während man beim Hunde jedenfalls noch eine akute Gastroenteritis gesehen hatte (das Tier starb an einer Pneumonie), nahmen die Hühner und die Schweine an Gewicht zu und fühlten sich offenbar ganz wohl bei dieser Fütterung. Selbst wenn man den Tieren andere Speisen enthielt, blieben sie ganz gut am Leben; selbstverständlich wurden sie etwas magerer um später aber bei gewöhnlicher Nahrung wieder so wohl wie vordem auszusehen. Man muss aber nicht vergessen, dass hier wahrscheinlich der humane Typus im Spiel war, wofür diese Tiere wenig empfänglich sind. Ungefähr zu gleicher Zeit hatte CHAUVEAU 3) denn auch mehr Resultate mit Fütterungs-experimenten bei Rindern. Nichtsdestoweniger zieht MOSLER aus seinen Versuchen den Schluss, dass der Arzt berufen sei, das Einschlucken der Sputa soviel wie möglich zu verhindern.

Zwei Sachen kann man noch seinem Vortrag entnehmen, die auch jetzt noch ihre Bedeutung haben. Erstens legte er den Nachdruck darauf, dass der betreffende, von WINIECKI beschriebene Patient ein Idiot war und also eher alles einschluckte als normale Menschen. Und es ist jetzt natürlich eine bekannte Tatsache, dass Kindern ebensowenig wie Geistesschwachen deutlich gemacht werden kann, dass sie ihre Sputa gleich nach aussen befördern sollen, weil sonst für sie die Gefahr grösser wird eine Darmtuberkulose zu ihrer Lungenphthisis zu bekommen als für Erwachsene und normale Individuen.

Die zweite Tatsache, worauf MOSLER aufmerksam macht, war der Umstand, dass der genannte Patient vorher Typhus abdo-

1) WINIECKI, Über die Entstehung von Darmkrankheiten nach Verschlucken inficirender Sputa. Dissert. Greifswald 1873.

2) MOSLER, Deutsche mediz. Wochenschrift 1883, No. 19.

3) CHAUVEAU, Gazette des hôpitaux, 35, 36, 1873.

minalis durchgemacht hatte; er findet darin eine Erklärung für eine lokale Disposition für eine spätere tuberkulöse Infektion. Gegenwärtig spielt diese lokale Disposition für Organerkrankungen, speziell die Tuberkulose, wieder eine grössere Rolle und so möchte es auch bei unserem Fall, obgleich die Pathogenese der Krankheit allerdings eine ganz andere war, sehr beachtenswert sein, dass Patient in seiner Jugend eine schwere Enteritis gehabt haben soll, über deren Art sich leider gar keine weiteren Anhaltspunkte haben finden lassen. Vielleicht war also auch in unserem Fall eine dadurch entstandene Empfindlichkeit der Darmschleimhaut für die später hinzugekommenen tuberkulösen Gifte anwesend.

BIRCH-HIRSCHFELD 1) hat später eine andere Möglichkeit erhoben für die Entstehung der sekundären Darmtuberkulose bei Lungenphthisis. Er meint, dass mit Tuberkelbacillen beladene Emboli in den Darmschleimhautgefässen stecken bleiben und so die Veranlassung geben zu der Geschwürsbildung. Weil keiner diese Embolien, ausser bei allgemeiner Miliärtuberkulose, eigentlich jemals gesehen hat, kommt dieser Modus wohl wenig in Betracht.

Man kann dies nicht behaupten von der folgenden Meinung. Die neuerdings geäusserte Möglichkeit, dass sich in vielen Fällen von allgemeiner Tuberkulose oder lokaler Lungentuberkulose in der Galle bakteriologisch mittels Tierversuche Tuberkelbacillen finden lassen, verdient wirklich sehr beachtet zu werden. Schon im Jahre 1899 fanden E. FRÄNKEL und P. KRAUSE 2) in 45 % ihrer Fälle den Bacillus in der Galle in dieser Weise und später zeigten CALMETTE und GUÉRIN 3), dass bei intravenös mit Tuberkelbacillen injizierten Kaninchen bereits nach drei Tagen die Mikroorganismen in der Gallenblase auftraten. In jüngster Zeit ist LYDIA RABINOWITSCH 4) wieder an diese Frage herangetreten und hat bei 17 Fällen in 70 % durch Tierversuche die Bacillen in der Galle nachgewiesen. In nachher angelegten Kulturen wurde in 4 der Typus humanus, in 2 der Typus bovinus gefunden. 16 von den 17 Fällen hatten

1) BIRCH-HIRSCHFELD, Spezielle Pathol. Anatomie, 4e Auflage 1894.

2) E. FRÄNKEL, und P. KRAUSE, Zeitschrift für Hygiene 1899, Bd. 32.

3) CALMETTE und GUÉRIN, Acad. des Sciences de Paris 1909.

