

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.

III. JAHRGANG.

: 1914. :

LIBRARY
DEPARTMENT
OF MICROBIOLOGY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
SAN DIEGO
CALIF.

ADMINISTRATION UND VERLAG DER
FOLIA MICROBIOLOGICA:
PHOENIXSTRAAT 18 DELFT.

XF
.0248
v. 3
1914

AUTORENREGISTER.

	Seite
Beijerinck, M. W.	91
Broers, C. W.	199
Hekman, J.	126
Idzerda, J.	227
Jacobsen, H. C.	155
Jong, D. A. de.	1
Loghem, J. J. van	212
Markus, H.	141
Misson, L.	49
Raaff, A.	89
Reeser, H. E.	15
Schornagel, H.	220
Schouten, S. L.	114
Söhngen, N. L.	151
Steenhuis, T. S.	76
Wisselingh, C. van	165

SACHREGISTER.

Aorte (sclérose de l')	76
Anindologenes (bacterium Proteus)	212
Artbildung (physiologische).	91
Bakterienharpune	89
Bakterienmenge (in Fäzes)	227
Bacterium Proteus anindologenes	212
Bétail européen (en Brésil).	49
Dematium pullulans de Bary	114
Diphtherie	126, 199
Essigbakterien	151
Fäzes (Bakterien menschlicher)	227
Immunisation artificielle (contre la Piroplasmose)	49
Konglutinationsmethode	15
Mammifères (tuberculose aviaire chez les)	1
Nitratferment.	91
Oxydation (durch Bakterien)	155
Phycomyces Agardh.	114
Phytomikrochemische Untersuchung	165

	Seite
Piroplasmose (du betail européen)	49
Putréfaction intestinale.	76
Réinoculation (de la tuberculose porcine de l'homme au veau)	141
Schwefelwasserstoff (Oxydation von)	155
Serological research (in tuberculosis)	126
Tuberculose aviaire	1
Tuberculose porcine	141
Tuberkulinprobe (nach van Es und Schalk)	220

FOLIA MICROBIOLOGICA.

HOLLÄNDISCHE BEITRÄGE ZUR
GESAMTEN MIKROBIOLOGIE.

HERAUSGEGEBEN VON:

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

III. JAHRGANG, HEFT 1.
AUSGEGEBEN AM 27. JUNI 1914.

(FÜR INHALT UND VERZEICHNIS DER MITAR-
BEITER, SIEHE INNENSEITE DES UMSCHLAGES).

ADMINISTRATION UND VERLAG DER
FOLIA MICROBIOLOGICA:
PHOENIXSTRAAT 18, DELFT. (HOLLAND.)

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP

: VOORHEEN :

: J. C. TH. MARIUS :

GANZENMARKT 4-10, UTRECHT

SPECIALITEIT:

INRICHTING EN COMPLETEERING VAN
WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA

MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN
VAN CARL ZEISS TE JENA EN
R. WINKEL TE GÖTTINGEN

MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN
MICRO-PROJECTIE APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN

INHALT.

	Seite
D. A. DE JONG. Sur le bacille de la tuberculose aviaire chez les mammifères.	1
H. E. REESER. Die Konglutinationsmethode	15
L. MISSON. Immunisation artificielle contre la piroplasmose du bétail européen importé au Brésil. (Avec 3 planches)	49
T. S. STEENHUIS. La putréfaction intestinale et la sclérose de l'aorte. (Avec 1 planche).	76
A. RAAFF. Eine praktische Bakterienharpune. (Mit 2 Tafeln).	89

[Laboratoire de Pathologie Comparée de
l'Université de Leyde].

SUR LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE CHEZ LES MAMMIFÈRES,

PAR

Le professeur Dr. D. A. DE JONG.

Il est bien universellement connu qu'on a voulu modifier l'opinion émise par ROBERT KOCH en 1882 (1) et 1884 (2), à savoir que *le bacille de la tuberculose* serait la cause unique de la tuberculose humaine et animale. Déjà en 1889 (3) on réussit à démontrer que le bacille isolé des *oiseaux* ne possédait pas précisément les mêmes caractères que celui des mammifères. KOCH (4) lui-même et MAFFUCCI (5) l'ont confirmé en 1890, et notamment STRAUS et GAMALEIA (6) ont étudié au fond, par voie expérimentale, les différences qui peuvent exister entre les bacilles tuberculeux des oiseaux et des mammifères.

Après ce temps, surtout en Allemagne, on ne s'occupait que très peu de la question; beaucoup plus en France où la plupart des pathologistes continuait à croire qu'ils n'existaient point de *différences principales* entre les bacilles des oiseaux et ceux des mammifères tandis que les superficielles seraient les conséquences des milieux d'existence si différents.

La situation restait la même jusqu'à 1901. A ce moment, il était de nouveau ROBERT KOCH (7) qui abordait la matière en déclarant, se basant sur les expériences exécutées par lui en collaboration avec SCHÜTZ, que les bacilles tuberculeux *humain* et *bovin* offrent des différences *permanentes*; que d'un point de vue pratique l'infection de l'homme ne serait pas causée par la tuberculose du bœuf et enfin, qu'il serait assez facile de différencier les deux bacilles par la culture et par l'expérience.

De divers côtés on s'est opposé contre ce verdict et quant à la partie principielle de la question, le plus grand obstacle contre la doctrine de KOCH restait sans doute le fait que les différences, proclamées par lui, *ne se montraient pas constantes, ni permanentes*.

Plus tard on s'est adressé de nouveau à la *tuberculose aviaire*, instituant d'autres recherches expérimentales. Non seulement fut-il prouvé que les bacilles aviaires se trouvent assez fréquemment dans les corps de mammifères, mais aussi qu'il est bien imprudent de croire à l'invariabilité des caractères des bacilles, isolés des mammifères ou des oiseaux. Il est notamment à ARLOING (8) qu'on doit des expériences remarquables à ce sujet; il réussit à cultiver les bacilles tuberculeux des mammifères dans des *cultures homogènes*, où ils obtiennent plusieurs des qualités connues du bacille aviaire.

Les différences principales entre les bacilles des mammifères et des oiseaux, laissant à part celles d'une moindre importance, seraient les suivantes:

1^e Les bacilles des mammifères donnent une culture sèche et verruqueuse, ceux des oiseaux une couche humide et visqueuse, tout en employant des milieux solides;

2^e Les bacilles des mammifères sont très virulents pour le cobaye et y causent la mort en peu de temps par une tuberculose type VILLEMEN (c'est-à-dire avec des tubercules visibles); au contraire les bacilles aviaires ne sont que très peu pathogènes pour le cobaye, y donnent un abcès au lieu d'inoculation avec gonflement du ganglion lymphatique régionnaire ou, si vraiment l'animal meurt, le cadavre ne montre pas des lésions tuberculeuses visibles et point de tubercules (tuberculose type YERSIN);

3^e Les gallinacés (et d'autres oiseaux) ne sont qu'exceptionnellement à infecter par les bacilles des mammifères, au contraire assez facile par celui des oiseaux.

Quant aux différences qu'on veut créer entre les bacilles tuberculeux de *l'homme* et du *bœuf* on accuse notamment les suivantes:

1^e Les bacilles de l'homme sont généralement un peu plus longs que celui du bœuf, et en cultures ils poussent un peu plus vite.

2^e Le bacille de l'homme n'est que très peu virulent pour

le *lapin*, tandis que celui du bœuf est doué d'une grande virulence envers cet animal.

3^e Le bacille de l'homme inoculé par voie sous-cutanée chez le *veau* ne causerait qu'une tuberculose locale peu grave et non-progressive, tandis que celui du bœuf y causerait une tuberculose grave et souvent mortelle.

J'y tiens à accentuer que j'ai mentionné seulement les différences *principales* dont on veut se servir. Dans la littérature on en peut trouver encore d'autres moins prononcées. Pourtant, selon mon opinion, on n'a *jamais* réussi à démontrer que dans ces sortes de différences on devrait voir les preuves d'une différenciation *permanente*, les preuves d'une *différence d'espèce*; au contraire, précisément la littérature nous apprend qu'on veut admettre toutes sortes d'*exceptions* aux règles, tandis que les recherches expérimentales ont prouvé qu'on n'a pas affaire à des différences *constants*.

D'ailleurs on comprendra que la solution de telles questions ne se laisse pas obtenir *en peu de temps*, justement aussi à cause de celui qui prend l'isolation des bacilles, et l'exécution des expériences chez des animaux. Ensuite, qu'on n'arrivera pas au but en étudiant seulement des bacilles isolés d'hommes, de bœufs et d'oiseaux, et en oubliant les autres animaux qui peuvent souffrir de la tuberculose. A côté de l'homme, du bœuf et des oiseaux ce sont le *porc*, le *cheval*, le *mouton*, la *chèvre*, le *chien*, le *chat*, le *singe*, le *lapin*, la *souris*, les *animaux à sang froid*, etc. qui peuvent fournir des cultures du bacille tuberculeux!

Il va sans dire que celui qui veut proclamer la *séparation* des bacilles mentionnés, ayant pour conséquence naturelle la séparation des *maladies*, doit apporter les preuves de l'existence de différences *permanentes*. Il ne peut pas admettre des passages, des formes intermédiaires, des variations ou des mutations spontanées ou artificielles, ou même des exceptions à la règle. Eh bien, la réalité s'oppose contre de telles conclusions des communications de KOCH. Vraiment, on pourra le trouver assez commode de parler d'un *typus humanus, bovinus* ou *gallinaceus* du bacille tuberculeux pour annoncer que les bacilles isolés de l'homme, du bœuf ou des oiseaux montrent

souvent leur origine par des caractères quelconques, mais on a seulement le droit d'accepter des différences *principielles* du moment, où l'on donne la preuve d'une barrière *permanente* et *insurmontable*. Jusqu'à maintenant, on n'a prouvé rien de la sorte.

Toujours en rapport au sujet que je veux traiter je dois signaler les conclusions erronées, aussi en ce qui concerne la biologie des microbes pathogènes et la pathologie expérimentale, dérivées de l'opinion de KOCH.

Après avoir observé le fait qu'un bacille tuberculeux isolé de l'homme, et un autre isolé du bœuf, montraient *ordinairement* les différences envisagées plus haut, KOCH et ses collaborateurs signalaient tout bacille qui présentait l'une ou l'autre des groupes de caractères soit comme *bacille humain* ou bien comme *bacille bovin*. Il n'y avait plus de place pour les bacilles avec des caractères divergents, variants ou intermédiaires. La même manière de voir est suivie pour les bacilles aviaires. De cette façon, comme il s'entend, il leur est bien facile d'indiquer l'origine de tout bacille tuberculeux — cependant, ils n'interprètent point les formes intermédiaires et ne s'occupent non plus de la variation de caractères, soit naturelle ou bien artificielle. *Or, cette manière de voir n'est pas admissible, ni pratiquement ni théoriquement!* Car les bacilles avec des qualités déviantes et intermédiaires *existent*, et les cas de variation naturelle et artificielle sont des *faits!* Pour cette raison l'opinion des savants allemands est inacceptable. Il est *impossible* de diviser les bacilles tuberculeux chez les animaux à sang chaud dans trois classes avec des *caractères bien limités*, ne comptant pas à ce moment les autres microorganismes qui s'en approchent.

Bientôt l'application pratique de la nouvelle doctrine de KOCH se montrait peu recommandable. Il avait supposé que la tuberculose du bœuf ne présenterait pas un danger envers l'homme. Les expériences ultérieures, inspirées par lui-même, faisaient voir, que des bacilles avec les qualités que lui et son école avaient proclamées pour ceux des bacilles bovins, se rencontraient sur l'homme beaucoup plus fréquemment qu'on ne l'avait pensé. Et parce que le critérium créé par lui, ne

pouvait pas faire découvrir *tous* ces cas, parce que les bacilles bovins ne possèdent point des caractères mathématiquement limités, il s'entend qu'on n'est pas informé sur les cas de tuberculose bovine sur l'homme où le bacille possède des propriétés moins nettes. *Et en tout cas la tuberculose bovine reste dangereuse pour l'homme!*

Comment en est-il avec la *tuberculose aviaire* ?

Il me semble bien difficile de nier qu'aussi les différences entre les bacilles aviaires et ceux des mammifères, quoique souvent bien marquées, ne soient pas si constantes et si caractéristiques, qu'elles donnent le droit de parler de *différences permanentes*. Aussi dans ce cas on voit que celui-ci qui étend ses recherches pendant plusieurs années et montre un peu de patience, découvre des faits prouvant qu'il n'y a pas lieu de parler de *différences principales d'espèce*; on rencontre des formes de variation naturelle ou artificielle, et les caractères qu'on veut proclamer comme *typiques* montrent peu de constance. Donc aussi dans ce cas la conclusion que, vraiment en plusieurs cas, on pourra *présumer* l'origine du bacille, sans en obtenir *la certitude*. Toujours l'origine pourra être une autre que celle suggérée par les qualités soi-disant typiques.

De tout ce qu'on sait des caractères de culture et de virulence des bacilles humains, bovins ou aviaires il en résulte, qu'ils ne sont pas assez précises pour en pouvoir dériver un moyen de diagnostic *certain* dans tous les cas. Il est précisément la constance qui manque parmi les qualités. Et serait il possible, en effet, que ces bacilles, séjournant dans un corps étranger, pourraient *changer* leurs propriétés, soit-il très lentement, mais en accord avec le nouveau milieu, il en résulterait, qu'il est *extrêmement imprudent de créer des espèces, ou des types avec les qualités d'espèce*, du bacille tuberculeux.

Se basant sur les données acquises il ne sera pas donc certain qu'un bacille tuberculeux quelconque isolé d'une certaine espèce d'animal, montrant les caractères qu'on voit d'ordinaire chez le bacille humain, bovin ou aviaire, soit *nécessairement* d'une telle origine. On pourra proclamer la *vraisemblance*, mais devra s'arrêter là.

Néanmoins de tels cas preuvent sans doute, qu'un certain bacille tuberculeux qui dans une espèce animale quelconque

montre souvent des qualités assez bien définies, *n'est pas absolument lié à cette dernière espèce*, ce qui d'un point de vue pratique veut dire que le bacille en question peut infecter aussi d'autres. Mais il n'est pas permis de taxer la fréquence de ces infections d'après le *nombre des cas* où l'on trouve le bacille avec les caractères divergents, justement à cause de la non-constance des différences que peuvent montrer les bacilles. Il est possible qu'on taxe *beaucoup trop bas*. Et quand on serait incliné à taxer les cas de tuberculose aviaire chez les mammifères d'après les cas où l'on trouve des bacilles avec les propriétés ordinaires du bacille aviaire, on risque de commettre la même faute que celui qui veut dériver les cas d'infection de l'homme par la tuberculose du bœuf d'après les cas dans lesquels on peut isoler de l'homme un bacille avec les qualités soi-disant typiques du bacille bovin. Probablement on taxe trop bas parce que la variation des bacilles peut faire naître *des formes intermédiaires ou de passage!*

Quoi qu'il en soit, le problème de la possibilité de l'infection mutuelle, et l'hygiène à cause de la fréquence de la tuberculose aviaire, sont intéressées à la question si vraiment, chez des mammifères, n'importe quels, on a pu trouver des bacilles tuberculeux avec les propriétés pathogènes et de culture qu'on observe ordinairement chez les bacilles isolés des oiseaux. Ce sont donc notamment les caractères signalés plus hauts. La question est d'une valeur pratique réelle. Malgré les recherches de Koch on admet partout la possibilité de l'infection de l'homme par la tuberculose du bœuf. Existents-ils des faits qui démontrent le même danger du côté de la tuberculose aviaire?

Il est bien évident que pour résoudre la question il ne faut pas s'arrêter exclusivement aux cas d'infection de l'homme. Si d'après l'opinion des séparatistes, la tuberculose des oiseaux possède son bacille pour elle, la présence de ce bacille chez un mammifère, n'importe l'espèce, sera un fait bien important, parce qu'il prouve que ce bacille n'est pas nécessairement associé aux attributs du corps aviaire, dont notamment la température diffère considérablement de celle du corps des mammifères. Et, si l'on réussit à trouver un cas d'infection, il

est vraisemblable que des autres suivront. Vraiment, les recherches des dernières années semblent vouloir prouver, qu'il est bien ainsi.

On pourrait diviser les *observations* en *anciennes* et *modernes*.

Peut-être les anciennes n'ont pas été élaborées toutes en détails. Néanmoins, elles ont attiré l'attention des cercles scientifiques et ont causé qu'on n'a pas oublié l'importance de la question. Elles sont datées de peu de temps après 1890 et 1891, c'est-à-dire peu de temps après les recherches mentionnées de MAFFUCCI, de KOCH et de STRAUS et GAMALEIA. KRUSE (9) réussit à isoler quatre bacilles tuberculeux, trois de l'homme et un du bœuf, qui dans la culture et par leur action pathogène se montraient comme des bacilles aviaires. FISCHEL (10) a cultivé du corps d'un singe un bacille avec les caractères d'un bacille aviaire. PANSINI (11) encore réussit à obtenir des bacilles aviaires des matières provenant de l'homme et du bœuf. NOCARD (12) avait inoculé des cobayes avec des crachats humains; les cultures obtenues dans ce cas étaient celles de bacilles aviaires. Et plus tôt déjà le même auteur pensait avoir démontré (13) que la tuberculose abdominale du cheval est d'origine aviaire, opinion qui d'ailleurs n'a pas été confirmée encore. Puissent toutes ces observations ne pas posséder une valeur absolue, il est néanmoins bien justifié d'en conclure que des bacilles tuberculeux avec les propriétés du bacille aviaire se trouveront chez des mammifères et parmi eux chez l'homme.

Les observations modernes sont faites dans l'époque des recherches récentes sur la tuberculose, c'est-à-dire après le Congrès de Londres en 1901. Il s'agit aussi de cas où l'on a trouvé comme cause de la tuberculose chez des mammifères des bacilles possédant les caractères de ceux qu'on peut isoler ordinairement dans les cas de tuberculose spontanée des oiseaux, notamment les gallinacés, et que j'indiquerai dorénavant comme des *bacilles aviaires*.

La série est ouverte, peut-être, par une observation de moi-même, concernant des *cas de tuberculose spontanée chez des souris blanches*, examinés en 1903, et causés par des bacilles aviaires (14). Les caractères des bacilles isolés furent examinés avec soin aussi en ce qui concerne l'action sur de grands

mammifères, le tout en rapport avec des recherches antérieures sur l'action des bacilles provenant de la poule chez la chèvre (15).

Aussi en 1903, WIENER (16) publia un travail sur la possibilité de transformer des bacilles de *cheval* en bacilles aviaires, en les cultivant en sacs de collodion dans la cavité abdominale des poules; c'était une imitation des expériences antérieures de NOCARD (12). WIENER inocula aussi des poules avec ces bacilles de cheval; les animaux succombèrent après quelque temps et il en isola un bacille aviaire. Il est possible que ce fait forme un appui à une publication antérieure de NOCARD (13) concernant la nature aviaire de la tuberculose abdominale du cheval. Dans un autre travail j'ai analysé déjà (17) les recherches de WIENER. En tout cas il est bien curieux que jusqu'à maintenant on n'a pas réussi à isoler le bacille aviaire du corps de cheval; de même des recherches exécutées par moi-même dans cette direction ont échoué (voir 18).

Bientôt, en 1904, RABINOWITSCH confirma mes observations concernant les souris, et isola même des bacilles aviaires du corps du *rat* (19) et dans la même année WEBER et BOFINGER (20) pouvaient cultiver un bacille aviaire d'un ganglion mésentérique casifié du *porc*.

Ensuite LYDIA RABINOWITSCH (21) publia en 1906 un cas bien intéressant de *tuberculose aviaire de l'homme*; il fut découvert par l'examen d'un nombre de cas de tuberculose de l'homme avec le but de vérifier l'opinion de KOCH. La possibilité de l'infection de l'homme par des bacilles aviaires était ainsi démontrée de nouveau. Et encore en 1906 la même savante pouvait écrire (22) que parmi un assez grand nombre de *singes tuberculeux* on en avait trouvé un qui était infecté par le bacille aviaire, tandis que dans un autre cas on avait isolé un *bacille intermédiaire entre l'aviaire et l'humain* !

Après ce temps les communications se sont succédées régulièrement et on a ajouté aux *souris, rat, porc, homme et singe* d'autres mammifères. En 1909 STUURMAN (23) a nourri un *lapin* avec les ganglions mésentériques d'une vache souffrant d'entérite paratuberculeuse; le bacille isolé du lapin était un *bacille aviaire*. Il en dérivait la nature aviaire de cette entérite. A ce moment on sait que l'entérite indiquée possède son propre

bacille, et l'expérience de STURMAN peut prouver seulement que *le lapin peut avoir une tuberculose aviaire*. Aussi en 1909 O. BANG (24) l'a confirmé par la description d'un cas de tuberculose aviaire spontanée chez le lapin.

Dans l'intervalle, en 1908, j'avais publié un cas de tuberculose congénitale du *veau* (25) où l'inoculation des cobayes, révélait les altérations ordinaires de la tuberculose des mammifères tandis que le bacille isolé fut un *bacille aviaire*. Ce cas bien intéressant, montrant une contradiction entre les résultats de l'inoculation et les propriétés de la culture, m'a donné la conviction qu'il est impossible de séparer bien nettement le bacille aviaire de celui des mammifères.

Quoi qu'il en soit, les cas mentionnés avaient prouvé que bien probablement aussi le *bœuf* pourrait souffrir d'une tuberculose causée par le bacille aviaire. D'ailleurs STURMAN (26), toujours en expérimentant sur l'entérite chronique, l'avait prouvé encore par l'inoculation d'un cobaye avec de la matière provenant de l'intestin d'une vache malade; le cobaye obtenait un processus localisé qui faisait isoler un bacille aviaire. Bien certainement dans ce cas le bacille provenait du bœuf!

Il me semblait justifié d'accorder une assez grande importance à une trouvaille faite par moi avec KEYSER en 1909 (27). Tandis que WEBER et BOFINGER avaient démontré que le bacille aviaire peut causer chez le *porc* une affection tuberculeuse localisée, ce qui d'ailleurs était en parfaite concordance avec des expériences exécutées par moi chez des porcs avec des bacilles aviaires (28), nous avons réussi à prouver par l'examen d'un porc saisi à l'abattoir de Leyde à cause de tuberculose généralisée, que cette dernière tuberculose bien étendue fut causée par des bacilles aviaires. Précisément l'extension considérable de la maladie permettait de démontrer d'une façon bien nette le danger que présente la tuberculose aviaire, tandis que les caractères de culture et l'examen expérimental ont appris, que sans aucune doute on avait affaire à un bacille aviaire.

Dans la même année MOHLER et WASHBURN (29) ont relaté que la tuberculose aviaire peut acquérir une fréquence bien dangereuse parmi les porcs, comme l'avaient fait présumer plusieurs cas observés en Amérique; le fait fut confirmé par des expériences d'ingestion. Et plus récemment encore le

danger qu'offre la tuberculose aviaire pour le porc a été démontré par une publication de O. BANG et de RASMUSSEN (30), qui viennent de prouver qu'en Danemarck la tuberculose aviaire du porc présente en effet un danger économique, parce qu'un grand nombre d'animaux dans les mêmes élevages peuvent être affectés, soit-il que la maladie n'est pas tellement généralisée comme dans le cas décrit par nous.

Aussi la *Commission anglaise* nous a fourni des contributions à l'étude de la tuberculose aviaire du porc (31). Parmi 26 cas de tuberculose localisée du porc, 6 furent causés par des bacilles aviaires. La commission estime qu'en Angleterre 10 pour 100 de la totalité des cas de tuberculose du porc est causé par le bacille aviaire.

Dernièrement des recherches nouvelles ont confirmé la fréquence de la tuberculose aviaire du porc. JUNACK réussit à isoler des bacilles aviaires dans plusieurs cas de tuberculose localisée du porc (32) et plus tard il a étudié les caractères des cultures de quelques-uns de ces bacilles (33).

CHRISTIANSEN (34) eut l'occasion d'examiner plusieurs cas de tuberculose du porc, ordinairement de tuberculose ganglionnaire localisée, mais aussi quelques cas de tuberculose plus étendue. En tout, de 118 porcs, il a isolé 86 bacilles aviaires, 28 du type dit bovin, et dans les 4 cas restants des bacilles de caractères moins typiques, cependant s'approchant du bacille aviaire. Et aussi, chez nous en Hollande, il semble que les cas se multiplieront comme le nouveau de M. STUURMAN, à publier bientôt, le prouvera.

L'expérience acquise en ce qui concerne la tuberculose aviaire du porc, faisait de nouveau poser la question si vraiment aussi chez le *bœuf* la tuberculose, causée par le bacille aviaire, ne serait pas plus fréquente et plus nette qu'il ne fut le cas dans ceux mentionnés plus haut. La réponse a été donnée par une observation récente faite par moi avec le Dr. STUURMAN. Il s'agit d'une vache abattue à l'abattoir de Leyde en 1911 et saisie à cause d'une tuberculose générale. L'examen expérimental, poursuivi aussi en 1912 et 1913, comme les recherches bactériologiques, ont démontré nettement qu'il existait une tuberculose aviaire. Des inoculations pratiquées chez des oiseaux, des

cobayes, des lapins, des chèvres et des veaux ne laissent aucun doute à cet égard. Une description détaillée sera donnée ailleurs 1); cependant ce qui mérite bien l'attention dans ce cas, c'est le fait que le bacille aviaire isolé du bœuf se cultivait un peu plus sèche, un peu moins visqueuse que les bacilles aviaires ordinaires et que sa virulence envers la chèvre et le veau n'était pas si grande que celle des bacilles employés dans mes expériences antérieures. Ce fait-ci me semble avoir un intérêt spécial justement par ce qu'il est de nouveau en contradiction avec les idées de stabilité, défendues par d'autres auteurs, et plus spécialement par ce qu'il s'agit d'un bacille aviaire du *bœuf*.

Aussi le bœuf peut souffrir d'une tuberculose grave, causée par des bacilles aviaires, et surtout les cas de tuberculose aviaire chez le porc et chez le bœuf nous imposent le devoir de penser aux conséquences pratiques des infections d'une telle sorte chez les mammifères, c'est-à-dire aussi chez *l'homme*.

La littérature récente nous porte la preuve de cette opinion.

Déjà en 1905, avant la publication du cas de RABINOWITSCH (1906), LOEWENSTEIN a fait savoir que dans un cas de tuberculose sur l'homme, dont il donne une description détaillée, il avait isolé un bacille intermédiaire entre celui des mammifères et des oiseaux (35).

En 1910 JANCOSI et ELFER (36), réussirent à cultiver un bacille aviaire d'un ganglion mésentérique d'un enfant qui avait souffert d'une tuberculose généralisée chronique compliquée par une méningite tuberculeuse aiguë. Il était probable que les autres altérations tuberculeuses que celles du ganglion furent de même causées par des bacilles aviaires.

Mais dernièrement LOEWENSTEIN vient de donner une description de trois nouveaux cas de *tuberculose aviaire chez l'homme*; l'examen est fait dans le laboratoire de PALTAUF (37). Il nous rappelle le cas observé par lui autrefois, et ceux de RABINOWITSCH et de JANCOSI et ELFER. Sur les cas nouveaux il dit que dans deux d'entre eux les bacilles isolés possédaient tous les caractères du bacille aviaire; dans le troisième la

1) J'ai donné un aperçu des différentes expériences dans la séance de la société vétérinaire néerlandaise en Septembre 1913.

culture était sèche comme chez le bacille des mammifères et la virulence du bacille différait un peu de celle du bacille aviaire. Dans les deux premiers cas il s'agissait d'une tuberculose rénale, dans le dernier d'altérations ulcéreuses de la peau, du tissu conjonctif, des cavités nasales et buccales et de la muqueuse intestinale. LOEWENSTEIN soupçonne comme cause la digestion d'œufs provenant de poules tuberculeuses.

La série assez longue de *mammifères*, et parmi eux *l'homme*, qui peuvent souffrir d'une tuberculose causée par le bacille aviaire prouve nettement que les bacilles de cette origine ne se trouvent pas exclusivement chez les oiseaux. Les lésions étendues, observées sur le porc et le bœuf, mais de même chez l'homme, démontrent la gravité de la nature de ces infections. Je ne veux pas m'arrêter de nouveau chez le fait que ceux qui acceptent des différences constantes entre les bacilles des oiseaux et des mammifères maintiennent une opinion bien restreinte et pratiquement bien dangereuse, tandis que pour eux qui n'acceptent pas ces différences permanentes les cas d'infection doivent être plus fréquents qu'il ne soit prouvé par les cas où le bacille aviaire vient d'être isolé. Tout cela est nullement nécessaire pour démontrer que les *propriétés biologiques* du bacille aviaire le rendent dangereux pour *l'homme* et pour les autres *mammifères*; les cas mentionnés plus haut en donnent la preuve irréfutable et l'hygiène doit en tenir compte.

Leyde, le 10 décembre 1913.

L I T T É R A T U R E.

1. KOCH. Die Aetiologie der Tuberkulose, Berliner Klinische Wochenschrift, 1882.
2. KOCH. Die Aetiologie der Tuberkulose. Mitt. a. d. Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1884.
3. RIVOLTA. Sulla tuberculosi degli Uccelli, Giorn. di Anat. e. Fisiol., Pisa, 1889.

4. KOCH. Ueber bakteriologische Forschung. Verh. des X. Intern. med. Congresses, 1890,
5. MAFFUCCI. Beitrag zur Aetiologie der Tuberkulose (Hühnertuberkulose). Centralbl. für Allg. Path. und Path. Anat., 1890.
6. STRAUS et GAMALEIA. Recherches expérimentales sur la tuberculose. La tuberculose humaine, sa distinction de la tuberculose des oiseaux. Arch. de méd. exp., 1891.
7. KOCH. The combating of Tuberculosis in the Light of the Experience that has been gained in the successful combating of other infection diseases. British Congress on tuberculosis, 1901.
8. ARLOING. Voir la littérature chez: D. A. DE JONG. Sur la fréquence du bacille tuberculeux du bœuf chez l'homme et sur l'inconstance des types du bacille de la tuberculose. Comptes rendus du Congrès de Pathologie Comparée, Paris. 1912, et: Revue générale de Médecine vétérinaire, 1913.
9. KRUSE. Ueber das Vorkommen der sogenannten Hühnertuberkulose beim Menschen und bei Säugetieren, Ziegler's Beiträge, Bd. XII.
10. FISCHEL. Zur Morphologie und Biologie des Tuberkelbazillus. Berl. Klin. Wochenschrift, 1893.
11. PANSINI. Einige neue Fälle von Geflügeltuberkulose bei Menschen und bei Säugetieren. D. Med. Woch., 1894.
12. NOCARD. Sur les relations qui existent entre la tuberculose humaine et la tuberculose aviaire. Congrès de la tuberculose, Paris, 1898.
13. NOCARD. Le type abdominal de la tuberculose du cheval est d'origine aviaire. Recueil de médecine vétérinaire, 1896.
14. DE JONG. La tuberculose spontanée des souris. Rapport pour le congrès d'hygiène et de démographie à Bruxelles, 1903. — La tuberculose aviaire, dans: Rapports entre la tuberculose de l'homme, du gros bétail, de la volaille et d'autres animaux domestiques (notamment du chien), VIIIe Congrès de médecine vétérinaire, Budapest, 1905.
15. DE JONG. Intraveneuze injectie van vogeltuberkelbacillen bij geiten. Herinneringsbundel, Rozenstein, Leiden, 1902.
16. WIENER. Beitrag zur Uebertragbarkeit der Tuberkulose auf verschiedene Tierarten. Wiener klinische Wochenschrift, 1903,
17. DE JONG. Het verband tusschen vogel- en zoogdiertuberculose. Veterinaire Pathologie en Hygiëne, 4^{de} reeks, Leiden, 1908.
18. DE JONG. Beiträge zur Klinik und zur Pathologie der Tuberkulose des Pferdes. Veterinaire Pathologie en Hygiëne, 4^{de} reeks, Leiden, 1908.

19. RABINOWITSCH. Die Geflügeltuberkulose und ihre Beziehungen zur Säugetiertuberkulose, D. Med. Woch., 1904.
 20. WEBER et BOFINGER. Die Hühnertuberkulose. Tuberkulose-Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1904.
 21. RABINOWITSCH. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Tuberculose des Menschen und der Tiere (Arbeiten aus dem Pathologischen Institut zu Berlin), 1906.
 22. RABINOWITSCH. Ueber spontane Affentuberkulose, D. Med. Wochenschrift, 1906.
 23. STUURMAN. Die spezifische hypertrophische Darmentzündung des Rindes. Travaux du IXe Congrès international de Médecine vétérinaire à La Haye, 1909.
 24. BANG. (O.) Die Tuberkulose des Geflügels in ihren Beziehungen zu der Tuberkulose der Säugetiere. Travaux du Congrès à La Haye, 1909.
 25. Voir: 17.
 26. Voir: 23.
 27. DE JONG. Rapport entre la tuberculose aviaire et celle des mammifères. Annales de l'Institut Pasteur, 1910.
 28. DE JONG. Comptes rendus du Congrès de Budapest, 1905 (voir: 14).
 29. MOHLER and WASHBURN. The transmission of Avian tuberculosis to Mammals. Travaux du Congrès de La Haye, 1909.
 30. BANG (O.). Tuberkulöses Geflügel als Ursache von Tuberkulose bei Schweinen. Zeitschr. f. Inf. Kr., paras. Kr. und Hygiene der Haustiere, 1913.
 31. Royal Commission on Tuberculosis, Final Report, Part. I, London, 1911.
 32. JUNACK. Ueber das Vorkommen von Geflügeltuberkelbazillen beim Schweine. Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene, 15 Juni, 1913.
 33. JUNACK. Idem, II Mitteilung. Le même journal, 15 März 1914.
 34. CHRISTIANSEN. Ueber die Bedeutung der Geflügeltuberkulose für das Schwein. Zeitschr. für Inf. Kr., parasitaire Kr. und Hygiene der Haust., 1913, Bd. 14.
 35. LOEWENSTEIN. Ueber Septikämie bei Tuberkulose. Zeitschr. für Tuberkulose und Heilstättenw., Bd. 7, 1905.
 36. JANCZO und ELFER. Vergleichende Untersuchungen mit den praktisch wichtigeren säurefesten Bazillen. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose, 1910.
 37. LOEWENSTEIN. Ueber das Vorkommen von Geflügeltuberkulose beim Menschen, Wiener klinische Wochenschrift, 1913.
-

Aus dem Immunitätslaboratorium des Reichs-
seruminstituts in Rotterdam.

DIE KONGLUTINATIONSMETHODE

VON

Dr. H. E. REESER.

Die Konglutinationsreaktion verdankt ihre Entstehung dem EHRlich-SACHSschen Experiment (1), welches aufgestellt worden war in der Absicht zu beweisen, dass die Hämolyse beruht auf der Wirkung bestimmter Sensibilisatoren, welche sich sowohl mit den Blutkörperchen als mit dem Komplement banden und wobei diese beiden Forscher sich von 3 Faktoren bedienten, nämlich Meerschweinchenblutkörperchen, inaktives Rinderserum und frisches Pferdeserum. Sie konstatierten, dass die Meerschweinchenblutkörperchen intakt blieben in dem frischen Pferdeserum, aber schnell hämolysierten in einer Mischung dieses Serums mit inaktivem Rinderserum, was die Voraussetzung rechtfertigte, dass in dem Rinderserum ein Sensibilisator anwesend sein würde, welcher die roten Blutkörperchen band an das Komplement des Pferdes, wodurch die Blutkörperchen hämolysierten. Bis soweit nichts besonders. Aber EHRlich und SACHS sahen auch, dass, wenn die Blutkörperchen erst mit inaktivem Rinderserum in Kontakt gebracht wurden und darauf das Letzte durch Zentrifugation entfernt wurde, die Hämolyse zurückblieb, wenn die dermaszen vorbehandelten Blutkörperchen

mit frischem Pferdeserum in Berührung kamen, aus welchem Umstand sie den Schlusz zogen, dass die cytophile Gruppe des Rindersensibilisators nur dann in Tätigkeit treten könnte, wenn die komplementophile des Sensibilisators voraus mit dem Alexin verbunden war. Bei ihrem Studium über denselben Gegenstand gelangten BORDET und PARKER GAY (2) aber zu einer ganz andern Meinung. Ihrer Behauptung nach besteht in dem Rinderserum noch ein besonderer Stoff, welcher weder Sensibilisator, noch Agglutinin, noch Alexin sein sollte und welcher von allen andern bekannten Immunkörpern abweichen sollte; er sollte das Vermögen haben die mit Sensibilisator und Alexin geladenen Blutkörperchen zu präzipitieren, welche Präzipitation die Hämolyse begünstigen sollte. Dieser spezielle Stoff des Rinderserums erträgt eine Erhitzung auf 56° C. und wurde von B. und G. „colloïde de bœuf“ genannt. Er präzipitiert nur Zellen, welche voraus mit Sensibilisator und Alexin geladen sind und diese Adsorption des „colloïde de bœuf“, durch die sensibilisierten und alexinierten Blutkörperchen äuszert sich nun unter deutlich sichtbaren Erscheinungen; die Zellen agglutinieren stark zu voluminösen Klumpen und hämolysieren dann leichter (ausgenommen in einigen Fällen). Beim EHRlich-SACHSschen Experiment gelang es ihnen also 4 wirksame Stoffe nachzuweisen und zwar in dem aktiven Pferdeserum: ein thermolabiles Komplement und einen starken gleichfalls thermolabilen Sensibilisator (Ambozeptor); in dem inaktiven Rinderserum: einen thermostabilen Sensibilisator und einen Stoff albuminoider und kolloider Natur, »Colloïde de bœuf«.

Fügt man also Meerschweinchenblutkörperchen, inaktives Rinderserum und aktives Pferdeserum zusammen, dann verbinden sich, nach BORDET und GAY, die Blutkörperchen mit dem Normalsensibilisator (gleichviel ob er der thermostabile Rindersensibilisator oder der thermolabile Pferdesensibilisator ist); dieser neue Komplex zieht das Alexin an (aus dem frischen Pferdeserum) und durch diese Bindung bekommen die Blutkörperchen das Vermögen das »Colloïde de bœuf« anzuziehen, welcher Stoff dann seine agglutinierende und hämolytische Wirkung entfaltet.

Dieser letzte Stoff, von dem die Wirkung sich äuszerst in der Agglutination der Blutkörperchen zu voluminösen Flocken,

darf nicht verwechselt werden mit den gewöhnlichen Agglutininen; aus diesem Grunde gaben BORDET und STRENG (3) diesem speziellen Stoffe des Rinderserums den Namen »Konglutinin«, während Sie die Agglutination, welche er bewerkstelligte, mit dem Namen »Konglutination« bezeichneten.

Ein der Hauptargumente, welche SACHS und BAUER (4) gegen diese Theorie von BORDET und GAY anführten, war, dass es ihnen unwahrscheinlich vorkam, dass in dem Rinderserum ein spezieller Stoff anwesend war, welcher man niemals in anderen Sera hatte nachweisen können.

In einer späteren Arbeit untersuchte STRENG (5) aber eine grosse Anzahl andere Tier- und auch Menschensera auf ihre konglutinierenden Eigenschaften. Ausser Ziegen- und Schafserum kontrollierte er auch Sera von exotischen Wiederkäuern (Alpakka, Kamel, Zebu und Antilope) und weiter Sera von Hund, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen, Pferd, Katze und Taube. Es stellte sich heraus, dass konglutinierende Substanzen nicht nur in Rinderseris vorkommen, sondern ziemlich verbreitet sind bei den Wiederkäuern.

Nur mit Ziegenserum bekam er keine Konglutination, was er zurückführte auf den Umstand, dass die von ihm benutzten Ziegen zu jung waren (Auch bei Kälbern sind die Konglutinine weit schwächer als bei erwachsenen Rindern).

Das Antilopenserum hatte auf sensibilisierte und alexinierte Blutkörperchen eine noch stärkere zusammenballende Eigenschaft als das Rinderserum und würde vielleicht noch besser als dieses zu Konglutinationsversuchen dienen können. Hunde-, Tauben- und Katzensera riefen keine Zusammenballung der Blutkörperchen hervor und scheinen also keine Konglutinine zu enthalten. Kaninchen-, Hühner-, Schweine- und Menschensera gaben zweifelhafte Resultate, während Pferdeserum oft ein variables Verhalten zeigte.