4) L. RABINOWITSCH, Deutsche Mediz. Wochenschrift 1913, No. 3.

eine mehr oder weniger vorgeschrittene Tuberkulose, wovon 11 auch Darmtuberkulose. Diese Untersuchungen sind wirklich von grossem Interesse. Vorerst wird dadurch eine neue und sehr plausible Entstehungsmöglichkeit der Darmtuberkulose eröffnet. Weiter wird es deutlich, dass auch ohne positive Darmbeschwerden schon Tuberkelbacillen mit den Fäces ausgeschieden werden können und so eine neue Infektionsgefahr bilden. Besonders entsteht sie in dieser Weise bei den Rindern, wo die Milch oft von Fäcespartikeln verunreinigt wird. In den Darm gelangte Bacillen können wieder aufgenommen werden, Lebertuberkulose oder allgemeine Tuberkulose verursachen u. s. w., namentlich wenn angenommen werden darf, was CALMETTE und GUÉRIN sagen, »que la bile modifie l'enveloppe cirograisseuse des bacilles et facilite leur absorption par la muqueuse intestinale saine« 1). Ein wahrer Circulus vitiosus wird in dieser Weise geschaffen.

Leider hat RABINOWITSCH die Lebern der betreffenden Individuen nicht weiter untersucht und also nicht beweisen können, ob für diese Bacillenausscheidung eine deutliche Lebertuberkulose notwendig ist oder nicht.

Bei Rindern und Schweinen ist dies von JOEST 2) näher geprüft worden, der in 9 von 77 untersuchten Fällen von Lebertuberkulose, also in 11.7 % und in 20 von 84 Fällen allgemeiner Tuberkulose, also in 23.8 % zusammen in 18 % in der Galle die Bacillen zeigen konnte. Er untersuchte nun von den positiven Fällen die Lebern histologisch und konnte jedesmal Veränderungen nachweisen. Bei einer grossen Prozentzahl war es ein Durchbruch einer pericholangitischen Tuberkel in den Gallengang, so dass also eine offene Tuberkulose entstanden war. Ob diese Ausscheidung nun auch Gültigkeit hat für Fälle, wo keine Leberveränderungen da sind, ist vorläufig noch nicht mit Gewissheit zu sagen und es sollte daher mit Zuhilfenahme eines grossen Materials entschieden werden müssen, in welchem Sinne diese Frage gelöst werden wird. In Zusammenhang mit der bekannten Eigenschaft der Gallenblase für andere Mikroorganismen wäre das durchaus nicht unwahrscheinlich. Viel-

1) cit. nach JOEST, Verhandl. der Deutschen Pathol. Gesellschaft 1913.

2) JOEST, Verhandl. der Deutschen Pathol. Gesellschaft 1913.

leicht also, dass auch hier die Klasse der Bacillenträger und Bacillenausscheider geschaffen wird, wo bei einer klinisch unbekanntem und pathologisch-anatomisch nicht nachweisbaren Tuberkulose schon mit der Galle Bacillen ausgeschieden werden. Welche Fürsorgen würde das wieder in hygienischer Hinsicht erheischen!

Nach dieser langen Zwischenrede kehren wir wieder zu unserem Fall zurück. Es ist wohl deutlich, dass man derartige, sekundäre Darmtuberkulose hier nicht annehmen kann. Schlucktuberkulose ist jedenfalls absolut ausgeschlossen. In welcher Weise hat sich nun aber die primäre Infektion vollzogen? Zuerst ist man natürlich geneigt in einem solchem Fall die Nahrung als Ursache heranzuziehen. Ganz recht hat aber BEITZKE ¹⁾ in Übereinstimmung mit ORTH, FRÄNKEL u. A. bemerkt, dass die grobe Unterscheidung in Fütterungs- und Inhalations-tuberkulose nur so weit richtig ist, als damit die Quellen der Infektion angedeutet werden können, nicht aber, dass sie etwas beweisen kann über die Wege, welche die Bacillen im Körper von der Eintrittspforte weiter einschlagen, obgleich man geneigt ist, jedesmal die Darmtuberkulose als eine Folge der Nahrung und die Lungentuberkulose als eine Folge der Inhalation zu betrachten. Sie schlagen daher vor von Deglutitions- und Aspirationstuberkulose zu sprechen, wobei sie diese beiden Begriffe also trennen von der Frage, ob die Bacillen mit der Nahrung oder mit der Atmungsluft aufgenommen worden sind. Wenn man sich kurz eine Vorstellung macht, wie denn überhaupt die Infektion bei der Fütterung oder Inhalation statt finden kann, so tritt dieser Unterschied deutlich hervor. Dabei werden also die germinale, genitale oder Haut-infektion nicht berücksichtigt.

A. Die *Inhalation* kann also Veranlassung geben zu den folgenden Möglichkeiten:

1. Die Bacillen werden gleich in die Lungen aspiriert und erzeugen da eine primäre Tuberkulose.
2. Die Bacillen dringen unbemerkt durch die Wand der Bronchien oder der Alveolen und gelangen in die Bronchialdrüsen, von wo sie später eine neue Infektion des Lungengewebes verursachen können (RIBBERT).

1) BEITZKE, Ergebnisse der allgem. Pathologie und Pathol. Anatomie 1910.