Von welchem Tier das Alexin stammt ist gleichgültig, weil man bei Verwendung von frischem Pferde-, Kaninchen- Meerschweinchen-, Menschen- und selbst Rinderserum dasselbe Resultat bekommt; im letzten Falle verwendet man, an Stelle des inaktiven Rinderserums, frisches Rinderserum allein.

Auch die Herkunft der Blutkörperchen ist belanglos. STRENG verwendete nicht nur Meerschweinchen- und Rinderblutkörper-

chen, sondern auch Ziegen- und Pferdeblutkörperchen. Gewöhnlich wird, wie schon mitgeteilt wurde, nach der Konglutination der Blutkörperchen Hämolyse wahrgenommen.

Eine Eigentümlichkeit in dieser Hinsicht zeigten Ziegen- und Hammelblutkörperchen, welche zwar stark zusammenballen, aber nicht hämolysiert werden, was BORDET und STRENG zurückführen auf den Umstand, dass Rind, Schaf und Ziege mit einander verwandt sind. So hämolysiert auch Rinderkomplement nicht oder nur äusserst schwach die Blutkörperchen von Schaf und Ziege, wenn diese Blutkörperchen geladen sind mit einem spezifischen, hämolytischen Immuserum.

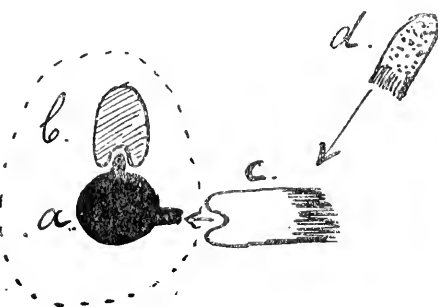
In seinem Studium über das Verhalten des Rinderserums den Mikroben gegenüber (Versuch einer neuen serodiagnostischen Methode) forschte STRENG (6) nach, welche Wirkung inaktives Rinderserum und aktives Pferdeserum auf Bakterien ausübten, mit andern Worten, ob sensibilisierte und alexinierte Mikroben von Rinderserum ausgeflockt wurden. Auch die Mikroben nehmen, wie bekannt, das Alexin unter der Bedingung auf, dass sie erst mit einem entsprechenden, Sensibilisatoren enthaltenden Serum, sensibilisiert worden sind. Die Alexinabnahme kann in Vitro nicht direkt makroskopisch gesehen werden; nur indirect, durch die Komplementbindungsmethode, ist es möglich gewesen, in Vitro, die Alexinaufnahme der Mikroben nachzuweisen.

Wenn man zeigen könnte, dass Rinderserum nur solche Mikroben, welche mit entsprechenden Immunsensibilisatoren und mit Alexin vorbehandelt sind, ausflockt, ganz wie die Blutkörperchen, so würde man im Rinderserum ein Reagens haben, mit Hilfe dessen man, mit bekannten Mikroben, die Diagnose eines unbekanntes Immuserums direkt in Vitro makroskopisch stellen könnte und womit andererseits mit bekanntem Serum unbekanntes Mikroben identifiziert werden könnten.

In diesem Fall würde die Konglutinationsreaktion einen praktischen Wert haben, weil sie der Serodiagnostik dienstbar gemacht werden könnte.

STRENG experimentierte unter andern mit Typhusbazillen und Colibazillen und konnte mit dieser Reaktion sehr gut einen Unterschied zwischen diesen beiden verwandten Bakterien nachweisen.

Fügte er zusammen Typhusbazillen *a* (siehe Fig.) mit inaktivem Typhusimmunserum *b* und Alexin *c* (z.B. eines Meerschweinchens) so wurden die Bazillen sensibilisiert und alexiniert und zogen das Konglutinin *d* aus dem inaktiven Rinder serum an, was makroskopisch sichtbar wurde durch die Zusammenballung, das Konglutinieren der Typhusbazillen. Liest er einen der genannten Faktoren weg oder ersetzte er das Typhusimmunserum durch Coliimmunserum, so blieb die Konglutination zurück.



Er gelangte dann auch zu der Überzeugung, dass die Konglutination, ebenso wie die Agglutination, eine spezifische Reaktion war und zu diagnostischen Zwecken sehr gut benutzt werden könnte.

Diese Zusammenballung der Mikroben ist nicht mit der Agglutination zu verwechseln; die Konglutinine lassen sich unter anderm, durch Dialyse von den Agglutininen trennen; Agglutinine des Rinderserums bleiben nach 24 stündiger Dialyse noch gelöst in dem Serum, während die bei der Dialyse zurückbleibenden Stoffe, die Konglutinine enthalten. Auch zeigte sich, dass die Gegenwart von Alexin, welche für das Entstehen der Zusammenballung der Mikroben eine *conditio sine qua non* war, auf die Agglutinationserscheinung hindernd wirkt.

Die Konglutination ist also nicht als ein Ausdruck für die, durch Sensibilisierung und Alexinaufnahme vergrößerte Empfindlichkeit der Mikroben, gegen die Agglutinine des Rinderserums, zu verstehen.

Konnte STRENG, wie oben mitgeteilt wurde, mit dieser Reaktion Typhus- und Colibazillen von einander unterscheiden, es gelang ihm auch, obgleich die Anzahl der diesbezüglichen Versuche gering war, nachzuweisen, dass diese Reaktion bei der Typhusdiagnose der GRÜBER-WIDALSchen Reaktion ähnlich war. Zwischen normalem und tuberkulösem Rinderserum konnte er keine Differenz nachweisen; ebenso wenig gelang ihm dies

zwischen normalem und tuberkulösem Menschenserum. Die weiter von ihm untersuchten Mikroben (*B. tuberculosis*, *B. diptheriae*, *V. cholerae* und *Staphylococcus pyogenes*) gaben alle mit Immunsensibilisatoren, Alexin und normalem Rinder-serum ein positives Resultat. Ob er zu diesen Versuchen lebende oder abgetötete Bakterien verwendete änderte nichts an dem Befund.

Nach STRENG wurde diese Reaktion von mehreren andern Forschern zu diagnostischen und andern Zwecken benutzt.

So untersuchte COHEN (7) mit Hilfe dieser Methode den Unterschied zwischen dem Influenzabazillus von PFEIFFER und drei morphologisch und kulturell ähnlichen Bazillen, welche er kultivierte bei der septichaemischen Form von Cerebrospinalmeningitis. Er erzielte befriedigende Resultate. GAY und LUCAS (8) gebrauchten die Reaktion für die Dysenteriediagnose, SWIFT und TIRO (9) um Streptotokken nachzuweisen, LUGER (10) um Typhus- und Paratyphusbazillen, Dysenteriebazillen und Choleravibrionen zu determinieren, während SAULI (11) mit Hilfe dieser Methode, welche in vielen Fällen zuverlässiger war als die Präzipitation, das Eiweiss mehrerer Pflanzenarten zu differenzieren wusste (Versuche mit Erbsen, Bohnen, Rüben, Klee).

Zur Syphilisdiagnose wurde die Reaktion von STRENG (12) angegeben, in seinem Vortrag für die Finnländische Akademie der Wissenschaften (1909 und 1910) und am ersten ausgearbeitet von KARVONEN (13). Ein Organextrakt (alkoholischer Rinderherzextrakt) wurde mit dem zu untersuchenden Serum und Pferdekomplement zusammengebracht. Nach einiger Zeit wurden Rinder Serum und Meerschweinchenblutkörperchen hinzugegeben. Tritt keine Konglutination ein, so ist Komplement in der ersten Phase absorbiert worden, d. h. das Serum reagiert positiv.

Aus Grund seiner Untersuchung mit 552 Sera meint KARVONEN diese Reaktion als eine komplettierende Nebenmethode der Komplementbindung bezeichnen zu können.

SIEBERT und MIRONESSEN (14) haben es unternommen, diese Reaktion bei Syphilis an einer Anzahl von Seris (100) nachzuprüfen. Hiervon waren 15 normale Sera, die in Uebereinstimmung mit der Wa. R. immer ein negatives Resultat gaben. Die übrigen 85 Fälle stammten vonluetischen Patienten und von

diesen ergaben 10 Fälle mit Wa. R. Differenzen; acht Patienten hatten hiervon sichere Luesanamnese. Die genannten Forscher gaben darum die Syphilisreaktion nach KARVONEN an neben der Original-Wa. R.

Auch HECHT (15) forschte den Wert dieser neuen Methode bei der Syphilisreaktion nach und kontrollierte dieselbe ebenso mit der Komplementbindungsreaktion; er erzielte mit 150 Seris ungefähr ähnliche Resultate, aber konnte auch die Reaktion der Wa-R. nicht vorziehen, weil das Ablesen der Resultate bei der Konglutination weit schwerer war als bei der Komplementbindung.

Zu ähnlichem Resultat gelangte JACOBÆUS (16), der statt Meerschweinchenblutkörperchen Schafblutkörperchen gebrauchte. Ueber das Ergebnis weiterer und sehr ausgedehnter Untersuchungen hat STRENG (17) zusammenfassend berichtet. Er untersuchte mehr als 1000 Sera und hat dabei die Resultate in 80—95% mit denen der WASSERMANSchen Reaktion übereinstimmend gefunden.

Zur Diagnose der Rotzkrankheit wurde diese Methode am ersten von PFEILER und WEBER (18, 19, 20) angegeben.

In ihrer ersten Publikation teilen sie ihre Erfahrung mit der neuen serodiagnostischen Methode mit bei 8 Pferden, wobei sie die Methode kontrollierten mit der Agglutination und der Komplementbindung. Das Resultat war vortrefflich. In der zweiten Mitteilung ist die Rede von Bazillenkonglutination bei Malleus, welche Reaktion von ihnen nicht so zuverlässig gefunden wurde als die Blutkörperchenkonglutination. Die dritte Arbeit der genannten Forscher betrifft wieder die Verwendung dieser letzten Reaktion.

Bei 45 rotzfreien Pferden (erste Gruppe) fiel die Reaktion negativ aus, ebenso wie die Agglutination und die Komplementbindung.

In der zweiten Gruppe handelte es sich um 45 Sera von Pferden, die auf Grund der Ergebnisse der Agglutinations- und Komplementbindungsmethode als rotzverdächtig bezeichnet werden mussten und die sich, bei der auf Grund davon vorgenommenen Tötung, auch als sicher rotzig erwiesen hatten. Diese 45 Sera gaben alle mit der Konglutination und der Komplementbindung positive Resultate; mit der Agglutina-

tion erzielte man nur in 50% der Fälle ein positives Resultat.

Die dritte Gruppe enthielt die Pferde, von denen das Serum mit der Agglutination und der Komplementbindung unsichere Resultate gegeben hatte und gerade in diesen Fällen, die schwersten für die Beurteilung, ergab die Konglutination, in Zusammenhang mit der Sektion, sicherere Resultate als die Komplementbindung.

Zugleich stellte sich heraus, dass durch Malleinisation bei gesunden Pferden Anti-Konglutinine entstanden, weil die Reaktion nach der Malleinprobe positiv ausfiel.

Auch STRANIGG (21), der die Konglutination bei Malleus noch feiner ausarbeitete, erzielte sehr schöne Resultate mit 82 Seris, aber konnte die Reaktion der Komplementbindung nicht vorziehen.

Ehe ich mit der Schilderung meiner Versuche mit dieser Reaktion anfangen will, will ich erst noch die Technik der Konglutinationsmethode behandeln, d.h. die erforderlichen Stoffe und deren Prüfung. Die Technik der Konglutinationsmethode ist der Komplementbindungsreaktion sehr ähnlich; der Unterschied zwischen diesen beiden Reaktionen ist hauptsächlich, dass als Index bei der hier genannten Reaktion, statt der Hämolyse, die Zusammenballung der roten Blutkörperchen gebraucht wird.

Zur Ausführung sind die folgenden Flüssigkeiten nötig:

1) Komplement, wozu bei dieser Methode frisches Pferdeserum gebraucht wird, das noch an demselben Tage entnommen wurde.

2) Das zu untersuchende Serum, welches erst durch Erhitzung in einem Wasserbad ($\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° C.) seines Komplements beraubt werden muss.

3) Ein mit dem zu untersuchenden Serum korrespondierender Bazillenextrakt.

4) Inaktives Rinderserum ($\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° C.) als konglutininhaltender Stoff.

5) Blutkörperchenaufschwemmung. Dazu gebrauchte ich, ebenso wie bei der Komplementbindung, defibriniertes und darauf dreimal gewaschenes Schafblut.

Um Irrtümern vorzubeugen empfiehlt es sich bei jedem Versuch als Kontrolle ein sicher positives und ein sicher

negatives Serum zu gebrauchen. Ebenso wie bei der Komplemen-
tbindung der Fall ist, müssen auch hier die verschiedenen
Flüssigkeiten, ehe der eigentliche Versuch angesetzt wird,
titriert werden. Auch diese Reaktion ist streng quantitativ;
wenn man eine zu grosse oder zu kleine Dosis nimmt, verliert
die Reaktion ganz und gar ihren Wert.

I. Titrierung des Komplements.

Um die kleinste Dosis des frischen Pferdeserums (Komple-
ment) zu bestimmen, fügt man einer sicher genügenden
Quantität inaktiven Rinderserums abnehmende Quantitäten
des Komplements zu, füllt mit physiologischer Kochsalzlösung
an zu gleichen Volumina und fügt, nachdem die Röhrchen 1
Stunde bei 37° C gestanden haben, 3 Tropfen 5% Hammel-
blutkörperchenaufschwemmung zu. Nachdem die Röhrchen 4
Stunden bei 37° C. gestanden haben, liest man die Reaktion ab.

Zur Kontrolle nimmt man ein Röhrchen (No. 8), in dem sich
nur eine ziemlich grosse Quantität Komplement befindet und
kein inaktives Rinderserum, um zu demonstrieren, dass das
Pferdeserum allein nicht konglutinierend wirkt; ein Röhrchen

TABELLE I.

No.	Inaktives Rinderserum.	Komplement.	Physiol. Na Cl lösung.	5 % Hammel- blutaufschw.	Befund.
1	0.1 cM ³ .	0.1 cM ³ .	Anfüllen zu gleichem Volumen.	3 Tropfen.	+
2	»	0.08 »		»	+
3	»	0.06 »		»	+
4	»	0.04 »		»	+
5	»	0.02 »		»	±
6	»	0.01 »		»	±
7	»	0.005 »		»	—
8	—	0.06 »		»	—
9	0.1 cM ³ .	—		»	—
10	—	—		»	—

(No. 9) um nachzuweisen, dass inaktives Rinderserum allein ebenso wenig konglutinierend wirkt, während Röhrchen No. 10 den Beweis liefert, dass auch die Hammelblutkörperchen nicht von selbst konglutinieren.

Aus hervorgehender Tabelle I geht solches hervor.

Eine schöne Konglutination wurde beobachtet in den Röhrchen 1, 2, 3 und 4; in 5 und 6 war die Reaktion zweifelhaft, während in No. 7, ebenso wie in den 3 Kontrollröhrchen, die Reaktion negativ ausfiel. Die minimale Quantität Komplement lag hier bei 0.04 cM^3 . Bei dem zweiten Vorversuch und dem eigentlichen Versuch wurde nun gearbeitet mit ein wenig grösserer Quantität, (in diesem Fall 0.06 cM^3). Nimmt man zweimal die minimale Dosis, so bekommt man, ebenso wie bei der Komplementbindung (Siehe meine Abhandlung in der *Folia Microbiologica*, 1 Jahrgang, Heft 3) einen Überschuss von Komplement und demzufolge ändern die schwach positiven Fälle sich in negative.

Nimmt man die richtig minimale Quantität, so läuft man bei dem eigentlichen Versuch Gefahr, dass diese Dosis zu klein ist, denn das zu untersuchende Serum und der Extrakt binden oft selber ein wenig Komplement, während man auch den Umstand berücksichtigen muss, dass der Titer des Komplements, in den Stunden, welche noch verlaufen, ehe man mit dem eigentlichen Versuch anfängt, ein wenig zurückgehen.

II. Titerstellung des inaktiven Rinderserums.

Wenn man bei der ersten Titrierung die minimale Quantität des Komplements bestimmt hat, so muss bei dem zweiten Vorversuch die minimale Quantität des inaktiven Rinderserums festgestellt werden, welche mit der bestimmten Quantität des Komplements noch gerade Konglutination gibt.

Diese Titrierung, mit der erforderlichen Kontrolle, wird im Tabelle II angegeben.

Die Zufügung der verschiedenen Flüssigkeiten und das Hinstellen in den Brutschrank bei 37° C. , geschah in derselben Weise als in Tabelle I mitgeteilt worden ist.

TABELLE II.

No.	Inaktives Rinderserum.	Komplement.	Physiol. Na Cl lösung.	5 % Hammelblutaufschw.	Befund.
1	0.05 cM ³ .	0.1 cM ³ .	Anfüllen zu gleichem Volumen.	3 Tropfen.	+
2	»	0.08 »		»	+
3	»	0.06 »		»	+
4	»	0.04 »		»	+
5	»	0.02 »		»	+
6	»	0.01 »		»	±
7	»	0.005 »		»	±
8	»	0.003 »		»	—
9	»	—		»	—
10	—	0.06 cM.		»	—
11	—	—		»	—
12	0.04 cM.	0.1 cM ³ .		»	+

Die minimale Quantität inaktiven Rinderserums, welche mit der bestimmten Quantität des Komplements noch eine positive Konglutination gibt, ist hier 0.02 cM³. Der Umstand, dass die zu verwendende Dosis möglichst dicht bei der minimalen liegen muss, was für das Komplement ein Hauptfordernis ist, hat hier gar nicht so viel Gewicht. Ein Überschuss von Rinderserum hat bei weitem nicht solche nachteilige Erfolge als ein Überschuss von Komplement. Zu dem eigentlichen Versuch benutzte ich denn auch immer die doppelte minimale Quantität, hier also 0,04 cM.³.

Obgleich man die Komplementdosis für jeden Versuch aufs neue bestimmen muss, so ist bei dem inaktiven Rinderserum die bestimmte Dosis mehr konstant; wie mitgeteilt wird, ist diese Dosis nach einigen Wochen noch zu gebrauchen. Dennoch geht, wie ich zeigen werde, die Konglutinindosis zurück.

III. Titrierung des Extraktes.

Da es eine bekannte Tatsache ist, dass die grösseren Dosen

der verschiedenen Extrakte allein schon Komplement binden und also die Konglutination hemmen können, so ist es notwendig voraus die Quantität des Extraktes zu bestimmen, welche allein nicht mehr hemmend wirkt. Gewöhnlich wird bei der Komplementbindung die Hälfte dieser Dosis als Titer verwendet; darum gebrauchte ich bei der Konglutination ebenso diese Quantität.

IV. *Titrierung der Blutkörperchenaufschwemmung.*

Dieser Vorversuch, welcher bei der Komplementbindung ausbleiben kann, ist hier viel wichtiger. Man arbeitet hier nämlich mit weit kleineren Dosen, sodass die Unterschiede in der Zahl der roten Blutkörperchen pro c.M³. schärfer hervorkommen.

Es ist darum notwendig, wenn man eine neue 5% Blutaufschwemmung gemacht hat, diese zu titrieren, hinsichtlich der bestimmten Quantität des inaktiven Serums.

Zu diesem Zweck bringt man zusammen, ausser der Titerdosis des Konglutinins, Komplement (des Pferdes) und abnehmende Quantitäten einer 5% Hammelblutkörperchenaufschwemmung.

Das erste Röhrchen, das eine vollständige Konglutination zeigt, enthält den Titer der Blutkörperchenaufschwemmung.

Verfügt man aber über ein Schaf, dem man wöchentlich nur ein wenig Blut entnimmt, in welcher günstigen Lage ich mich am Reichsseruminstitut befand, so kann man, ohne schädliche Erfolge, immer mit derselben Blutkörperchen-Quantität arbeiten. Die Dosis, welche ich für meine Versuche gebrauchte, war 3 Tropfen einer 5% Aufschwemmung.

Weiss man, auf obenerwähnte Weise, über die Stärke der verschiedenen Flüssigkeiten, Bescheid, so kann man mit dem eigentlichen Versuch anfangen, der, wie schon mitgeteilt wurde, der Komplementbindung sehr ähnlich ist. Auch hier ist das Komplement der Index; aber die Hämolyse wird bei der Konglutination durch die Zusammenballung der roten Blutkörperchen ersetzt.

Ich habe diese Reaktion verwendet bei Malleus, Abortus der Rinder und Syphilis. In den beiden ersteren Fällen kontrollierte ich dieselbe mit der Komplementbindung und der Agglutination, in dem letzten Falle nur mit der Komplementbindung.

A. *Konglutination bei Malleus.*

Zur Untersuchung auf Malleus konnten, wegen des sporadischen Auftretens dieser Krankheit in unsrem Lande, nur 7 Sera bekommen werden.

Drei dieser Sera stammten von Pferden des Fuhrrherrn L. in Rotterdam; diese Pferde reagierten auf die subkutane Mallein-injektion und auf die Ophtalmoreaktion in sehr typischer Weise. Ein wenig Blut dieser Pferde wurde genommen und auf Agglutination und Komplementbindung untersucht. Beide Reaktionen waren schön positiv. (Serum II am stärksten und Serum III am schwächsten).

Wie verhielten die Sera I, II und III sich nun zu der Konglutinationsreaktion?

Bei dem ersten Vorversuch, der Einstellung des Komplements, ergab sich, dass die minimale Quantität des Komplements, welche nötig war um 3 Tropfen einer 5 % Aufschwimmung von Hammelblutkörperchen, mit einer gewissen Dosis konglutinierenden Serums zu konglutinieren, 0.04 cM^3 . war.

Bei dem zweiten Vorversuch und dem eigentlichen Versuch arbeitete ich mit 0.06 cM^3 .

Die Titrierung des inaktiven Rinderserums (2^{er} Vorversuch) gab als minimale Dosis 0.01 cM^3 . an; gearbeitet wurde mit 0.02 cM^3 .

Der eigentliche Versuch.

Als Rotzbazillenextrakt gebrauchte ich Malleine brute und weil dieser Stoff in grösseren Dosen schon von selbst bindend wirkt, so musste voraus die Quantität bestimmt werden, welche nicht mehr hemmend wirkte. Es stellte sich heraus, dass diese Quantität 0.001 cM^3 . war; die Hälfte dieser Dosis (0.0005 cM^3 .) wurde als Titer verwendet.

Nun fügte ich der bestimmten Titerdosis des Extraktes abnehmende Quantitäten der zu untersuchenden Sera zu, nebst der bei dem ersten Vorversuch bestimmten Quantität Komplement, füllte mit physiologischer Kochsalzlösung an zu gleichen Volumina und stellte die Röhrrchen $1\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° C .

Es versteht sich, dass bei diesem Versuch die benötigte Kon-

No.	Komplement	Malleus- extrakt (Mallein)	Zu unter- suchende inaktive Sera	Physiolo- gische Na Cl lösung	5 ⁹ / ₁₆ Hammel- blutauf- schwemm.	Inaktives Rinderserum	Befund.
1	0,06 cM. ³	0,0005 cM. ³	0,1 cM. ³ I		3 Tropfen	0,02 cM. ³	keine Konglutination
2	»	»	0,08 » »		»	»	» »
3	»	»	0,06 » »		»	»	» »
4	»	»	0,04 » »		»	»	» »
5	»	»	0,02 » »		»	»	teilweise »
6	»	»	0,01 » »		»	»	Konglutination
7	»	»	0,005 » »		»	»	»
8	»	»	0,1 » II		»	»	keine Konglutination
9	»	»	0,08 » »		»	»	» »
10	»	»	0,06 » »		»	»	» »
11	»	»	0,04 » »		»	»	» »
12	»	»	0,02 » »		»	»	» »
13	»	»	0,01 » »		»	»	» »
14	»	»	0,005 » »		»	»	teilweise »
15	»	»	0,1 » III		»	»	keine Konglutination
16	»	»	0,08 » »		»	»	» »
17	»	»	0,06 » »		»	»	» »
18	»	»	0,04 » »		»	»	teilweise »
19	»	»	0,02 » »		»	»	» »
20	»	»	0,01 » »		»	»	Konglutination
21	»	»	0,005 » »		»	»	»
22	»	0,002 »	—		»	»	keine Konglutination
23	»	0,001 »	—		»	»	Konglutination
24	»	0,0005 »	—		»	»	»
25	»	—	0,1 » I		»	»	» »
26	»	—	0,04 » »		»	»	» »
27	»	—	0,1 » II		»	»	» »
28	»	—	0,04 » »		»	»	» »
29	»	—	0,1 » III		»	»	» »
30	»	—	0,04 » »		»	»	» »
31	—	0,001 cM. ³	0,1 I		»	»	keine Konglutination
32	—	0,0005 »	0,1 I		»	»	» »
33	—	0,001 »	0,1 II		»	»	» »
34	—	0,0005 »	0,1 II		»	»	» »
35	—	0,001 »	0,1 III		»	»	» »
36	—	0,0005 »	0,1 III		»	»	» »
37	—	—	—		»	»	» »
38	0,06 cM. ³	—	—		»	»	Konglutination
39	0,06 »	—	—		»	—	keine Konglutination
			Inaktives Normal Serum-Pferd.				
40	»	0,0005 cM. ³	0,1 cM. ³		»	0,02 cM. ³	Konglutination
41	»	»	0,08 »		»	»	» »
42	»	»	0,06 »		»	»	» »
43	»	»	0,04 »		»	»	» »
44	»	»	0,02 »		»	»	» »
45	»	»	0,01 »		»	»	» »
46	»	»	0,005 »		»	»	» »
47	»	—	0,1 »		»	»	» »
48	»	—	0,04 »		»	»	» »
49	—	0,001 cM. ³	0,1 »		»	»	keine Konglutination
50	—	0,0005 »	0,1 »		»	»	» »
51	—	0,001 »	—		»	»	» »
52	—	0,0005 »	—		»	»	» »
53	—	—	0,1 »		»	»	» »

Anfüllen zu gleichem Volumen.

trolle aufgenommen wurde, hinsichtlich welcher Kontrolle auf hervorstehende Tabelle verwiesen werden kann.

Nachdem die verschiedenen Flüssigkeiten in den Röhrchen $1\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° C. auf einander eingewirkt hatten, wurde jedem der Röhrchen 3 Tropfen einer 5 % Hammelblutkörperchenaufschwemmung und die Titerdosis des Rinderserums (0.02 cM^3 .) zugefügt, die Röhrchen gut geschüttelt und wieder bei 37° C. gestellt, aber nun während 4—6 Stunden. Nachdem die Röhrchen 8 Stunden bei Zimmertemperatur verweilt hatten, wurde das Resultat abgelesen.

Es wird mit abnehmenden Quantitäten der zu untersuchenden Sera gearbeitet, weil Pferdeserum oft schon spontan hemmende Stoffe enthält. Um diese nicht spezifischen Stoffe auszuschalten ($\frac{1}{2}$ Stunde erhitzen auf 56° C. genügt nicht) muss man diejenige Quantitäten der Sera gebrauchen, welche nicht mehr von selbst hemmend wirken. Aus diesem Grunde verwendet man die abnehmende Dosis der zu untersuchenden Sera, wodurch eine vorhergehende Titrierung unnötig ist.

Gewöhnlich aber beobachtet man die nicht spezifische Hemmung der Sera erst in Dosen über $0,2 \text{ cM}^3$.

Aus hervorstehender Tabelle geht hervor, dass alle 3 zu untersuchende Sera mit Malleusextrakt Komplement binden und man also mit Malleusseris zu tun hat. Ein ganz analoges Resultat also als mit Komplementbindung und Agglutination erzielt wurde.

Serum II, das bei der Komplementbindung und Agglutination am stärksten positiv war, war dies auch bei der Konglutination, während Serum III, das bei der Komplementbindung und Agglutination am schwächsten war, hier ein Resultat in gleichem Sinne gab.

Normalserum gab mit Malleusextrakt gar keine Hemmung der Konglutination (Kontrolle 40—47). Die übrigen Kontrollproben sprechen genügend für sich selbst; es stellte sich heraus, dass das Malleusextrakt in der Dosis von $0,002 \text{ cM}^3$. schon von selbst hemmend wirkte (Kontrolle 22); unter dieser Dosis aber nicht mehr (Kontrolle 23 und 24); die benutzten Sera wirkten ohne Extrakt nicht hemmend (Kontrolle 25—31). Kontrolle 39 gibt an, dass frisches Pferdekomplement ($0,06 \text{ cM}^3$.) ohne Rinderserum, nicht konglutinierend wirkt auf Hammelblut-

körperchen,; dennoch soll Pferdeserum (STRENG (5) teilt es mit) ebenso wie Rinderserum, neben Agglutinine auch Konglutine für Meerschweinchenblutkörperchen enthalten, sodass auch frisches Pferdeserum allein vielleicht Hammelblutkörperchen zusammenballen könnte. Am Ende meines Artikels komme ich hierauf in einem besonderen Abschnitt, über die Wirkung mehrerer Sera auf verschiedene Blutarten, zurück.

Ausser diesen 3 Seris von Pferden von einem Fuhrherrn, wurden noch an verschiedenen Zeiten 4 Sera auf Malleus untersucht und zwar von 4 verschiedenen Fällen. Zwei dieser Sera (I und III) gaben mit der Komplementbindungsreaktion und mit der Agglutination ein positives Resultat; die beiden anderen (II und IV) waren mit beiden Reaktionen negativ. Die Konglutinationsreaktion mit diesen 4 Seris fand ganz in der obenerwähnten Weise statt. Auch jetzt wurde als Malleus-extrakt Mallein brute gebraucht, von dem die Quantität bei Titrierung wieder auf 0,005 cM³. bestimmt wurde. Die zu verwendende Dosis des Komplements und die Quantität inaktiven Rinderserums wurden für jeden Versuch besonders festgestellt. Hinsichtlich des weiteren Verlaufs des Versuchs kann auf die erste Tabelle verwiesen werden. Die mit der Konglutinationsreaktion erzielten Resultate, waren auch mit diesen 4 Seris ganz dieselben als mit der Komplementbindung und der Agglutination; I und III waren positiv; II und IV negativ.

Normalserum gab in keinem der 4 Fälle ein positives Resultat.

Ogleich ich also nur eine ziemlich geringe Zahl von Malleus-fällen mit der Konglutinationsreaktion untersucht habe, so wage ich es dennoch, mit Rücksicht auf die analogen Resultate mit den beiden andern Methoden, diese neue Reaktion in geeigneten Fällen (bei Malleus) neben den beiden andern, zu empfehlen.

B. *Konglutination bei Syphilis.*

Meine Untersuchungen mit dieser Reaktion bei Syphilis beziehen sich auf 25 Fälle. Die zu diesen Versuchen erforderlichen Sera wurden mir wohlwollend verschafft von Dr. J. F. MAAS, Hautarzt in Rotterdam, der mir auch von jedem Serum das Resultat der Komplementbindungsreaktion mitteilte.

Als Syphilisextrakt benutzte ich das bekannte alkoholische Meerschweinchenherzextrakt, von dem ich zuvor die hemmende Wirkung bestimmte; 0,2 cM³ war die kleinste Dosis, welche Eigenhemmung zeigte; bei den Versuchen gebrauchte ich daher die Hälfte dieser Dosis. Das zu untersuchende Serum fügte ich in abnehmenden Quantitäten hinzu. Bei dem Vorversuch stellte ich heraus, dass die erforderliche Quantität des Komplements (frisches Pferdeserum) 0,05 cM.³ war. Nachdem die verschiedenen Röhrchen 1½ Stunde bei 37° C. gestanden hatten, wurden die voraus bestimmte Dosis inaktiven Rinderserums (0,02 cM.³) und 3 Tropfen einer 5% Hammelblutaufschwemmung (dreimal gewaschen) hinzugefügt; darauf wurden die Röhrchen 5 Stunden bei 37° C. hingestellt und nach 10 Stunden oder eher das Resultat abgelesen.

Aus untenstehender Tabelle geht der Versuch mit der nötigen Kontrolle deutlich hervor.

No.	Komplement	Syphilis-extrakt	Das zu untersuchende inaktives Serum	Phys. Na Cl	5% Hammelblut-Aufschwemmung	Inaktives Rinderserum.	Befund	
1	0,05 cM. ³	0,1 cM. ³	0,1 cM. ³	Anfüllen zu gleichem Volumen.	3 Tropfen	0,02 cM. ³	keine Konglutination	
2	»	»	0,09 »		»	»	»	»
3	»	»	0,08 »		»	»	»	»
4	»	»	0,07 »		»	»	»	»
5	»	»	0,06 »		»	»	»	»
6	»	»	0,05 »		»	»	»	»
7	»	»	0,04 »		»	»	»	»
8	»	»	0,03 »		»	»	»	»
9	»	»	0,02 »		»	»	»	teilweise
10	»	»	0,01 »		»	»	»	Konglutination
11	»	0,2	—		»	»	»	keine Konglutination
12	»	0,15	—		»	»	»	Konglutination
13	»	0,1	—		»	»	»	»
14	»	—	0,1 »		»	»	»	»
15	»	—	0,08 »		»	»	»	»
16	»	—	0,06 »		»	»	»	»
17	»	—	0,04 »		»	»	»	»
18	»	—	0,02 »		»	»	»	»
19	»	—	0,01 »		»	»	»	»
20	»	—	—		»	»	»	»
21	»	0,2	—		»	»	»	keine Konglutination
22	»	0,15	—		»	»	»	»
23	»	0,1	—		»	»	»	»
24	»	—	0,1 »		»	»	»	»
25	»	—	0,08 »		»	»	»	»
26	»	—	0,06 »		»	»	»	»
27	»	0,2	0,1 »		»	»	»	»
28	»	0,2	0,08 »		»	»	»	»

No.	Komplement	Syphilis-extrakt	Normales inaktives Menschen-serum	Phys. Na Cl	5% Hammel-blut-Aufschwem-mung	Inaktives Rinder-serum	Befund	
29	0,05 cM. ³	0,1 cM. ³	0,1 cM. ³	Anfüllen zu gleichem Volumen	3 Tropfen	0,02 cM. ³	Konglutination	
30	»	»	0,09 »		»	»	»	
31	»	»	0,08 »		»	»	»	
32	»	»	0,07 »		»	»	»	
33	»	»	0,06 »		»	»	»	
34	»	»	0,05 »		»	»	»	
35	»	»	0,04 »		»	»	»	
36	»	»	0,03 »		»	»	»	
37	»	»	0,02 »		»	»	»	
38	»	»	0,01 »		»	»	»	
39	»	—	0,1 »		»	»	»	
40	»	—	0,08 »		»	»	»	
41	»	—	0,06 »		»	»	»	
42	»	—	0,04 »		»	»	»	
43	»	—	0,02 »		»	»	»	
44	»	—	0,01 »		»	»	»	
45	—	—	0,1 »		»	»	keine Konglutination	
46	—	—	0,08 »		»	»	»	
47	—	—	0,06 »		»	»	»	
48	—	0,2	0,1 »		»	»	»	
49	—	0,2	0,08 »		»	»	»	
50	—	—	—		»	»	»	
			Zu untersuchendes Serum					
51	0,05 cM. ³	0,1 cM. ³	0,1 cM. ³			»	—	»
52	»	»	0,06 »			»	—	»
53	»	»	0,02 »			»	—	»
			Normalserum			»		
						»		
54	»	»	0,1 cM. ³			»	—	»
55	»	»	0,06 »			»	—	»
56	»	»	0,02 »			»	—	»

Das zu untersuchende Serum, das von einem Patienten mit sekundärer Syphilis stammte, hatte, wie Dr. MAAS mir mitteilte, mit der Komplementbindungsreaktion ein stark positives Resultat gegeben. Auch bei der Konglutinationsreaktion wurde ein stark positives Resultat erzielt. Es stellte sich ja heraus, das dieses Serum, bis in der Menge von 0,02 cM³, noch imstande war den Eintritt der Konglutination zu hemmen (No. I—X). Mit normalem Menschenserum tritt eine schöne Konglutination ein (No. 29—39).

Ohne Komplement (21—29 und 45—50) und ohne inaktives Rinderserum (51—56) blieb Konglutination aus. Auch die übrigen Kontrollversuche fielen gut aus.

Hier wurde also ein analoges Resultat erzielt sowohl mit der Konglutinations- als mit der Komplementbindungsreaktion. Dies war aber nicht der Fall mit allen untersuchten Seris.

Um kurz zu sein und zu gleicher Zeit eine deutliche Übersicht der Versuche zu geben, scheint es mir erwünscht diese, die Diagnose und die Resultate, in einer Tabelle zusammenzufassen und hier unten anzugeben. Die Untersuchung bezog sich, wie schon mitgeteilt wurde, auf 25 verschiedene Sera.

Serum.	Diagnose.	Resultat der Komplementbindungsreaktion.	Resultat der Konglutinationsreaktion.
I	Syphilis.	+	+
II	keine »	—	—
III	» »	—	—
IV	» »	—	—
V	Syphilis.	schwach +	schwach +
VI	»	+	—
VII	»	+	+
VIII	zweifelhaft.	schwach +	schwach +
IX	keine Syphilis.	—	—
X	Syphilis.	schwach +	+
XI	»	+	—
XII	keine »	—	—
XIII	» »	—	—
XIV	Syphilis.	+	+
XV	»	+	+
XVI	keine »	—	—
XVII	zweifelhaft.	sehr schwach +	—
XVIII	Syphilis.	+	+
XIX	»	+	+
XX	»	+	+
XXI	»	+	+
XXII	»	schwach +	schwach +
XXIII	»	+	—
XXIV	keine Syphilis.	—	—
XXV	» »	—	—

Mit + Konglutinationsreaktion wird gemeint, dass das zu untersuchende Serum positiv war, sodass in den betreffenden Röhrchen keine Zusammenballung der Blutkörperchen zu beobachten war; umgekehrt, also wenn das Serum negativ ist, so wird wohl Konglutination beobachtet.

Wenn die Resultate der Komplementbindung und der Konglutination mit einander verglichen werden, so stellt sich heraus,

dass mit den 25 untersuchten Seris in 20 Fällen, ein gleichlautendes Resultat erzielt wurde. In 5 Fällen wichen die mit beiden Reaktionen bekommenen Resultate von einander ab; die Sera 6, 9 und 23 gaben, der Diagnose gemäss, mit der Komplementbindung ein positives Resultat, aber mit der Konglutination ein negatives.

Um ganz sicher zu sein untersuchte ich nun selbst diese drei Sera mit der Komplementbindungsreaktion, hinsichtlich desselben Extraktes, das ich für die Konglutination gebrauchte. Auch ich erzielte bei diesen 3 Seris mit der Komplementbindung ein positives Resultat. Die beiden andern Abweichungen in den Reaktionen sind von weniger Wichtigkeit.

Serum X gab ein schwach positives Resultat mit der Komplementbindung, indem die Konglutinationsreaktion deutlich positiv war (Diagnose Syphilis); Serum XVII, das von einem Patienten stammte, von dem die Diagnose nicht mit Gewissheit zu stellen war, gab mit der Konglutinationsreaktion ein negatives und mit der Komplementbindung ein sehr schwach positives Resultat.

Wenn wir von diesen beiden letzten Fällen Abstand nehmen, so stellt sich heraus, dass von den 25 untersuchten Seris 3 ein abweichendes Resultat gaben, abweichend sowohl von der Diagnose als von der Komplementbindung, was total 12 % Abweichungen sein würde, um das Wort Fehler noch nicht zu gebrauchen.

In Bezug hierauf scheint es mir nicht angewiesen die Konglutinationsreaktion bei Syphilis neben die Komplementbindung zu stellen, darüber in keinem Fall, denn die letztere ergab sich zuverlässiger, während mit der ersteren noch mehrere Beschwerden verbunden sind (worauf ich später zurückkomme), welche bei der Komplementbindungsreaktion nicht anwesend sind.