3. Die Bacillen werden schon in der Mundhöhle oder im Rachen festgehalten, dringen in die Tonsillen, wo sie wieder mehrere Wege folgen können:
 - a. Sie verursachen primäre Tonsillärtuberkulose (selten).
 - b. Sie gelangen in die Lymphdrüsen des Halses und des Mediastinums. (Dies ist nach BEITZKE unwahrscheinlich, weil er die Lymphwege nach dem Mediastinum noch nie hat zeigen können und ausserdem die zwischenliegenden Drüsen dann tuberkulös infiziert sein müssten. Andere Autoren bestreiten diese Meinung).
 - c. Sie gelangen in die Lymphgefäße, dann in das Blut und können so überall, speziell in den Lungen, hämatogen Tuberkulose verursachen.
 4. Die Bacillen werden mit Speichel und Schleim verschluckt und können so eine Deglutitionstuberkulose des Darmes, des Peritoneums u.s.w. hervorrufen.
- B. Die *Nahrung* kann Veranlassung geben zu den folgenden Möglichkeiten :
1. Die Bacillen bleiben in der Mundhöhle stecken und werden nachher aspiriert. Siehe: A 1, 2.
 2. Die Bacillen werden in der Mundhöhle oder im Rachen festgehalten. Siehe: A 3.
 3. Sie verursachen eine primäre Darmtuberkulose.
 4. Sie infizieren primär die Mesenterialdrüsen.
 5. Es entsteht eine Peritoneal tuberkulose (ohne die beiden Vorigen sehr selten).
 6. Die Bacillen durchziehen unbemerkt die Darmschleimhaut und die Lymphdrüsen, gelangen ins Blut und können überall hämatogen Tuberkulose verursachen. Diese Meinung, am meisten von v. BEHRING verteidigt, ist durch viele Experimente jetzt wohl gesichert, obgleich es nach den meisten Autoren nicht so oft vorzukommen scheint als die Anhänger der Theorie der enterogenen Entstehung der Lungentuberkulose wohl meinten. Besonders hat sich aus vielen Versuchen herausgestellt, dass nach langer Zeit sich doch immer Veränderungen am Orte des Eindringens oder in den nächsten Drüsen zeigten.
 7. Aus vielen Experimenten hat sich ergeben, dass, bei Tieren jedenfalls, Bacillen durch antiperistaltische Bewe-

gungen aus dem Magen wieder nach oben befördert werden und dann also durch Aspiration eine Lungentuberkulose verursachen können. (UFFENHEIMER 1), nachher bestritten von BACHRACH und STEIN 2), aber wieder bestätigt von DIETERLEN 3). So haben ORTH und RABINOWITSCH 4) auch gefunden, dass per Anum hineingebrachte Bacillen später aus dem Magen kultiviert werden konnten. Diesem Befund muss man also auch beim Menschen Rechnung tragen.

So sind jetzt die wichtigsten Wege genannt, obgleich sie sich noch in allerlei Weisen kombinieren lassen. Es braucht also nicht zu wundern, dass man in vielen Fällen die Spur verliert und ein sicheres Urteil aussteht. Kompliziert wird die Sache noch dadurch, worauf besonders BARTEL 5) aufmerksam gemacht hat, dass die Bacillen ziemlich lange Zeit in den Lymphdrüsen *latent* liegen bleiben können, nach HARBITZ, WEICHELBAUM und BARTEL sogar mehrere Monate, worin sie nur mittels Tierversuche und öfters mikroskopisch nachweisbar sind, eine Periode, während welcher sie also leicht übersehen werden und nichtsdestoweniger ihre Wirkung schon ausüben können, sei es, dass sie sich schon weiter verbreiten, sei es, dass sie die Allergie des Körpers verursachen, wodurch sich das betreffende Individuum bekanntlich einer neuen tuberkulösen Infektion anders verhält als vordem.

Vollständigkeitshalber will ich noch der Meinung von HAENTJES 6). Erwähnung tun, wodurch der Infektionsweg ein ganz einfacher wird und man sich die viele Mühe hätte ersparen können, die das Zusammenbringen der obengenannten Tatsachen gekostet hat. Er meint nämlich, dass die Bacillen sich per Contiguitatem in den Bindgewebsspalten verbreiten, sich wenn nötig neue Wege schaffen und garnicht in die regionären Lymphdrüsen zu gelangen brauchen. Überall wäre also der

1) UFFENHEIMER, Deutsche Mediz. Wochenschrift 1906, No. 46.

2) BACHRACH und STEIN, Wiener klin. Wochenschrift 1907.

3) DIETERLEN, Tuberk. Arbeiten aus dem kaiserl. Ges. Amt. Heft 9.

4) ORTH und RABINOWITSCH, Sitzungsber. der Akad. d. Wissensch. Berlin Bd. 39.

5) BARTEL, Wiener klin. Wochenschrift, 1904, 1905, 1906. 1907.

6) HAENTJES, Zeitschrift für Tuberkulose. Bd. 9.