C. *Konglutination beim seuchenhaften Verwerfen des Rindes.*

Für die Diagnose des seuchenhaften Verwerfens bei Rindern sind in den letzten Jahren besonders 2 Reaktionen von sehr grosser Wichtigkeit geworden, namentlich die Agglutination und die Komplementbindung. Das Serum von Rindern, welche verwerfen werden oder welche schon vor geräumen Zeit ver-

worfen haben, gibt eine schöne Komplementbindung mit einem Extrakt des Abortusbazillus nach BANG; auch enthält ein derartiges Serum Agglutinine gegen diese Bazillen, sei es, dass der Titer der Agglutination oft nicht höher ist als 1 : 100. Beide Reaktionen sind denn auch für die gewisse Diagnose des seuchenhaften Verwerfens unentbehrlich geworden.

Bedürfnis an eine dritte Reaktion, die Konglutinationsreaktion, besteht hier nicht, aber von einem wissenschaftlichen Standpunkt betrachtet, darf es für wichtig gehalten werden nachzuforschen, welche Resultate diese neue Reaktion beim Abortus der Rinder liefert.

Ich fange an die Aufmerksamkeit darauf zu lenken, dass es bei dieser Reaktion eine Schwierigkeit ist, dass für die Untersuchung von Rinderserum, es keinen Zweck hat voraus die Dosis des konglutinierenden Serums zu bestimmen, weil man für das zu untersuchende Serum ebenso Rinderserum gebraucht und zwar in grosser Quantität (0,1 cM³.—0,05 cM³.); dazu kommt noch, dass das zu untersuchende Serum schon beim Anfang des Versuchs mit dem Komplement und dem Extrakt anwesend ist und also nicht 1½ Stunde nach der Bindung als konglutinierendes Serum hinzugefügt wird. Um diesen Schwierigkeiten so viel wie möglich vorzubeugen, habe ich von dem zu untersuchenden Serum niemals Dosen über 0,05 cM³. genommen und dann abnehmende Quantitäten, wobei man aber wieder Gefahr läuft schwach positive Sera in negative zu verwandeln. Der Titer des konglutinierenden Serums bestimmte ich für jedem Versuch ins besondere und fügte es 1½ Stunde nach der Bindung hinzu.

Als Abortusextrakt wurden eine Serumbouillonkultur von Abortusbazillen, welcher Kultur ½ % Karbol zugefügt war, und ein klares Extrakt von Abortusbazillen gebraucht. Die minimale, noch von selbst hemmende Wirkung der Serumbouillonkultur lag bei 0,2 cM³, aus welchem Grunde ich bei den Versuchen die Hälfte dieser Dosis verwendete. Von dem Extrakt der Abortusbazillen, dass ich durch Erhitzung, schütteln, zentrifugieren und zerreiben der Bazillen bekam, (*Folia Microbiologica* I Jahrgang Heft 3) konnte immer eine Quantität von 0,2 0,1 und 0,05 cM³ gebraucht werden. Sowohl für die Komplementbindung als für die Konglutination benutzte ich bei

jedem Versuch, beide Extrakte; in keinem einzigen Fall sah ich, zwischen den beiden Stoffen, irgend eine Abweichung. Ausser dem Titer des konglutinierenden Serums wurde, ehe ich einen Versuch anstellte, selbstverständlich, der Titer des Komplements, wozu wieder frisches Pferdeserum diente, bestimmt.

Im Ganzen untersuchte ich mit diesen 3 Reaktionen 38 Sera auf seuchenhaftes Verwerfen. Die erzielten Resultate werden, ebenso wie bei Syphilis, in unterstehender Tabelle verzeichnet.

Serum. No.	Resultat der Agglutination.	Resultat der Komplementbindungs- reaktion.	Resultat der Konglutinations reaktion.
I	+	+	—
II	+	+	—
III	+	+	+
IV	—	—	—
V	+	+	+
VI	—	—	—
VII	+	+	+
VIII	+	+	—
IX	+	+	—
X	+	+	—
XI	—	—	—
XII	—	—	—
XIII	—	—	—
XIV	+	+	+
XV	+	+	+
XVI	+(schwach)	+(schwach)	—
XVII	+	+	+
XVIII	+	+	—
XIX	—	—	—
XX	+	+	+
XXI	+	+	+
XXII	—	—	—
XXIII	+	+	—
XXIV	—	—	—
XXV	—	—	—
XXVI	+	+	+
XXVII	+(schwach)	+(schwach)	—
XXVIII	—	—	—
XXIX	+(schwach)	+	—
XXX	+	+	—
XXXI	+	+	+
XXXII	+(schwach)	+	—
XXXIII	—	—	—
XXXIV	—	+(schwach)	—
XXXV	+	+	+
XXXVI	+	+	—
XXXVII	—	—	—
XXXVIII	—	—	—

Ebenso wie bei Syphilis mitgeteilt worden ist, wird auch hier unter + Konglutinationsreaktion verstanden, dass das untersuchte Serum positiv war.

In den betreffenden Röhrchen war also keine Zusammenballung der Blutkörperchen zu beobachten. Wenn wir hier die mit den drei verschiedenen Reaktionen erzielten Resultate genauer betrachten, so bemerken wir sofort, dass sie noch weit weniger schön sind als bei Syphilis. Von den 38 untersuchten Seris gaben nur 25 mit den 3 Reaktionen dasselbe Resultat. Die grosse Ähnlichkeit in Resultat, zwischen der Agglutination und der Komplementbindung fällt aber sofort auf; nur in zwei Fällen (Sera XXXIX und XXXII) war die Agglutination schwach und die Komplementbindung deutlich positiv, während in einem Fall (Serum XXXIV) eine negative Agglutination neben einer schwach positiven Komplementbindung zu beobachten war.

Um so mehr fiel darum der grosse Unterschied zwischen diesen beiden Reaktionen einerseits und der Konglutination andererseits auf. Von den 38 Seris gaben 13 ein abweichendes Resultat. Wenn wir dabei die negativen Resultate, welche die drei Reaktionen gemein haben, ausser Acht lassen und betrachten wir die 25 positiven Fälle, welche mit der Komplementbindung erreicht wurden, so sehen wir, dass von diesen 25 Fällen nur 11 mit der Konglutinationsreaktion positiv waren. Bei positiven Seris würde man also in 56% der Fälle, mit der Konglutinationsreaktion ein negatives Resultat erzielen.

Sei es, dass die neue Reaktion bei Malleus und auch noch wohl bei Syphilis zu gebrauchen ist, (meiner Meinung nach ist im Laboratorium kein Bedürfnis daran), für die Diagnose von Abortus ist sie unbrauchbar.

Aller Wahrscheinlichkeit nach spielt hier die Tatsache, dass das zu untersuchende Serum ein konglutinierendes Serum ist, die Hauptrolle.

Ehe ich zu dem letzten Abschnitt »die Wirkung verschiedener Blutsera auf verschiedene Blutarten« übergehe, will ich noch die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass an der Konglutinationsmethode sei es dass sie in der Zukunft noch in bestimmter Weise zu vervollständigen wäre, noch Fehler kleben, welche wir bei der Komplementbindungsreaktion nicht kennen. Fügt

man hier noch hinzu, dass die Übergänge von Konglutination und nicht-Konglutination, also die zweifelhaften Fälle, nicht so deutlich zu beobachten sind (obgleich ich gestehe, dass mit Übung hier viel zu erreichen ist) so habe ich meiner Meinung nach, die wichtigsten Bedenken gegen diese neue Reaktion erhoben.

Der Vorteil über die Komplementbindung besteht nur darin, dass nicht nötig ist für jeden Versuch ein Meerschweinchen zu töten. Die Bereitung von hämolytischem Serum ist zu einfach um sie als ein Bedenken gegen die Komplementbindung zu nennen.

Die Wirkung verschiedener Sera auf verschiedene Blutarten.

A. Rinderserum.

Um die Wirkung frischen Rinderserums auf verschiedene Blutarten nachzuforschen, bereitete ich von den letzteren jedesmal eine 5 % Aufschwemmung, brachte davon 3 Tropfen in Röhrchen, welche abnehmende Quantitäten frischen Rinderserums enthielten, füllte dieselben mit physiologischer Kochsalzlösung an zu gleichem Volumen und stellte die Röhrchen dann 4 Stunden bei 37° C., wonach das Resultat abgelesen wurde.

Pferdeblutkörperchen verhalten sich verschieden hinsichtlich frischen Rinderserums. In einigen Fällen beobachtet man Konglutination, in andern wieder nicht. Als Regel kann man sagen, dass grössere Quantitäten frischen Rinderserums (0,1 cM³. und höher) Pferdeblutkörperchen (3 Tropfen einer 5 % Aufschwemmung) hämolsieren.

Quantitäten frischen Rinderserums von 0,05 cM³. und weniger wirken bald konglutinierend, bald nimmt man keine Zusammenballung wahr.

Hammelblutkörperchen werden mittels frischen Rinderserums konglutiniert. Gewöhnlich beobachtet man noch Konglutination mit einer Quantität von 0,05 und 0,1 cM³. Mit kleineren Quantitäten bleibt Konglutination meistens aus. Dass bei den kleineren Quantitäten die Rede ist von Erschöpfung des Komplements (nicht der Konglutinine) geht aus dem Umstand hervor, dass, wenn man frisches Pferdeserum hinzufügt, (von dem man

voraus bestimmt hat, dass es keine Konglutinine enthält) auch mit noch kleineren Quantitäten frischen Rinderserums (bis $0,01 \text{ cM}^3$.) Konglutination erhalten wird. Dasselbe gilt für alle andre Blutkörperchen, die mit frischem Rinderserum konglutinieren.

Ziegenblutkörperchen zeigen viel Ähnlichkeit mit Hammelblutkörperchen. Mit sehr grossen Quantitäten frischen Rinderserums (über $0,04 \text{ cM}^3$.) beobachtet man Hämolyse; mit kleineren Quantitäten, bis einer Menge von ungefähr $0,1 \text{ cM}^3$., nimmt man Konglutination wahr, während Dosen kleiner als $0,1 \text{ cM}^3$. gewöhnlich keine Zusammenballung der Blutkörperchen veranlassen.

Schweineblutkörperchen werden konglutiniert mittels frischen Rinderserums bis einer Quantität von $0,2 \text{ cM}^3$. und $0,1 \text{ cM}^3$. Mit kleineren Quantitäten ist keine Konglutination zu beobachten.

Meerschweinchenblutkörperchen werden mittels frischen Rinderserums viel schneller hämolysiert als die andern Blutkörperchen. Oft beachtet man noch mit Quantitäten von $0,03 \text{ cM}^3$. totale Hämolyse. Selbstverständlich werden Rinderblutkörperchen mittels Rinderserum nicht konglutiniert. Auch mit andern ähnlichen Seris und Blutkörperchen ist dies der Fall.

B. *Pferdeserum.*

Die roten Blutkörperchen des Rindes, Schafes und der Ziege werden auch mittels grösseren Quantitäten frischen Pferdeserums nicht konglutiniert. Auch wirkt eine Dosis von $0,3 \text{ cM}^3$. noch nicht hämolytisch auf diese Blutkörperchen. Ebenso wenig beobachtet man Konglutination, wenn man frisches Pferdeserum auf die Schweine- und Meerschweinchenblutkörperchen einwirken lässt. Diese beiden letzten Arten von Blutkörperchen werden aber ein wenig leichter hämolysiert; eine Dosis von $0,2 \text{ cM}^3$. wirkt gewöhnlich hämolytisch.

C. *Schafserum.*

Pferdeblutkörperchen werden mittels grösserer Quantitäten frischen Schafserums (bis ungefähr $0,2 \text{ cM}^3$.) hämolysiert. Unter dieser Quantität beobachtet man Konglutination; oft aber kann diese schwach sein.

Rinderblutkörperchen zeigen mit frischem Schafserum gewöhnlich keine Konglutination. Bisweilen aber wirken wohl gröss-

sere Dosen dieses Serums (über $0,1 \text{ cM}^3$) konglutinierend.

Ziegenblutkörperchen werden nicht konglutiniert mittels frischen Schafserums.

Schweineblutkörperchen werden gewöhnlich nicht konglutiniert; bisweilen ist mit grösseren Dosen frischen Schafserums (über $0,2 \text{ cM}^3$) eine schwache Konglutination zu beobachten.

Meerschweinschenblutkörperchen werden mittels Schafserums (ebenso wie dies mit Rinderserum der Fall ist) leichter hämolysiert als andere rote Blutkörperchen. Mit kleineren Quantitäten (unter $0,05 \text{ cM}^3$) tritt keine Konglutination ein.

D. *Ziegenserum.*

Pferdeblutkörperchen werden mittels grösserer Quantitäten frischen Ziegenserums (über $0,1 \text{ cM}^3$) hämolysiert. Unter dieser Quantität nimmt man gewöhnlich keine, bisweilen aber eine deutliche Konglutination war.

Rinder- und Hammelblutkörperchen werden nicht konglutiniert.

Schweineblutkörperchen werden bald nicht, bald wohl konglutiniert; im letzteren Fall durch grössere Dosen Serum (über $0,2 \text{ cM}^3$).

Meerschweinchenblutkörperchen werden auch mittels frischen Ziegenserums leichter hämolysiert als die andern. Quantitäten von $0,03 \text{ cM}^3$ und darüber wirken gewöhnlich hämolysierend. Unter dieser Dosis tritt keine Konglutination ein.

E. *Schweineserum.*

Pferdeblutkörperchen werden hämolysiert mittels grösserer Quantitäten frischen Schweineserums; in einigen Fällen kann die Dosis, wobei noch vollständige Hämolysen dieser Blutkörperchen eintritt, sehr niedrig liegen (bei $0,03 \text{ cM}^3$). Mit kleineren Quantitäten tritt bald Konglutination ein, bald bleibt sie aus.

Rinderblutkörperchen werden ziemlich leicht hämolysiert mittels Schweineserums. Mit kleineren Quantitäten (Grenzdosis ungefähr $0,05 \text{ cM}^3$) tritt keine Konglutination ein.

Schafeblutkörperchen werden noch leichter hämolysiert mittels frischen Rinderserums. Gewöhnlich wirkt eine Dosis

von 0,03 cM.³ noch hämolytisch. Konglutination tritt nicht ein.

Ziegenblutkörperchen und Meerschweinschenblutkörperchen verhalten sich, hinsichtlich frischen Schweineserums, ganz wie die des Schafes.

F. *Meerschweinchenserum.*

Frisches Meerschweinchenserum wirkt auf keine einzige der 5 von mir gebrauchten Blutarten konglutinierend. In grösseren Quantitäten (über 0,20 cM.³) ist bei allen Hämolyse zu beobachten; bei Rinderblutkörperchen ist diese am schwächsten.

Der oben gegebenen kurzen Beschreibung der angestellten Versuche mit verschiedenen Seris und Blutarten, will ich sofort zufügen, dass es sehr gut möglich ist, dass bei Wiederholung der Versuche, kleine Abweichungen, nicht nur hinsichtlich der genannten Quantitäten, sondern auch betreffs des hier und dort Auftretens der Konglutination gefunden werden.

Aus vorstehendem Résumé geht genügend hervor, welches Resultat man zu erwarten hat.

Wenn man kurz das Resultat dieser Versuche zusammenfasst, stellt es sich heraus, dass man nicht berechtigt ist im allgemeinen zu sprechen von einem Serum, das konglutinierend wirkt. Dies darf man nur tun, wenn man dazu die Art oder Arten der Blutkörperchen in Bezug auf welche es konglutinierend wirken sollte, nennt. Wenn man ja die erzielten Resultate nachliest, so wird es jedesmal klar sein, dass in Bezug auf ein bestimmtes Serum verschiedene Blutarten sich ganz verschieden betragen können. Sogar Rinderserum, das konglutinierende Serum im höchsten Grade, ist oft nicht imstande Pferd Blutkörperchen zu konglutinieren.

Es ergibt sich, dass die meisten Sera, in grösseren Quantitäten, genügende Normalhämolysine enthalten um mehrere Blutkörperchenarten zu lösen; ins besondere scheint es, dass Meerschweinschenblutkörperchen leicht hämolytisch werden. Schweineserum scheint die grösste Zahl von Normalhämolysinen zu enthalten.

Vorstehende Versuche beziehen sich auf frische, eben gewonnene Blutsera; die unten verzeichneten aber sind angestellt

worden um nachzuforschen, welche Wirkung inaktives Rinder-
serum ($\frac{1}{2}$ Stunde 58° C.) auf die verschiedenen Blutarten ausübt.
Da ich bei diesen Versuchen auf eine eigentümliche Erscheinung
gestossen habe, so will ich, um diese Erscheinung deutlich
hervorzuheben, die Versuche ganz in Tabellen wiedergeben.
Diese Versuche beziehen sich auf 2 verschiedene Rinderseris
(R. S. I. & II.), welche ich nach Inaktivierung auf mehrere
Blutarten des Pferdes, Schafes, der Ziege, des Schweines und
des Meerschweinchens einwirken liess.

Zur Kontrolle wurde jede Reaktion wiederholt, aber nun
unter Hinzufügung von Komplement (frisches Pferdeserum P.S.)
Die Einwirkung der verschiedenen Flüssigkeiten auf einander
geschah bei 37° C. während 4 Stunden. Wieder 4 Stunden
später wurden die Resultate abgelesen, nachdem die Röhren
erst vorsichtig auf dem Finger umgekehrt waren.

No.	Inaktives R. S. I.	Pferdeblut 5 %.	Phys. Na Cl	Frisches P. S.	Resultat.	
1	0,4 cM. ³	3 Tropfen	Anfüllen zu gleichem Volumen.	0,1 cM. ³	Konglutination	
2	0,3 »	»		»	»	} gelbl. klare Flüssig- keit mit kleinen, roten Flöckchen. (teilweise). (teilweise).
3	0,2 »	»		»	»	
4	0,1 »	»		»	»	
5	0,05 »	»		»	»	
6	0,03 »	»		»	keine Konglutination.	
7	9,01 »	»		»	»	} vollkommen was- serhelle Flüssig- keit, in dem sich einige schöne, grosse, dunkelrote Flocken befinden. (teilweise). (teilweise).
8	0,005 »	»		»	»	
9	0,4 »	»		—	Konglutination	
10	0,3 »	»		—	»	
11	0,2 »	»		—	»	
12	0,1 »	»		—	»	
13	0,05 »	»		—	»	
14	0,03 »	»		—	»	
15	0,01 »	»		—	»	
16	0,005 »	»		—	»	
		Schafeblut 5 %				
17	0,4 »	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.	
18	0,3 »	»		»	»	
19	0,2 »	»		»	»	
20	0,1 »	»		»	»	
21	0,05 »	»		»	»	
22	0,03 »	»		»	»	
23	0,01 »	»		»	»	
24	0,005 »	»		»	keine Konglutination.	
25	0,4 »	»		—	teilweise Konglutination.	

No.	Inaktives R. S. I.	Schafeblut 5 %.	Phys. Na Cl	Frisches P. S.	Resultat.
26	0,3 cM. ³	3 Tropfen		—	teilweise Konglutination.
27	0,2 »	»		—	sehr geringe »
28	0,1 »	»		—	keine Konglutination.
29	0,05 »	»		—	» »
30	0,03 »	»		—	» »
31	0,01 »	»		—	» »
32	0,005 »	»		—	» »
		Ziegenblut 5 %.			
33	0,4 »	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.
34	0,3 »	»		»	»
35	0,2 »	»		»	»
36	0,1 »	»		»	»
37	0,05 »	»		»	»
38	0,03 »	»		»	»
39	0,01 »	»		»	teilweise Konglutination.
40	0,005 »	»		»	keine »
41	0,4 »	»		—	»
42	0,3 »	»		—	»
43	0,2 »	»		—	»
44	0,1 »	»		—	»
45	0,05 »	»		—	»
46	0,03 »	»		—	»
47	0,01 »	»		—	»
48	0,005 »	»		—	»
		Schweine- blut 5 %.			
49	0,4 »	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.
50	0,3 »	»		»	»
51	0,2 »	»		»	»
52	0,1 »	»		»	»
53	0,05 »	»		»	»
54	0,03 »	»		»	»
55	0,01 »	»		»	»
56	0,005 »	»		»	teilweise »
57	0,4 »	»		—	Konglutination.
58	0,3 »	»		—	teilweise »
59	0,2 »	»		—	keine »
60	0,1 »	»		—	»
61	0,05 »	»		—	»
62	0,03 »	»		—	»
63	0,01 »	»		—	»
64	0,005 »	»		—	»
		Meerschw.- blut 5 %.			
65	0,4 »	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.
66	0,3 »	»		»	»
67	0,2 »	»		»	»

Anfüllen zu gleichem Volumen.