Körper empfindlich. Diese Meinung ist gewiss wohl nicht allgemein angenommen worden.

Aus dieser Zusammenfassung wird es deutlich, dass es schwierig sein wird für jeden Fall und so auch für den unsrigen den Infektionsmodus anzugeben. Wichtig ist es dabei so genau wie möglich anamnestiche Daten zu sammeln und sich in der Umgebung des Patienten zu erkundigen, wie er früher gelebt hat, eine Sache, worauf auch schon HELLER 1) in einer seiner ersten Publikationen über diese Frage aufmerksam macht. Weil der junge Mann einigermaßen infantil war, war es nicht möglich viel Wichtiges von ihm zu hören; überdies wurden diese sorgfältigeren Nachforschungen erst nach seinem Tode geplant. Dr. TjABBES, der früher behandelnde Arzt hat sich die Mühe gegeben in der Jugend von Patient die Ursachen für seine Infektion zu finden. Er hat das Folgende gemeldet: Der Vater des Patienten ist vor 10 Jahren an Lungentuberkulose gestorben. Patient ist ein Sohn aus zweiter Ehe mit einer jungen Frau. Nach dem Tode des Vaters ist in der Familie keine weitere Tuberkulose vorgekommen. Patient had immer gekochte Milch in ziemlich grossen Quantitäten getrunken von demselben Milchverkäufer wie die Hausgenossen. Später war er Bedienter in einem Geschäft von Zuckerwaren, wo in der Zeit keine Tuberkulose vorkam.

Das Resultat dieser Anamnese ist also nicht erheblich und eine Entscheidung bringt sie nicht.

Eine so grosse Ausdehnung der Geschwüre, wie sie hier vorkommt, hat man mit Recht gewöhnlich einer anhaltenden und regelmässigen Zufuhr von Bacillen zugeschrieben, wie diese an erster Stelle bei einer ulcerösen Lungenphthisis statt finden kann, wo mit dem Sputum fortwährend Bacillen eingeschluckt werden. Unser Fall stimmt, was die Ausbreitung der pathologischen Veränderungen anbetrifft, wie schon in der Einleitung bemerkt, ganz mit einer solcher sekundären Darmtuberkulose überein. Diese Weise von Infektion kann man hier natürlich aber ausschliessen.

Ebensowenig kommt eine Ausscheidung von Bacillen mit der Galle in Betracht, wofür denn doch vorläufig, bei unseren jet-

1) HELLER, Deutsche Mediz. Wochenschrift 1902, No. 39.

zigen Kenntnissen, ein deutlicher primärer Herd im Körper und nachweisbare Lebertuberkulose notwendig wäre.

Eine weitere Möglichkeit einer stetigen Zufuhr von Bacillen nach dem Darmkanal ist natürlich ihre Aufnahme mit der Nahrung, speziell mit der Milch. Wie aber aus den Mitteilungen des ehemals behandelnden Hausarztes erhellt, sind für eine solche Annahme keine Beweise da, obgleich zugegeben werden muss, dass die Gründe kaum genügen um eine dergleiche Infektionsweise ausschliessen zu können. Die Wahrscheinlichkeit ist jedenfalls sehr gering. Und noch mehr wird sie das durch das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung. Eine Infektion mit dem humanen Typus mittels der Nahrung ist fast auszuschliessen.

Es ist kaum möglich, dass die Infektion datieren würde aus der Zeit des Verkehrs mit tuberkulösen Familienmitgliedern, nämlich mit dem Vater. Dies fand vor 10 Jahren statt; man müsste also eine Latenzperiode der Krankheit von dieser Zeitdauer annehmen und dazu ist wohl niemand geneigt.

Es wird also sehr schwierig sich eine Vorstellung zu machen, wie die Sache sich wirklich zugetragen hat. Ein Versuch zu Erklärung darf aber nicht unterlassen werden.

Sucht man in der Literatur nach ähnlichen Fällen, so wird man sie nur sehr spärlich finden. Vor einigen Jahren hat EDENS 1) einen beschrieben und eine Erklärung angenommen, die auch bei uns vielleicht ihre Gültigkeit haben kann. Auch bei seinem Fall waren ausgebreitete Darmulcerationen nachzuweisen, für welcher Entstehung, ebensowenig wie bei uns, Anhaltspunkte in der Anamnese gefunden werden konnten. Nicht verschwiegen werden darf, dass ausserdem die Mediastinaldrüsen bei ihm alte verkäste Herden zeigten. Im Dünndarm befand sich ausser den zahlreichen frischen Geschwüren eine tuberkulöse Narbe und EDENS stellte sich nun vor, dass dieses alte, in irgendwelcher Weise nach einmaliger Infektion entstandene Ulcus fortwährend Bacillen produziert hatte, wodurch die weiteren Teile des Ileums und des Colons ergriffen wurden, sodass also eine Art Autoinfektion statt gefunden hatte.

Vergleichen wir dies jetzt mit unserem Fall.

1) EDENS, Berliner klinische Wochenschrift, 1905, no. 50.