No.	Inaktives R. S. I.	Meersch.- blut 5%.	Phys. Na Cl	Frisches P. S.	Resultat.	
68	0,1 cM. ³	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.	
69	0,05 »	»		»	»	
70	0,03 »	»		»	»	
71	0,01 »	»		»	teilweise Konglutination.	
72	0,005 »	»		»	»	
73	0,4 »	»		—	»	
74	0,3 »	»		—	»	
75	0,2 »	»		—	keine Konglutination.	
76	0,1 »	»		—	»	
77	0,05 »	»		—	»	
78	0,03 »	»		—	»	
79	0,01 »	»		—	»	
80	0,005 »	»		—	»	
	Inaktives R. S. II.	Pferdeblut 5 %.				
81	0,4 cM. ³	3 Tropfen	Anfüllen zu gleichem Volumen	0,1 cM. ³	Konglutination	
82	0,3 »	»		»	»	} Flüssigkeit ist hellrot gefärbt.
83	0,2 »	»		»	»	
84	0,1 »	»		»	»	
85	0,05 »	»		»	»	
86	0,03 »	»		»	»	teilweise Konglutination.
87	0,01 »	»		»	»	keine Konglutination.
88	0,005 »	»		»	»	»
89	0,4 »	»		—	—	Konglutination
90	0,3 »	»		—	—	»
91	0,2 »	»		—	—	»
92	0,1 »	»		—	—	»
93	0,05 »	»		—	—	»
94	0,03 »	»		—	—	»
95	0,01 »	»		—	—	»
96	0,005 »	»		—	—	teilweise Konglutination.
		Schafeblut 5 %.				
97	0,4 »	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.	
98	0,3 »	»		»	»	
99	0,2 »	»		»	»	
100	0,1 »	»		»	»	
101	0,05 »	»		»	»	
102	0,03 »	»		»	»	
103	0,01 »	»		»	teilweise »	
104	0,005 »	»		»	»	
105	0,4 »	»		—	Konglutination.	
106	0,3 »	»		—	teilweise Konglutination.	
107	0,2 »	»		—	»	
108	0,1 »	»		—	keine »	
109	0,05 »	»		—	»	
110	0,03 »	»		—	»	
111	0,01 »	»		—	»	
112	0,005 »	»		—	»	

No.	Inaktives R. S.	II.	Ziegenblut 5 %	Phys. Na Cl	Frisches P. S.	Resultat.
113	0,4	cM ³	3 Tropfen		0,1 cM. ³	Konglutination.
114	0,3	»	»		»	»
115	0,2	»	»		»	»
116	0,1	»	»		»	»
117	0,05	»	»		»	»
118	0,03	»	»		»	»
119	0,01	»	»		»	»
120	0,005	»	»		»	teilweise
121	0,4	»	»		—	keine
122	0,3	»	»		—	»
123	0,2	»	»		—	»
124	0,1	»	»		—	»
125	0,05	»	»		—	»
126	0,03	»	»		—	»
127	0,01	»	»		—	»
128	0,005	»	»		—	»
			Schweine- blut 5 %.			
			3 Tropfen			
129	0,4	»	»		0,1 cM. ³	Konglutination.
130	0,3	»	»		»	»
131	0,2	»	»		»	»
132	0,1	»	»		»	»
133	0,05	»	»		»	»
134	0,03	»	»		»	»
135	0,01	»	»		»	»
136	0,005	»	»		»	»
137	0,4	»	»		—	»
138	0,3	»	»		—	teilweise Konglutination.
139	0,2	»	»		—	keine
140	0,1	»	»		—	»
141	0,05	»	»		—	»
142	0,03	»	»		—	»
143	0,01	»	»		—	»
144	0,005	»	»		—	»
			Meerschw.; blut 5 %.			
			3 Tropfen			
145	0,4	»	»		0,1 cM. ³	Konglutination.
146	0,3	»	»		»	»
147	0,2	»	»		»	»
148	0,1	»	»		»	»
149	0,05	»	»		»	»
150	0,03	»	»		»	»
151	0,01	»	»		»	»
152	0,005	»	»		»	teilweise
153	0,4	»	»		—	»
154	0,3	»	»		—	»
155	0,2	»	»		—	keine
156	0,1	»	»		—	»
157	0,05	»	»		—	»
158	0,03	»	»		—	»
159	0,01	»	»		—	»
160	0,005	»	»		—	»

Anfüllen zu gleichem Volumen.

Wenn wir aus vorstehenden Tabellen erst die Resultate betrachten, erzielt durch die Einwirkung inaktiven Rinderserums auf die verschiedenen Blutarten, unter Hinzufügung frischen Pferdeserums und wir vergleichen diese mit den Resultaten, erzielt durch Einwirkung frischen Rinderserums auf die Blutarten, so fallen dabei zwei Besonderheiten auf.

1. Durch inaktives Rinderserum + eine konstante Quantität frischen Pferdeserums, ist mit weit kleineren Dosen Konglutination wahrzunehmen, als wenn man nur frisches Rinderserum gebraucht, was zweifellos seine Ursache darin findet, dass bei den kleineren Dosen frischen Rinderserums die Komplementmenge zu gering wird.

2. Das Hämolsieren der verschiedenen Blutkörperchenarten durch die Normalhämolsine aus dem frischen Rinderserum verschwindet fast ganz, wenn man inaktives Rinderserum und frisches Pferdeserum gebraucht. Es scheint, dass die Normalhämolsine durch das Inaktivieren zum grössten Teil vernichtet werden und dass frisches Pferdeserum wenig oder keine Normalhämolsine für die verschiedenen Blutkörperchen enthält.

Die wichtigste Besonderheit in vorstehenden Tabellen nimmt man aber wahr, wenn man die Resultate betrachtet, welche erzielt worden sind durch die Einwirkung inaktiven Rinderserums auf die verschiedenen Blutarten, ohne Zufügung von Komplement.

Dann fällt sofort auf, dass grössere Dosen inaktiven Rinderserums die verschiedenen Blutkörperchen (ausgenommen die der Ziege) auch ohne Komplement, konglutinieren können, aber vor allem, dass Pferdeblutkörperchen durch inaktives Rinderserum, ohne Zufügung von Komplement, noch schöner konglutiniert werden als durch inaktives Rinderserum + frisches Pferdeserum.

Vergleicht man No. 1—8 mit 9—16 so ergibt sich, dass inaktives Rinderserum + frisches Pferdeserum Pferdeblutkörperchen schon bei einer Dosis von $0,1 \text{ cM}^3$ teilweise zu konglutinieren anfängt, während bei $0,03 \text{ cM}^3$ gar keine Konglutination mehr eintritt.

Wenn man nur inaktives Rinderserum gebraucht, ohne frisches Pferdeserum, so beobachtet man erst bei $0,01 \text{ cM}^3$ teilweise Konglutination, sodass also das Komplement gerade die Konglutination hintertreibt. Auch die Farbe der Flüssigkeit ist

anders; obgleich die Flüssigkeit bei No. 1—4 schwachrot gefärbt ist, was verursacht wird durch eine schwache Hämolyse der Blutkörperchen mittels der Normalhämolysine, welche durch die Inaktivierung noch nicht ganz vernichtet sind, bei No. 9—14 ist die Flüssigkeit wie klares Wasser. Die noch anwesenden Normalhämolysine finden hier kein Komplement um die Blutkörperchen zu hämolysieren, sodass man also gelangt zu der wichtigsten Tatsache: »ohne Komplement keine Hämolyse; ohne Komplement wohl Konglutination«.

Wenn man in den Tabellen No. 81—88 mit No. 89—96, wobei ein andres, inaktives Rinderserum gebraucht wurde, vergleicht, so gelangt man zu demselben Resultat; auch geht die Konglutination eben so gut weiter ohne Komplement als mit Komplement. Auch die Art der Flocken ist anders.

Wenn Komplement anwesend ist, so teilen die niedergeschlagenen Blutkörperchen sich, nach schwachem Umschütteln, in feine Flöckchen; ist kein Komplement anwesend, so beobachtet man in einer wasserhellen Flüssigkeit nur 1 à 2 schwere Flocken.

Bei allen andern Blutarten (ausgenommen die der Ziege) ist auch diese Konglutination wahrzunehmen, aber nur, wenn grössere Quantitäten inaktiven Rinderserums gebraucht werden.

Diese Versuche mit Pferdeblutkörperchen und inaktivem Rinderserum habe ich wiederholt mit 20 verschiedenen inaktiven Rinderseris und verschiedenen Arten von Pferdeblutkörperchen.

Bei allen diesen Versuchen stiess ich nur einmal auf ein inaktives Rinderserum, das ohne Komplement Pferdeblutkörperchen nicht zu konglutinieren vermochte; bei allen andern trat ohne Hinzufügung von Komplement eine schöne Konglutination ein, welche Konglutination in allen Fällen auch wieder schöner war, als wenn Komplement hinzugefügt worden war.

Auf diese wichtige Erscheinung: »Ohne Komplement doch Konglutination«, was nicht passt in der Theorie von BORDET und GAY über das Wesen der Konglutination, hoffe ich später zurückzukommen.

Das Einzige was man anführen könnte ist, dass man es in den Fällen wo Konglutination auftritt ohne Komplement, nicht zu tun hat mit Konglutination im vollsten Sinne des Wortes, sondern mit Agglutination.

L I T E R A T U R.

1. EHRLICH und SACHS. Berl. Klin. Wochenschr. 1902. S. 492.
 2. BORDET et PARKER GAY. Annal. de l'Inst. Past. Bd. 20, S. 467.
 3. BORDET et STRENG. Centr.bl. f. Bakt. orig. Bd. 49, S. 260.
 4. SACHS und BAUER. Arb. a. d. Königl. Inst. f. experiment. Therapie zu Frankfort am Main. 1907.
 5. STRENG. Zeitschr. f. Imm. forsch. Orig. Bd. 2, S. 415.
 6. Idem. Centr.bl. f. Bakt. orig. Bd. 50, S. 47.
 7. COHEN. Annal. de l'Inst. Past. Bd. 23, S. 273.
 8. GAY and LUCAS. Proc. of the Society f. exp. Biol. and Med. 1910.
 9. SWIFT and THRO. Arch. Intern. med. 1911.
 10. LUGER. Centr.bl. f. Bakt. orig. Bd. 65, S. 390.
 11. SAULI. Zeitschr. f. Imm. forsch. orig. Bd. 9, S. 359.
 12. STRENG. Finska läkares ällskapets handlingar. 1910.
 13. KARVONEN. Arch. f. Dermat. u. Syphilis. Bd. 108. Heft 3.
 14. SIEBERT und MIRONESCU. Deutsche med. Wochenschr. 1911. S. 2084.
 15. HECHT. Berl. Klin. Wochenschr. Bd. 1912. S. 58.
 16. JACOBÆUS. Zeitschr. f. Imm. forsch. orig. Bd. 8, S. 445.
 17. STRENG. Zieglers Beiträge zur path. Anatomie. Bd. 51, S. 279.
 18. PFEILER und WEBER. Berl. tierärztl. Wochenschr. 1912. No. 43, S. 785.
 19. Idem. » » » » » 47, » 873.
 20. Idem. Zeitschr. f. Inf. Kr.heiten der Haustieren.
Bd. 12, S. 397.
 21. STRANIGG. Zeitschr. f. Inf. Kr.heiten der Haustiere. Bd. 14,
S. 166, S. 297.
-

IMMUNISATION ARTIFICIELLE CONTRE LA PIROPLASMOSE DU BÉTAIL EUROPÉEN IMPORTÉ AU BRÉSIL

PAR

L. MISSON.

Directeur de l'Industrie Animale de l'Etat de São Paulo.

Dans un article publié précédemment dans le numéro du 1^{er} Août 1912, des Annales de Gembloux, en même temps que je justifiais l'importation au Brésil des meilleures races de bétail européen, dans le but de les croiser avec les races indigènes, j'indiquais les insuccès qui avaient marqué les premières importations et la raison principale de ces échecs.

Je veux parler de la piroplasmose bovine, connue dans presque toute l'Amérique du Sud sous le nom de *tristeza*.

Pour la clarté de cet article, je reverrai rapidement tout ce que j'ai déjà dit au sujet de cette maladie, la découverte, par NUTTAL et HADWEN, des effets du bleu de trypan sur le protozoaire qui en est la cause et enfin les expériences auxquelles se sont livrés STOCKMAN à Londres et le Dr. THEILER dans l'Afrique du Sud.

Avec mon collègue et ami le Dr. RAQUET, qui à ce moment était chargé de l'organisation du Poste Zootechnique de São Paulo, nous pûmes déjà, en 1907, avec les animaux importés à cette époque, arriver à la conclusion que la maladie, jusqu' alors non déterminée, qui décimait le bétail importé, n'était autre que la piroplasmose bovine, produite par le piroplasma bigeminum, transmis aux animaux par les tiques et constater, d'accord avec les indications de SMITH et KILBORNE, que ce piroplasma produisait une maladie très grave, contre laquelle les animaux étaient généralement immunisés après une première attaque assez forte.

Il nous fut possible aussi de constater que les pertes étaient beaucoup moindres lorsque l'on avait soin de prendre les précautions suivantes :

1^o. de n'importer que des animaux jeunes, âgés de 12 à 14 mois, qui, toujours se sont montrés beaucoup plus résistants que les animaux ayant atteint leur complet développement ;

2^o. de s'abstenir d'importer des génisses pleines, qui toujours avortent quand elles sont atteintes de la maladie et souvent y succombent ;

3^o. de ne faire l'importation au Brésil que pendant la saison d'hiver, d'Avril à fin Septembre, afin que les animaux souffrent moins du changement de climat ;

4^o. afin de pratiquer le plus tôt possible l'immunisation naturelle par l'application de tiques virulents en quantité limitée, ou l'immunisation artificielle par l'injection sous-cutanée, aux animaux importés, de sang virulent d'un animal rétabli depuis peu d'une attaque de piroplasmose.

Lors des importations qui furent faites les années suivantes, il fut tenu compte des conseils énumérés plus haut et les pertes, qui autrefois étaient de 90 % et plus, diminuèrent rapidement ; elles furent réduites à 33 % en 1908, à 13 % en 1909 et tombèrent à 7 % en 1910. En 1911, elles furent un peu plus élevées.

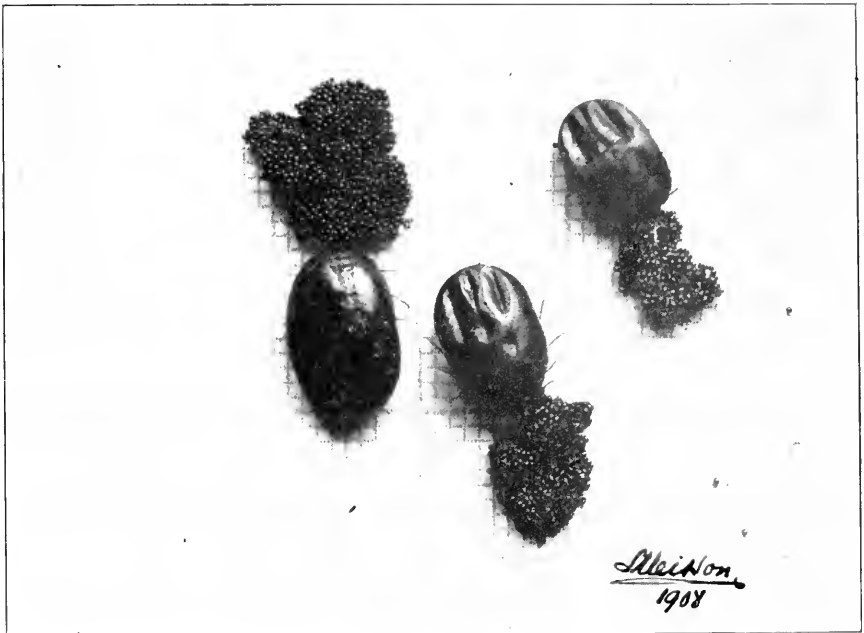
En présence de cette importante diminution de la mortalité, les importations augmentèrent rapidement et pendant les 4 dernières années, j'ai acheté en Europe, tant pour le Gouvernement que pour les particuliers dont l'État subventionnait les achats, de 51 bovidés en 1909, de 115 en 1910, de 115 en 1911 et de 138 en 1912, soit un total de 419 en 4 ans.

Par les études réalisées à São Paulo, tant par le Dr. CARINI, Directeur de l'Institut PASTEUR, que par notre service vétérinaire et spécialement par le Dr. LUIZ PICOLLO, qui pendant longtemps fut le seul vétérinaire de la Direction de l'Industrie animale, nous avons pu nous convaincre que la piroplasmose existe pour ainsi dire dans toutes les fermes de l'État de São Paulo, où tous les animaux bovins qui y sont nés et qui y ont été élevés ont eu la maladie et conservent dans le sang le piroplasma virulent.

La meilleure preuve de ce que j'avance réside dans le fait

PLANCHE I.

Folia Microbiologica III.
MISSON).



Tiques avec leurs œufs, chaque division correspond à un millimètre carré.

PLANCHE II.

Folia Microbiologica III.
(MISSON .



Jeunes tiques sur un pieux d'enclos.

que de 721 vaches et génisses qui ont été envoyées au Poste Zootechnique Central depuis sa fondation, de tous les coins de l'Etat, pour les reproducteurs du Gouvernement, *une seule*, a été atteinte de tristeza. Il s'agissait d'une génisse née et élevée dans un étable de la ville, qui n'avait jamais été piquée par les tiques, et qui, par conséquent, n'avait jamais pu avoir la maladie ni être immunisée.

Aucune des autres, provenant des fermes d'élevage de l'intérieur du pays, n'a présenté le moindre signe de maladie, ce qui prouve que toute étaient déjà immunisées et que, par conséquent, la tristeza existait dans les fermes d'où elles venaient.

Il est donc indispensable, que tous les reproducteurs bovins importés soient eux-mêmes immunisés de suite, si nous voulons que plus tard, quand ils auront acquis un plus grand développement et que, pour cette même raison, ils seront plus sensibles, ils ne succombent pas à la maladie.

Les recherches effectuées par le Dr. CARINI lui ont permis de constater que nous possédons aussi, à S^o Paulo, l'*anaplasma marginale*, découvert par le Dr. ARNOLD THEILER au Transvaal en 1910, et que les animaux importés sont très souvent atteints des deux maladies, la seconde, l'anaplasmose étant généralement plus grave encore que la première.

Immunisation.

En 1909, le professeur NUTTALL, de Cambridge, en collaboration avec HADWEN, montrait l'efficacité de l'application du bleu de trypan dans la piroplasmose du chien et cette efficacité fut confirmée, quelque temps après par des expériences de Mr. JOWETT, de Capetown, et du Dr. K. F. MEYER, de l'Institut bactériologique d'Onderstepoort.

Peu après, NUTTALL et HADWEN entreprirent de nouvelles expériences ayant pour but d'étudier les effets de ce même médicament sur les animaux souffrant de la piroplasmose bovine, et ils conclurent que le bleu de trypan serait probablement un remède efficace pour le traitement de la piroplasmose. Ils prouvèrent de plus que ce médicament n'avait aucun effet nuisible sur la santé des animaux.

La même année, Mr. STOCKMAN, chef du service vétérinaire

du Gouvernement anglais, de Londres, entreprit une série d'expériences qui corroborèrent pleinement les résultats obtenus par NUTTALL. Enfin, le Dr. THEILER, de Prétoria, confirma absolument les observations précédentes dans un article très complet qu'il publia en Novembre 1911 dans »l'Agricultural Journal of South Africa«, en conseillant franchement son emploi dans les cas d'infection artificielle.

Jugeant cette découverte comme étant d'une importance capitale pour les éleveurs de São Paulo, je fis la traduction complète de cet article et le publiai dans le »Criador Paulista« de Décembre 1911.

Peu de temps après, le 18 Février 1912, j'eus l'occasion d'appliquer le bleu de trypan sur un taureau Bolled Angus, importé d'Argentine, qui était bien attaqué de piroplassose *contractée naturellement*. Il était déjà atteint d'hématurie et l'examen microscopique démontra la présence de nombreux piroplasses dans le sang. Je dois ajouter que cet animal était déjà d'un certain âge, ce qui, ajouté au fait que l'immunisation était naturelle, rendait la guérison plus difficile.

Il lui fût appliqué 200 cent. cubes de solution de bleu de trypan, et l'effet de cette injection sous cutanée ne se fit pas attendre. Les parasites, très nombreux dans les préparations faites avant l'injection, avaient disparu complètement dans celles qui furent préparées avec le sang prélevé le lendemain; l'urine rouge avait cessé et le taureau, fort triste la veille mangeait et ruminait comme un animal absolument sain.

Le 5 et le 12 Mars, deux nouvelles injections de bleu de trypan furent faites, absolument dans les mêmes conditions, sur deux génisses de même race, toutes deux se rétablissant parfaitement en quelques jours.

Je dois faire remarquer que ces résultats, *tous obtenus dans des cas d'infection naturelle*, sont d'autant plus remarquables, que 3 autres animaux, (1 taureau et 2 génisses), de même race, de même âge et de même origine, qui ne furent pas traités lorsqu'ils tombèrent malades, (parce que à ce moment le remède n'était pas encore connu ici), moururent tous trois, rapidement, peu de temps après l'apparition de la maladie.

D'autres applications de bleu de trypan furent faites plus tard par le service vétérinaire de la Direction de l'Industrie animale :

1°. le 1^{er} Mars, sur une génisse Hereford importée d'Argentine et atteinte d'*anaplasmose*, confirmée par l'examen microscopique. Elle mourut subitement, le même jour ;

2°. le 14 Mars, sur une génisse Schwyz née au Poste Zootechnique Central, atteinte de *anaplasmose*? et qui était guérie le 20 du même mois ;

3°. le 15 Avril, sur une autre vache Hereford importé d'Argentine, infectée naturellement de piroplasmose, et qui de même, guérit rapidement.

Tous ces animaux, traités par le bleu de trypan, depuis 10 mois, ont, à diverses reprises, été attaqués et infectés par les tiques, au Poste Zootechnique Central ou dans les fermes de l'intérieur où ils ont été envoyés et où quelques uns vivent en pleine liberté dans la campagne. Aucun d'eux, jusqu'à présent, n'a présenté le moindre signe de nouvelle atteinte de la maladie.

Non seulement ils ont été guéris, mais ils sont donc parfaitement immusés.

Nous pouvons en déduire :

Que dans certains cas, c'est à dire lorsque l'injection sous cutanée de la solution de bleu de trypan est faite au moment opportun, *ce remède peut être efficace dans les cas de piroplasmose contractée naturellement*, mais, comme le dit très bien le Dr. THEILER dans son article, il ne faut pas généraliser, car souvent l'intervention dans ces cas naturels peut arriver trop tard.

C'est surtout dans l'immunisation artificielle contre la piroplasmose que ce remède est utile, car il permet d'en contenir et d'en réduire le danger. Il a soin d'ajouter que cette immunisation artificielle doit être faite par des personnes compétentes, disposant en même temps du matériel nécessaire.

Immunisation artificielle.

En vue des heureux résultats obtenus par STOCKMAN à Londres et surtout par THEILER au Transval, j'avais demandé, en Janvier dernier à la Secretaria d'Etat, à ce que tous les reproducteurs d'espèce bovine que je devais acquérir cette année en Europe, tant pour le Gouvernement que pour les fermiers de l'Etat, fussent immunisés artificiellement, aussitôt leur arrivée au Brésil.

Par suite de circonstances spéciales, lors de mon retour au Brésil, le Novembre dernier, je retrouvai tous ces animaux, (arrivés depuis le 23 Août à São Paulo), conservés dans les étables et baignés périodiquement dans une solution de sarnol, pour les empêcher d'être piqués par les tiques et infectés de piroplasmose.

A un moment donné cependant, vers le commencement de Septembre, quelques uns d'entre eux, (28 de différentes races), avaient été lâchés dans la prairie, mais comme 6 d'entre eux étaient morts, à la suite d'une infection naturelle de piroplasmose, on les avait ensuite rentrés tous et protégés contre une nouvelle infection.

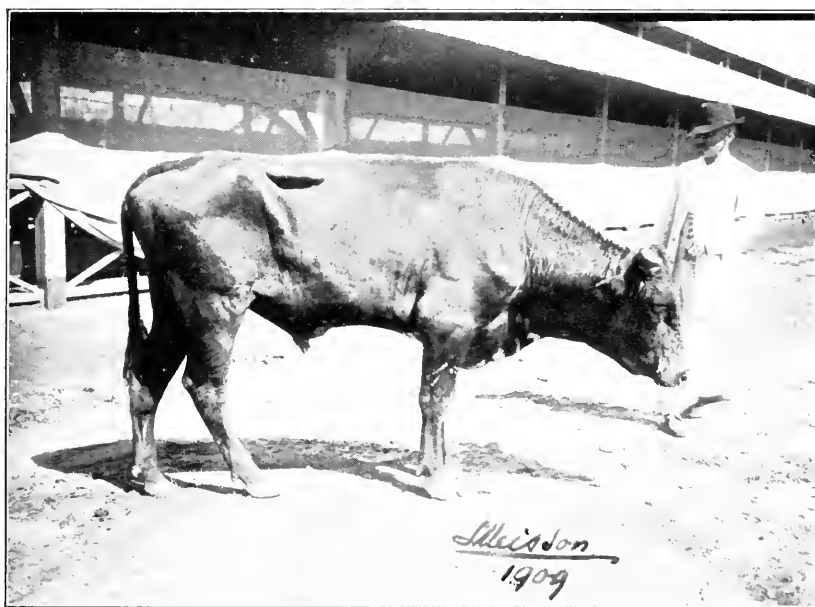
Vu le péril qu'il pouvait y avoir à laisser l'infection se produire naturellement et la nécessité de ne vendre, à la hausse publique annuelle, aux élevours de l'Etat, que des animaux dûment immunisés, je m'empressai de solliciter de Mr. le Dr. PAULO DE MORAES, Secrétaire de l'Agriculture, l'autorisation de pratiquer, sur tous les animaux, importés par le Gouvernement, l'immunisation artificielle contre le piroplasmose, que je demandais à pouvoir appliquer, depuis plusieurs années, en employant en même temps le bleu de trypan, c'est à dire le procédé découvert par NUTTALL et HADWEN et recommandé par STOCKMAN et THEILER.

Le Dr. PAULO DE MORAES, très compétent en la matière, discuta longuement avec moi cette question, qui l'intéressait vivement, non seulement parce que médecin distingué, mais encore comme Secrétaire de l'Agriculture soucieux des intérêts de son département, et s'empressa de m'accorder l'autorisation demandée. Je dois ajouter que pendant les deux mois que durèrent ces immunisations, ce me fût un réel plaisir et un grand stimulant que de voir l'intérêt qu'il montrait aux renseignements que je lui donnais chaque semaine sur la marche des immunisations.

L'autorisation n'ayant été accordée le 17 Novembre, je choisis, le lendemain, comme sujets de la première expérience, parmi les animaux importés cette année d'Europe, 8 bovins qui, d'après les notes du service vétérinaire, n'avaient présenté aucun signe de maladie depuis 3 mois qu'ils étaient arrivés. Nous choisîmes ensuite, avec Mr. M. ROUSSEAU, le chef du service vétérinaire,

PLANCHE III.

Folia Microbiologica III.
(MISSON).



Taureau flamand «Jan II», malade de piroplasmose sous forme naturelle.
(Rétabli par la suite).

2 jeunes taureaux de race flamande, tous deux de la même importation que les autres, mais qui avaient eu la piroplasmose, bien caractérisée, au commencement d'Octobre et chez lesquels il y avait presque certitude de trouver du sang virulent en même temps que la probabilité de ne pas rencontrer d'anaplasmoses dans ce sang.

Je fis prendre, pour cette première expérience, du sang de 2 animaux différents, afin de déterminer, si possible, pour les expériences suivantes, le degré de virulence du sang de chacun d'eux et d'obtenir ainsi, pour les infections futures, un animal dont le sang pût s'employer avec certitude de transmettre la piroplasmose à des animaux jusqu'alors indemnes.

Le premier essai nous montra que tous deux possédaient un sang virulent et par la suite, nous fûmes à même de constater que ce sang était libre d'anaplasmes.

Lors de la première expérience, une partie des injections furent faites avec du sang pur, les autres avec le même sang défibriné, sans que les résultats fussent différents quant à l'infection.

Pratique de l'immunisation par Theiler.

La pratique de l'immunisation est assez simple.

Les animaux importés étant un peu remis de leur voyage, on fait à chacun d'eux, au moyen d'une seringue, *une injection sous-cutané* de 5 c. cubes de sang virulent pris à la jugulaire d'un animal remis depuis peu de temps de la piroplasmose.

Vers le 5^{ème} ou le 6^{ème} jour, la fièvre se déclare et la température augmente sensiblement; vers le 7^{ème} jour, parfois un peu plus tôt, les piroplasmes commencent à apparaître dans le sang, tandis que le jour suivant, les lamelles microscopiques décèlent la présence d'un nombre beaucoup plus considérable de parasites et que, parfois, apparaît en même temps l'urine rouge.

A ce moment, c'est à dire lorsque les piroplasmes sont nombreux, en pratique une *injection sous-cutanée* de 100 à 200 c. cubes, (200 c.c. pour des animaux de 600 kgs. de poids vif), d'une solution de bleu de trypan à la dose de 1 gramme de cristaux de bleu de trypan pour 100 c. cubes d'eau bouillie et refroidie.

Après l'injection de bleu de trypan, on note presque toujours une augmentation presque immédiate de la température; elle est probablement due à la destruction des parasites et à la mise en liberté rapide des toxines dans le plasma du sang.

Après 24 ou 48 heures, elle redevient presque toujours normale.

Parfois, les parasites, qui semblent complètement éliminés immédiatement après l'injection, réapparaissent dans le sang après quelques jours mais toujours en petite quantité, ce qui indique bien que la préparation ne détruit pas tous les parasites. *Jamais cependant, ces piroplasmes qui restent ne produisent de rechute de la maladie.*

Le bleu de trypan ne tuant pas tous les parasites dans le sang, la conséquence doit être une immunité durable.

Je ne veux pas étudier séparément les différentes expériences faites dernièrement; je préfère donner tout d'abord le tableau des températures constatées chez tous les animaux infectés artificiellement et traités par le trypanbleu d'abord avec les indications ci-dessus et indiquer ensuite les observations les plus intéressantes qu'il nous a été donné de faire.

Dans les expériences faites ici, on voit donc que sur 72 animaux qui ont été infectés artificiellement, avec du sang virulent d'un animal ayant eu la piroplasmose par suite d'une infection naturelle, 62 ont réagi, c'est à dire qu'ils ont eux-mêmes eu la piroplasmose, parfaitement caractérisée par l'examen microscopique du sang.

La réaction, c'est à dire la présence de nombreux piroplasmes dans le sang, sur les lamelles préparées, a été constatée:

dans	2 cas,	le	5 ^{ème}	jour	après	l'infection,
»	16 cas,	le	6 ^{ème}	»	»	»
»	15 cas,	le	7 ^{ème}	»	»	»
»	9 cas,	le	8 ^{ème}	»	»	»
»	10 cas,	le	9 ^{ème}	»	»	»
»	9 cas,	le	10 ^{ème}	»	»	»
»	1 cas,	le	14 ^{ème}	»	»	»

L'urine rouge a été notée dans 4 cas seulement.

L'injection sous-cutanée de la solution de bleu de trypan, faite chaque fois par moitié à l'endroit même de l'infection, par moitié du côté opposé toujours derrière l'épaule, presque

N.º 368

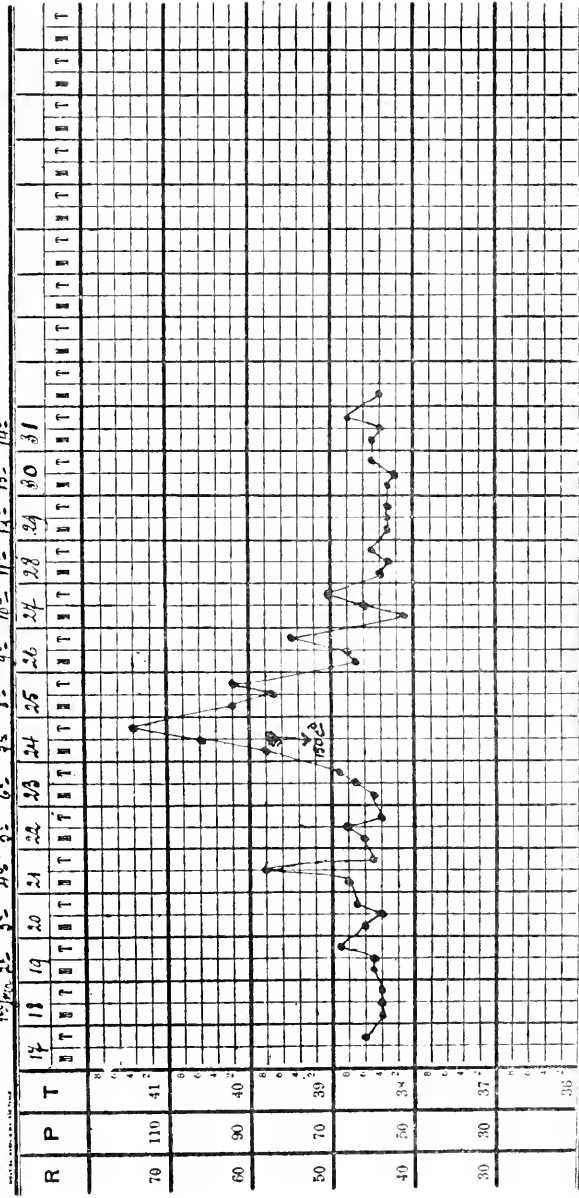
Clinica do Posto Zootecnico Central "Dr. Carlos Botelho"

Principio da moléstia: 18.1.1913
 Cura: 27.1.1913.
 Nome: _____

Infectum artificialmente de
 Diagnostico: pioplasmose

Genio: Plamanda Alca
 nec em 18 de Maio 1911.

Signaes do animal: _____



Observations de 7^o jour: aucun point, mais bien de pioplasmose bursinomee apres midi; infection de 150 c^o de bleu de trypan.

Chaitim

Diagramme typique des temperatures d'un animal infecte artificiellement de pioplasmose, avec augmentation notable de la temperature le 7^{eme} jour, nouvelle augmentation apres l'application du bleu de trypan et descente rapide les jours suivants.

chaque fois, été suivie d'une augmentation rapide et assez sensible de la température, mais, chez presque tous les animaux, celle-ci s'est normalisée rapidement et la plupart d'entre eux étaient déjà remis complètement le 11^{ème} jour après l'infection, comme on peut le voir parfaitement par le diagramme ci-joint, des températures journalières de la génisse flamande Bles qui est typique.

Mr. DESCAZEUX, vétérinaire de la Direction, a fait l'injection de trypan à l'encolure à quelques taureaux et a pu constater que la chute de la température a été beaucoup moins rapide après cette injection, ce qui dans son opinion, est dû à ce que, au point d'infection, il doit se produire un foyer plus actif, qui serait détruit plus rapidement par l'injection de bleu de trypan lorsque cette injection est faite au même endroit.

Dans certains cas, les températures accusées quelques heures après l'injection ont été très élevées, et dans deux cas nous avons pu constater à ce moment, 42°2 et 42°4 chez deux génisses flamandes.

De la comparaison de tous les maximas constatés, on ne peut cependant tirer aucune conclusion en ce qui concerne la plus ou moins grande résistance à l'infection des animaux des diverses races.

On ne peut non plus le faire en comparant le nombre des animaux des différentes races qui ont réagi.

Sur 26 taureaux Hollandais infectés,	25	ont réagi ;
» 15 génisses Hollandaises infectées,	14	» »
» 15 taureaux Schwyz infectés,	7	» »
» 10 génisses Schwyz infectées,	10	» »
» 6 » flamandes infectées,	6	» »

soit un total de 62 réactions sur 72 infections artificielles.

10 de ces animaux n'ont pas présenté de réaction, ce sont :

8 taureaux Schwyz, 1 taureau Hollandais et 1 génisse Hollandaise, mais on ne peut cependant en déduire que les taureaux Schwyz aient été plus résistants. Cette apparence de plus forte résistance provient de ce que ces animaux, qui comme tous les autres, étaient ici depuis le 23 Août, c'est à dire depuis 4 mois, avaient été lâchés dans la prairie peu de temps après leur arrivée, au commencement de Septembre, avaient été piqués par les tiques et, par la suite, avaient eu la piroplasmose. Chez

quelques uns d'entre eux, elle fut parfaitement constatée, chez d'autres, au contraire, elle était passée inaperçue. Tous cependant avaient acquis une immunité suffisante pour résister à une nouvelle infection, puisqu'aucun d'entre eux n'a présenté de température anormale pendant toute la période d'observation qui suivit l'infection artificielle et que, toujours, l'examen microscopique des lamelles préparées avec leur sang a été négatif.

Huit jeunes taureaux flamands qui faisaient partie de la même importation ont été malades, la plupart atteints de piroplasmose comme suite à une infection naturelle, fin Septembre ou commencement d'Octobre, mais tous se sont rétablis assez rapidement, sans qu'il fut nécessaire de leur appliquer le bleu de trypan.

Ce fait, qui semblerait montrer que l'infection qui se produit à cette époque, c'est à dire vers la fin de l'hiver ou le commencement du printemps, serait moins grave que celle qui se déclare, (ici au Poste) de Décembre à Février, ou que les tiques sont à ce moment moins nombreux ou moins virulents, confirme par conséquent ce que j'ai toujours dit de l'avantage qu'il y a à importer les animaux en hiver, (fin Mai à fin Août au Brésil), et à les immuniser le plus tôt possible après leur arrivée.

Dans les nombreuses expériences faites ici, nous avons seulement eu 4 cas dans lesquels *l'urine rouge* a été constatée, sans que cependant les animaux sur lesquels elle fut observée présentissent des symptômes plus graves que les autres et sans que leur guérison fut plus lente.

Lors de la troisième expérience, en plus des infections pratiquées avec le sang des taurillons flamands qui donnèrent toujours des infections bien caractérisées, il en fut fait trois autres, à deux taureaux Schwyz et à un taureau Hollandais, avec 5 c.c. de sang d'un taureau No. 3, qui avait été atteint de piroplasmose le 25 Septembre, à la suite d'une infection naturelle.

Aucun d'entre eux ne présent de réaction, les deux Schwyz, pendant les 12 jours qu'ils restèrent en observation accusant des températures toujours comprises entre 38° et 39°, la température du Hollandais, pendant la même période, oscillant entre 38°4' et 39°8'. A aucun moment il ne fut possible de constater la présence de piroplasmes dans le sang d'aucun d'entre eux.

A la suite de ce résultat négatif, qui pouvait s'attribuer à la non virulence du sang employé ou bien à ce que les 3 autres taureaux avaient déjà acquis l'immunité, je résolue de les soumettre tous à une nouvelle infection, cette fois avec du sang du taurillon flamand, dont la virulence était bien connue. Je fis en même temps infecter, avec le même sang, le taureau Schwyz No. 3 dont le sang n'avait pas produit de réaction sur les 3 autres.

Des recherches faites dans les notes du service vétérinaire, j'avais pu voir que ce taureau, lorsqu'il avait été malade en Septembre, avait reçu une injection de bleu de trypan.

Tous quatre réagirent cette fois-ci parfaitement, comme on peut le voir par le diagramme ci-joint des températures enregistrés chez le taureau Schwyz Medor No. 3 et par celui du taureau Hollandais »Concurrent« No. 342.

Tandis que l'injection de bleu de trypan était faite en temps voulu aux trois premiers, c'est à dire lorsque leur sang accusa, au microscope, la présence de nombreux piroplasmés, je m'abstins d'appliquer ce remède au taureau No. 3 lorsque, le 7^{ème} jour, sa température atteignit 40°2' et lorsque son sang renfermait de nombreux piroplasmés.

Je voulais voir si l'infection naturelle qu'il avait subie précédemment lui avait conféré l'immunité.

Comme il est facile de le voir par le diagramme, sa température descendait dès le lendemain à 39°8' et, 10 heures plus tard, elle était retombée à 38°4' à la normale. Quant aux piroplasmés, ils étaient déjà beaucoup moins nombreux le 8^{ème} jour.