Es ist anzunehmen, dass jedermann der Gefahr einer tuberkulösen Infektion öfters ausgesetzt ist. Unser Patient hat sich nun auch einmal mit Tuberkelbacillen infiziert, wenn auch das Wie und Wo uns entgeht. Man muss sich nun vorstellen, dass er ausser der hereditären allgemeinen eine lokale Disposition im Darm darbot, welche den hineingelangten Bacillen einen günstigen Boden schuf. So entstand vielleicht zuerst ein vereinzelt Geschwür, von wo aus dann nachher in obengenannter Weise das Virus sich in den weiteren Teilen des Dünndarmes verbreitet hat. Man könnte dies auch mit der sogenannten Bombeninfektion bei der Syphilis vergleichen, wo in der Umgebung einer Papel viele kleine, neue Effloreszenzen durch eine Art Zersprengung entstehen können.

Dass wir in unsrem Fall keine alte tuberkulöse Narbe nachweisen konnten, lässt sich durch die ziemlich kurze Zeitdauer des ganzen Prozesses erklären.

Eine Schwierigkeit wäre vielleicht der Umstand, dass die Bacillen den Magen mit seinem Saft passiert haben müssten, ohne dass so viele zerstört würden, dass die übrigen ihre Wirkung im Darm noch ausüben könnten.

Es wäre auch möglich, dass die Darmentzündung nur *scheinbar primär* wäre, grade wie das bei Knochentuberkulose auch der Fall sein kann, wo in der Blutbahn kreisende Bacillen sich in den Locus minoris resistentiae (beim Knochen z.B. oft durch Trauma) ansiedeln. Woher diese Bacillen dann stammen, weiss man nicht. In irgend welcher Weise sind sie in den Körper gekommen, vielleicht schon einige Zeit da latent geblieben, oder sie rühren im Baumgartenschen Sinne einer germinalen Infektion her. Gelangen sie jetzt in den Kreislauf, so greifen sie das disponierte Organ, in casu den Darm, an und erzeugen eine progressive Tuberkulose.

So könnte man also solche ausgebreitete *primäre Darmtuberkulose* in dieser Hinsicht mit einer Lungenphthisis vergleichen, dass sie beide nach *einmaliger Infektion* entstehen können, was dann vielleicht nur möglich wäre in den Fällen, wo durch frühere krankhafte Zustände eine Disposition im Darmkanal geschaffen worden ist.

Diese Erklärungen sind etwas verschieden von der bei der

Darmtuberkulose gangbaren Auffassung. Meine Veröffentlichung hat auch nur den Zweck eine Anweisung zu geben, die vielleicht anderen Untersuchern bei ähnlichen, genetisch schwierigen Fällen von Nutzen sein könnte. Vielleicht findet meine Meinung dann auch später Bestätigung. Denn leider, wie es sich hier auch wieder zeigt, bei der Pathologie der Tuberkulose ist der Rätsel kein Ende.

A N H A N G.

FESTSTELLUNG DES TYPUS

VON

Prof. A. KLEIN, Groningen.

Sechs Meerschweinchen wurden mit kleinen Stückchen des tuberkulösen Dünndarms, nach tüchtiger Abspülung in steriler, physiologischer Kochsalzlösung, an der Bauchseite subkutan geimpft. Nach 4 Wochen wurden zwei dieser Meerschweinchen getötet und aus der Milz dieser Tiere Kulturen auf Glycerinkartoffeln angelegt.

Die 4 übrigen Meerschweinchen gingen unter starker Abmagerung innerhalb 5—6 Monaten an generalisierter Tuberkulose ein.

Alle Kulturen schlugen an; die älteren Kartoffelkulturen zeigten eine gelbrötliche Verfärbung.

Von den frischen Kartoffelkulturen wurde auf Glycerinbouillon von amphoterer Reaktion übertragen. Nach 5 Wochen war die ganze Oberfläche der Nährflüssigkeit von einer dicken, faltigen Haut überzogen, sogenanntes *eugonisches Wachstum* der englischen Kommission.

Mikroskopisch. Färbung nach ZIEHL: Tuberkelbazillen von schlanker Form, teilweise von gekrümmter Gestalt; gleichmässige Länge und gleichmässige Färbung.

Reaktion der Bouillon zu dieser Zeit sauer (Reaktion von SMITH).

Kaninchen-Versuche. Drei Kaninchen wurden nach KOSSEL, WEBER und HEUSS 1) mit 0.01 g. Tuberkelbazillen der frischen Glycerinbouillonkultur subkutan an der Bauchseite verimpft.

1) H. KOSSEL und A. WEBER. Vergleichende Untersuchungen über Tuberkelbazillen verschiedener Herkunft I.

H. KOSSEL, A. WEBER und HEUSS. Vergleichende Untersuchungen über Tuberkelbazillen verschiedener Herkunft II.

Tuberkulose-Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Heft 1, 1904, S. 1 und Heft 3, 1905, S. 1.

Kaninchen 1. Gewicht 3100 g. Geimpft 10. VI. 13. Getötet 17. IX. 13. Gewicht 3750 g. An der Impfstelle ein erbsgrosser Eiterherd. Die zugehörige Leistendrüse ist verkäst, während alle übrigen Drüsen unverändert sind. Milz, Nieren, Lungen frei von tuberkulösen Veränderungen.

Kaninchen 2. Gewicht 3670 g. Geimpft 10. VI. 13. Getötet 18. IX. 13. Gewicht 4200 g. An der Impfstelle geringe, bindegewebige Reste. Drüsen, Milz, Nieren, Lungen frei von Tuberkulose.

Kaninchen 3. Gewicht 3000 g. Geimpft 10. VI. 13. Getötet 19. IX. 13. Gewicht 3650 g. Impfstelle nicht sichtbar. Von der Impfstelle ein 3 cm langer, verdickter Lymphstrang mit eitrigem Inhalt, welcher nach einer ebenfalls vereiterten Leistendrüse führt. Die übrigen Drüsen unverändert, Milz, Nieren, Lungen frei von Tuberkulose.

Diagnose: Typus humanus.

Bemerkung: Auf die ziemlich bedeutende Zunahme an Körpergewicht der Kaninchen nach Impfung mit humanen Tuberkelbazillen, während die mit bovinen Kulturen injizierten Kaninchen meist stetige Abmagerung und Gewichtsabnahme zeigen, ist in jüngster Zeit zuerst von GOSTO 1) und kürzlich auch noch von KOSSEL 2) hingewiesen.

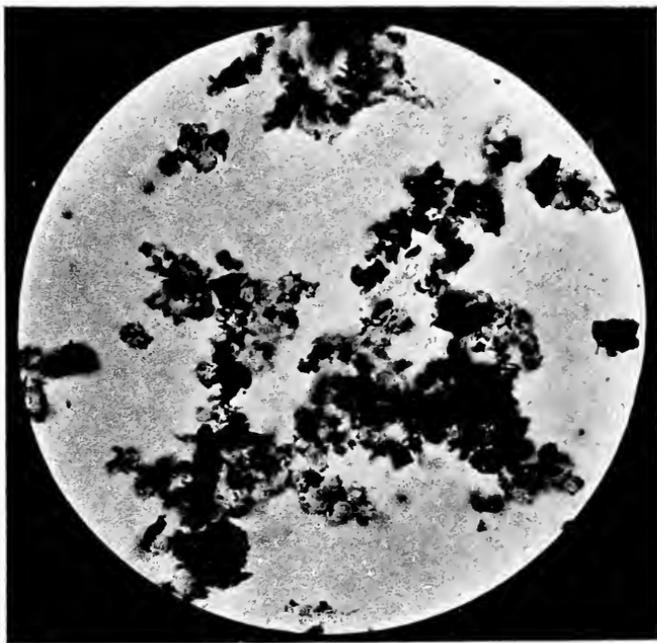
1) B. GOSTO. Rapports entre la tuberculose bovine et la tuberculose humaine. Office international d'hygiène publique, 4, 1913, p. 1380.

2) KOSSEL. Die tierische Tuberkulose in ihren Beziehungen zur menschlichen Tuberkulose, besonders zur Lungenschwindsucht.

Veröffentlichungen der ROBERT KOCH-Stiftung zur Bekämpfung der Tuberkulose, Heft 8/9, 1913, S. 8.



Schaf mit Polyarthritıs durch Rotlaufbazillen.



Photographie der mit Blutkohleteilchen umgebenen Hefezellen.

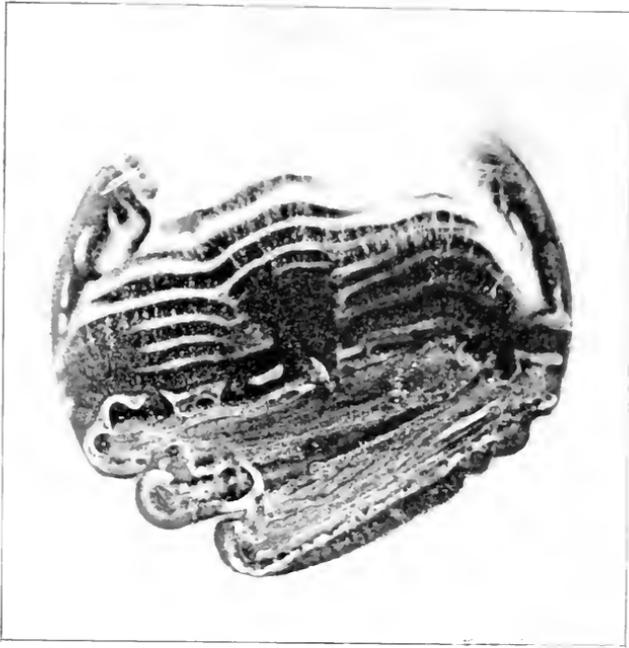


Fig. 1. *Papulospora mangonica*.

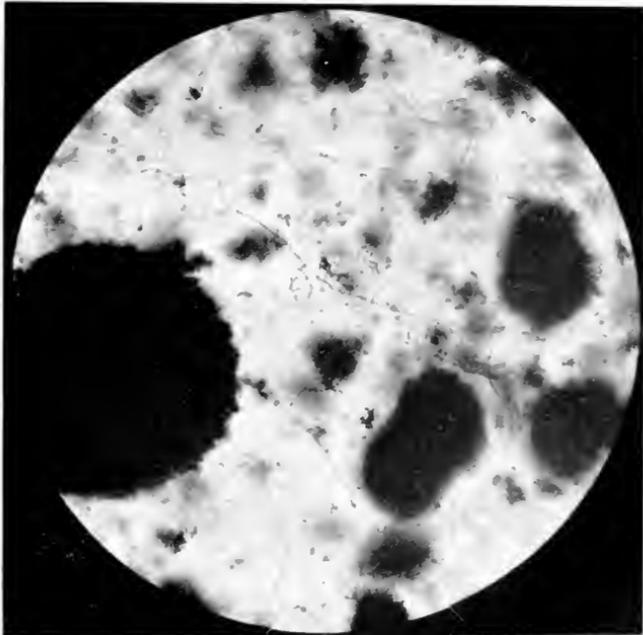


Fig. 2. *Papulospora mangonica*.

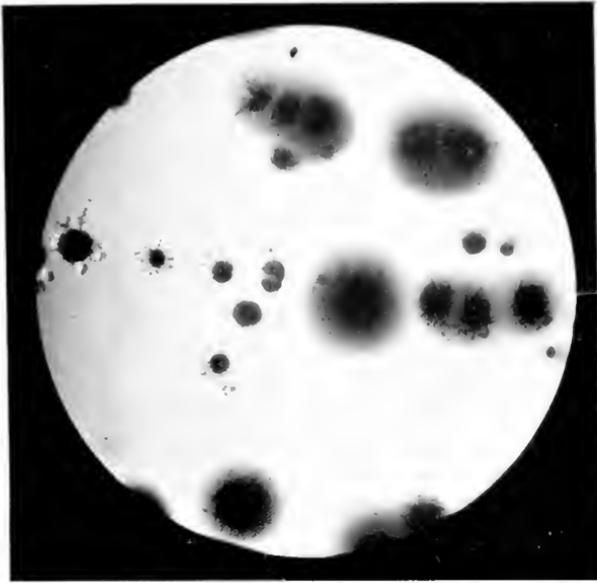


Fig. 1 (50). Kolonien von *Actinococcus cyaneus*.

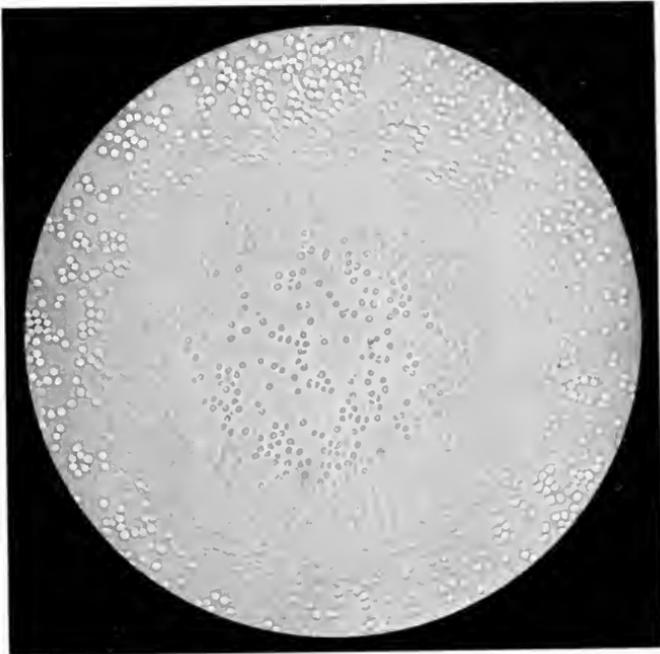


Fig. 2 (1000). *Actinococcus cyaneus* auf Bouillonagar.

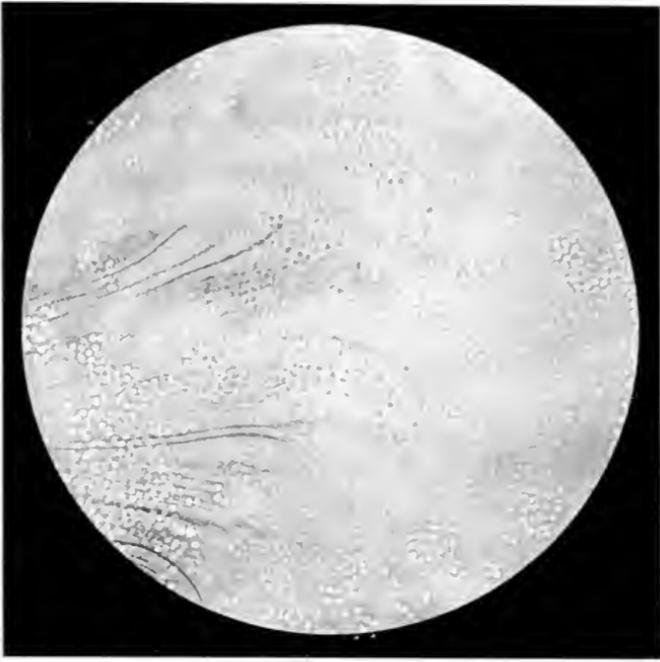


Fig. 3 (1000). *Actinococcus cyanus* auf Mannitagar.

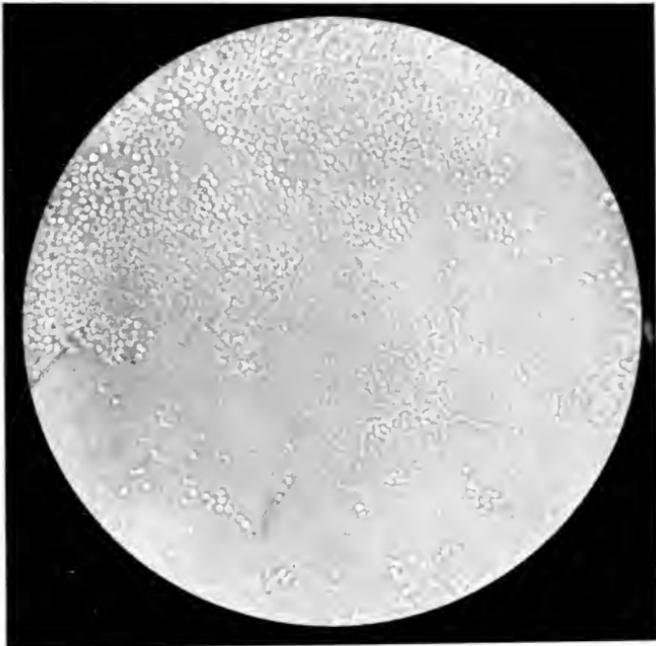
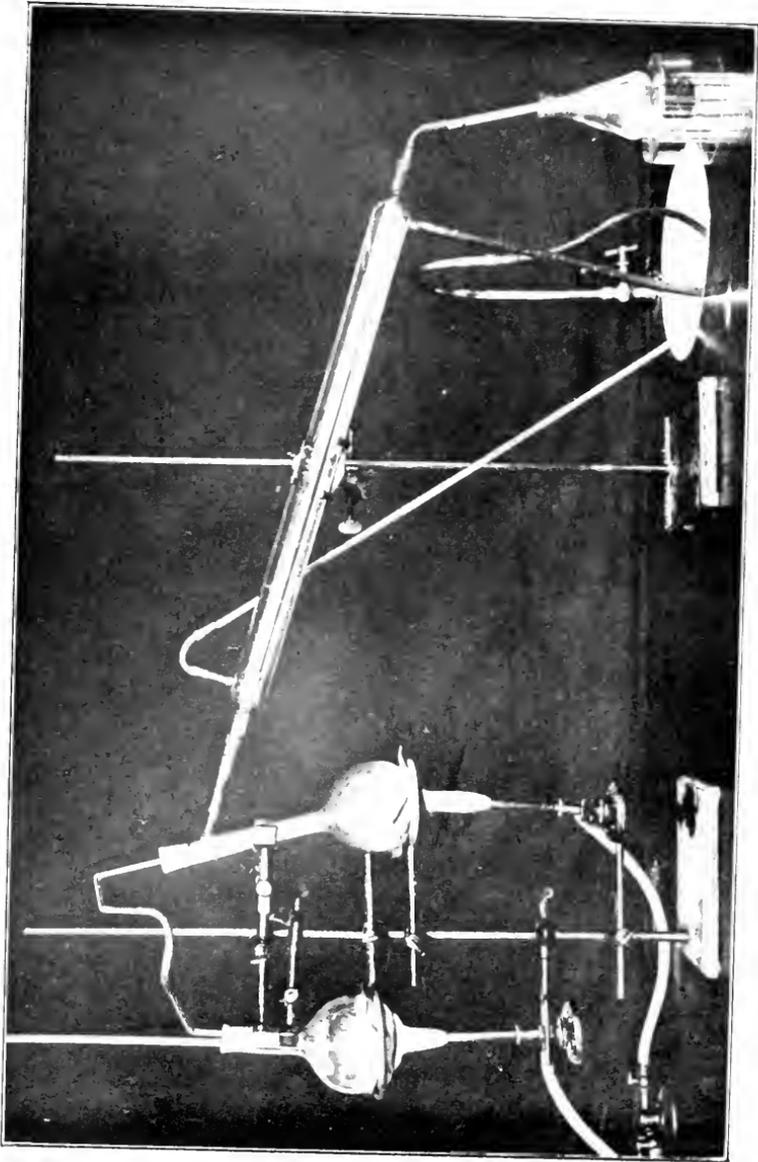


Fig. 4 (1000). *Actinococcus cyanus*, säurebildend auf Malzagar.



New York Botanical Garden Library



3 5185 00251 5300