On peut donc en conclure que *le taureau était déjà immunisé* et que la présence du bleu de trypan injecté 3 mois plus tôt empêchait encore l'évolution des piroplasmés qui lui furent injectés lors de l'infection avec le sang virulent. On peut aussi en déduire que, probablement à cause de l'injection de bleu de trypan faite 3 mois et 6 jours auparavant, *son sang avait perdu sa virulence*.

C'est là un point important, parce qu'il nous indique que le sang d'un animal traité par le bleu de trypan perd sa virulence pendant un temps plus ou moins long et qu'il faut s'abstenir de l'employer pour les infections artificielles peu de temps après l'application de ce remède.

Une déduction plus importante encore, c'est que son emploi nous sera d'un grand appoint dans la lutte contre la piroplasmose. En effet, il est bien probable que tous les tiques qui auront, pendant *une période de 3 mois au moins*, attaqué un animal traité par le bleu de trypan, dont le sang, comme nous venons de le voir, ne sera pas virulent, *ne s'infecteront pas eux-mêmes* et ne donneront pas naissance à des tiques virulents. La piroplasmose se transmettra donc moins et tendra par conséquent à disparaître.

Dans la piroplasmose contractée par suite d'une infection naturelle, *l'avortement* est une conséquence presque inévitable de la maladie.

Lors des essais que nous avons faits ici, plusieurs génisses étaient en état de gestation plus ou moins avancée, mais aucune d'elles n'a avorté, toutes ont parfaitement supporté la maladie produite artificiellement.

Pendant tout le temps que les animaux ont été en observation, ils se sont conservés dans d'excellentes conditions, presque toujours ils ont mangé et ruminé parfaitement; c'est à peine si quelques uns d'entre eux, et ils sont peu nombreux, ont montré un peu d'inaipétece après l'injection de la solution du bleu de trypan, c'est à dire au moment ou la fièvre était la plus forte.

Jamais cependant nous n'avons du intervenir et aucun des animaux en traitement, pendant toute la période d'observation, n'a reçu le moindre médicament ou même le moindre stimulant.

Les premières expériences m'avaient fait voir parfaitement la différence entre la piroplasmose naturelle et la piroplasmose artificielle avec emploi du bleu de trypan quant à l'état de santé des animaux avant et après la maladie.

Dans la piroplasmose contractée naturellement, les animaux souffrent en effet un temps plus ou moins long et leur convalescence est souvent lente. Après la maladie ils sont toujours très affaiblis, manquent presque complètement d'appétit et généralement maigrissent á vue d'œil. Leur convalescence est presque toujours fort longue.

Dans l'infection artificielle, au contraire, ils souffrent généralement très peu; la maladie en effet évolue rapidement et est presque instantanément arrêtée par l'injection de bleu de

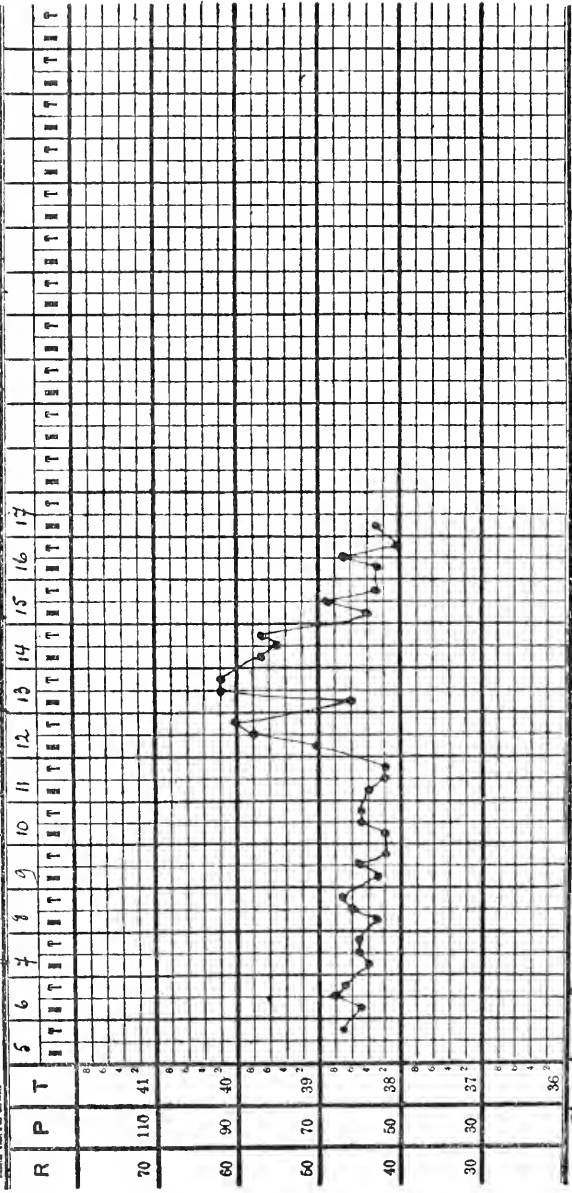
Clinica do Posto Zootecnico Central "Dr. Carlos Botelho"

Principio da moléstia 6... 1. 1913
Cura: 15... 1. 1913
Morte:

Princípio da infecção
de origem natural
de origem artificial
Diagnóstico anepestico
do taurineo Ramon R. 371

Couro de Leão - Hester
19... 2... 3... 4... 5... 6... 7... 8... 9... 10... 11... 12... 13... 14... 15... 16... 17...

Signaes do animal: ...
19... 2... 3... 4... 5... 6... 7... 8... 9... 10... 11... 12... 13... 14... 15... 16... 17...



Observations: - Le taurineo avait été en sa piropalmona naturelle le 24.9.1912, avec application de bleu de trypan. *Allei 12/13*
- Le 6... sur, c'est un...
- 7...
- 8...
- 9...
- 10...
- 11...
- 12...
- 13...
- 14...
- 15...
- 16...
- 17...

Diagramme des températures d'un animal déjà immunisé naturellement 3 mois avant l'infection artificielle et auquel on avait, à ce moment, fait une application de bleu de trypan.

trypan ; les animaux ne cessent pour ainsi dire pas de s'alimenter parfaitement.

La conséquence est qu'il est presque impossible à une personne non prévenue de noter que les animaux sont malades.

Dans les expériences ultérieures, afin de m'assurer de l'avantage de l'infection artificielle, j'ai pesé les animaux avant l'infection et à leur sortie de l'infirmerie mais les différences n'étaient pas bien fortes. Je dois faire remarquer que nulle modification n'a été apportée dans la nourriture de ces animaux pendant tout le temps qu'ils ont été traités et sont restés en observation ; leur alimentation est toujours restée la même depuis qu'ils étaient ici.

Nous pouvons tirer une autre preuve de l'avantage de cette méthode du fait intéressant qu'une génisse flamande, celle qui justement a accusé la température la plus haute, (42°4)', a présenté des signes de chaleur et a été fécondée 14 jours après avoir montré cette fièvre si forte ainsi que de l'hémoglobinurie et qu'une autre génisse Schwyz, dans le sang de laquelle on avait trouvé de nombreux piroplasmés le 14 Décembre, se trouvait dans le même cas 8 jours plus tard.

Ces manifestations physiologiques spéciales montrent bien que les animaux se rétablissent rapidement de l'infection artificielle combinée avec l'application du bleu de trypan.

Pour les animaux qui ont déjà été infectés, l'infection artificielle par injection de sang virulent ne présente aucun danger, à la condition naturellement, que cette injection soit faite avec les précautions antiseptiques indispensables.

Comme il est facile de le voir par le tableau de toutes les températures constatées chez tous les animaux immunisés, plusieurs d'entre eux n'ont présenté aucune modification dans la courbe des températures pendant toute la période d'observation.

L'infection avec du sang virulent constitue dans ce cas un véritable réactif négatif et permet de s'assurer si certains animaux qui sont douteux ont été réellement immunisés, ou si, au contraire, ils sont encore sensibles.

Les principaux avantages de cette méthode résident dans le fait qu'elle est *rapide, pratique et économique*.

Elle est *pratique*, parce qu'elle permet, par l'examen des températures constatées, de suivre le développement de l'in-

fection pour ainsi dire heure par heure et, lorsque cette température monte brusquement, de faire l'examen microscopique du sang, qui, presque chaque fois, à ce moment, décèle la présence des piroplasmes en plus ou moins grande quantité. A plusieurs reprises, pendant les expériences dont nous nous occupons, un seul examen du sang a suffi et très rarement il fut nécessaire de répéter cet examen plus de deux fois pour acquérir la certitude que les piroplasmes étaient nombreux et qu'il était nécessaire de pratiquer l'injection de bleu de trypan.

L'examen microscopique du sang est cependant absolument nécessaire lorsque cette immunisation doit être faite méthodiquement, car il arrive que, pendant les premiers jours après l'infection, l'augmentation de la température ne correspond pas toujours avec l'apparition des piroplasmes en nombre plus ou moins considérable.

Ce système est infiniment plus méthodique et par conséquent plus sûr que l'infection naturelle, dans laquelle la période d'incubation est plus lente et dans laquelle le moment où il est nécessaire d'intervenir est plus difficile à déterminer.

Il est rapide, car dans la grande majorité des cas que nous avons traités, il n'a pas fallu plus de 10 à 11 jours pour que les animaux infectés fussent guéris parfaitement rétablis.

Dans l'immunisation artificielle, la période qui s'écoule entre le moment où l'animal est infecté par les tiques et celui où l'infection se déclare parfaitement est toujours plus longue, l'animal souffre et s'affaiblit beaucoup plus, de sorte que, même si l'on intervient à temps avec le bleu de trypan, il s'écoule un temps beaucoup plus long avant qu'il ne soit parfaitement rétabli.

Il est économique, parce qu'il est plus rapide.

Si nous prenons comme exemple les animaux que nous avons immunisés dernièrement au Poste Zootechnique Central, il est facile de calculer l'économie qui aurait été réalisée par le Gouvernement si cette immunisation artificielle avait été pratiquée sur les 72 animaux peu de temps après leur arrivée.

Ces animaux sont arrivés le 23 Août et conservés ici pour être immunisés jusqu'au 1^{er} Février, c'est à dire pendant 160 jours.

Je dois ajouter que malgré cela beaucoup d'entre eux n'avaient

pas eu la tristezza et que le but que l'on se proposait n'avait par conséquent pas encore été atteint.

Si nous calculons, ce qui est loin d'être exagéré, qu'ils coûtent par jour, pour le nourriture et les soins, 2 francs par tête, nous aurons, comme dépense totale pour les 72 animaux, pendant ce laps de temps, une somme de $2 \times 72 \times 160$ ou 23,040 frs.

Si l'immunisation de ces reproducteurs avait été commencée une quinzaine de jours après leur arrivée, c'est à dire aussitôt qu'ils auraient été remis des fatigues du voyage par mer, il ont été parfaitement possible, en immunisant la moitié chaque fois, de tout terminer vers la fin du mois de Septembre. Ces animaux, dans ces conditions, auraient coûté à l'Etat, qui se charge de leur nourriture et de leur entretien pendant la période d'acclimatation, (réduite dans ce cas à 40 jours environ), une somme de $2 \times 72 \times 40$ ou 5.760 frs.

On aurait donc, de cette façon, réalisé une économie de 17.280 frs.

Il convient d'ajouter que le temps pendant lequel tout ces animaux ont été conservés ici pour être acclimatés, correspond exactement à la saison de monte, terminée maintenant, et que l'Etat ou les particuliers qui les ont importés, et qui ne pourront plus guère les employer avant le printemps prochain dans leurs troupeaux, ont perdu les produits de toute une saison.

Si l'on estime seulement à 10 le nombre de veaux que chacun pouvait produire cette année et que l'on compte que ces produits, pour le moins de demi-sang, aient seulement une valeur de 80 frs. par tête, on arrive à constater pour l'élevage une perte de 57.600 frs.

Comme je l'ai dit plus haut, en résumant le tableau des températures constatées, 10 animaux, sur les 72 immunisés, n'ont pas réagi à la suite de l'infection artificielle parce qu'ils avaient acquis l'immunité par suite d'une infection naturelle. 7 taureaux flamands, un taureau Schwyz et un taureau Hollandais étaient dans le même cas.

Cette immunisation naturelle de 19 animaux, pour quelques uns desquels on a employé le bleu de trypan, n'a pas été obtenue qu'avec une perte de 5 autres, morts en Septembre ou commencement d'Octobre, de piroplasmose parfaitement caractérisée, soit de près de 21 %.

Il est donc probable que si les 62 animaux qui ont réagi à l'immunisation artificielle et qui par conséquent étaient encore sensibles, avaient été immunisés naturellement, nous aurions eu, parmi eux, une perte d'au moins 21 % soit de 15 animaux, dont il conviendrait encore d'ajouter la valeur aux deux sommes indiquées plus haut pour évaluer l'économie totale que le Gouvernement aurait réalisée si l'immunisation artificielle, avec emploi de bleu de trypan, avait été pratiquée de suite après l'arrivée des animaux.

Chez certains des animaux, chez lesquels l'injection de la solution de bleu de trypan, appliquée lorsque les piroplasmes étaient nombreux et la fièvre assez forte, a provoqué cependant un abaissement assez rapide de la température, on constate assez souvent, après quelque temps, (du 11^{ème} au 15^{ème} jour), une nouvelle poussée de fièvre avec une température parfois aussi élevée que celle notée au moment de la première.

Le cas s'est présenté chez plusieurs des animaux qui ont été traités ici, comme on peut le voir par le diagramme du taureau »Concurrent«, mais, quoique on ne soit jamais intervenu, il ne s'est jamais produit de rechute de la maladie, et après quelques jours, la température revenait à la normale et l'animal recouvrait tout son appétit, qui avait un peu diminué pendant 2 ou 3 jours.

Cette fièvre secondaire correspond probablement à la réapparition dans le sang, de piroplasmes qui paraissaient avoir disparu complètement de suite après l'injection de bleu de trypan, et elle vient confirmer l'affirmation de NUTTALL que le remède ne tue pas tous les protozoaires.

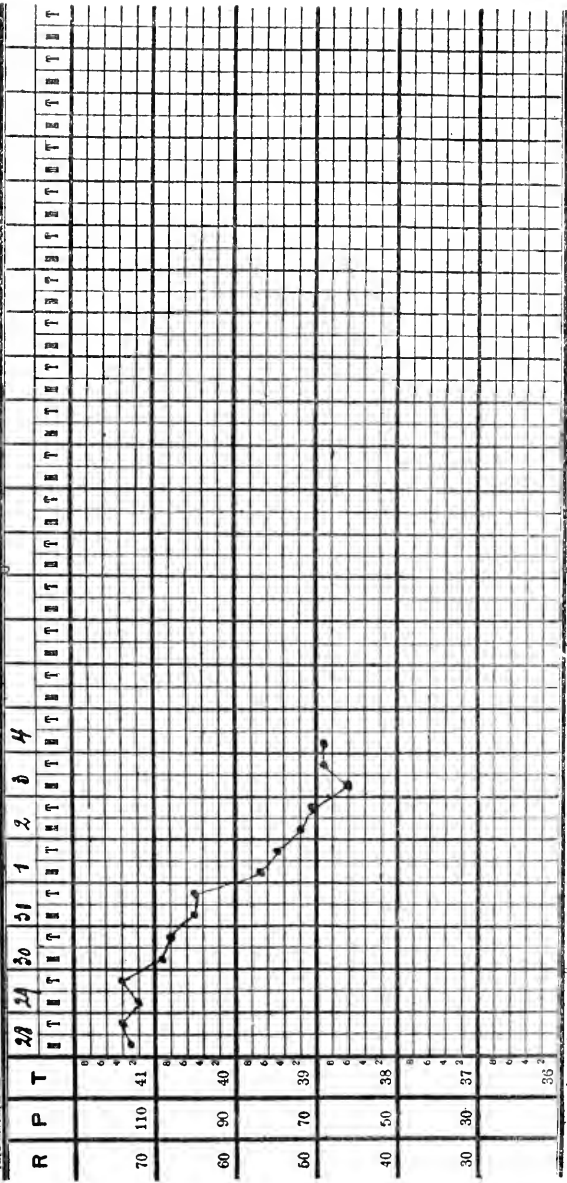
Preuves de l'immunisation. Le bleu de trypan ne tuant pas tous les piroplasmes, la conséquence doit être une immunité durable. Ceux qui restent produisent en effet une nouvelle infection, peu grave en elle même, mais suffisante cependant pour garantir les animaux contre une infection naturelle subséquente.

De très nombreuses expériences, faites aux Etats Unis et en Australie, (sur plus de 9.000 animaux), montrent que les bovidés immunisés artificiellement, sans emploi de bleu de trypan, ont parfaitement résisté par la suite à la tristeza, lorsqu'ils étaient exposés aux piqûres des tiques.

No. 1179 - Clinica do Posto Zootecnico Central "Dr. Carlos Botelho"

Principio da molestia. 28.1.1915

Signaes do animal: *Onitice schwyzi* - *Onitice* cast. *filicellum* de *Leptelas mac.* *Leptelas mac.*
 a 14.11.1912 ante *empipi* de *bleu* de *kypon* *kypon*
 Diagnostico: *Onitice schwyzi* *Onitice schwyzi*
naturalis *naturalis*



Observations: a 29, examen microscopico positivo, anaplasmas com numerosos a 4 Genes, exameca "rigado".

Schwyzi

Diagramme des températures constatées lors d'une infection naturelle d'anaplasmose, chez une génisse Schwyz déjà immunisée artificiellement contra la proplasmose, avec emploi du bleu de trypan.

Le Dr. STOCKMAN, de Londres, a immunisé, en Angleterre, en employant le bleu de trypan, de nombreux animaux exportés par la suite au Transvaal dans l'Afrique du Sud, et le Dr. THEILER n'a pu constater, aucune rechute sur 200 animaux qui, peu de temps après leur arrivée, avaient été lâchés en plein champs, et y avaient été conservés pendant un an.

Ici même, comme je le dis plus haut, nous avons pu nous assurer parfaitement qu'un taureau immunisé naturellement et traité par le trypan ne présentait aucune réaction lors de l'infection artificielle avec du sang dont la virulence avait été absolument démontrée dans de nombreux cas.

Afin d'obtenir, par la pratique, quelques preuves de plus, j'avais donné ordre que les 5 génisses flamandes et les 6 génisses Schwyz immunisées artificiellement et traitées par le bleu de trypan le 18 Novembre et le 5 Décembre derniers fussent lâchées journallement dans un champs dans lequel je savais qu'il y avait de nombreuses tiques, que l'on prit soin de ne pas les baigner et de s'enlever que les tiques mûres, sur le point de se détacher d'elles mêmes.

Jusqu'à ce jour, c'est à dire après plus de 2 mois, aucune d'elles n'a eu de rechute de piroplasmose et comme elles ont, à certains moments, été absolument couvertes de tiques, je crois pouvoir dire qu'elles sont tout à fait immunisées contre la tristeza.

Anaplasmosse. Lors des recherches auxquelles il s'était livrées au Transvaal, il y a un peu plus d'un an, pour prouver la dualité des deux maladies, la piroplasmose et l'anaplasmosse, le Dr. Theiler avait découvert, dans le sang d'animaux provenant de la région du Karoo, un anaplasme spécial, qu'il avait appelé l'anaplasma marginale, var. centrale.

Il avait constaté que la maladie produite chez un animal par cet anaplasme spécial était généralement bénigne, mais cependant suffisante pour lui conférer l'immunité contre l'anaplasmosse commune et il conseillait, pour les injections, l'emploi du sang d'un animal ayant été atteint simultanément de piroplasmose et d'anaplasmosse centrale pour immuniser contre les deux maladies les animaux importés.

La piroplasmose, qui se déclarait la première, était traitée, au moment opportun par le bleu de trypan, quant à l'anaplasmosse, qui ne survenait que plus tard, il n'était pas nécessaire

de la traiter spécialement, il suffisait de bien soigner l'alimentation des animaux pendant cette période.

Le Dr. STOCKMAN, que j'avais consulté sur ce point lors de mon dernier voyage en Angleterre, n'a pu me confirmer l'efficacité du procédé, il m'a conseillé d'attendre encore avant de considérer comme définitifs les résultats obtenus par le Dr. THEILER et de me limiter, en attendant de nouvelles expériences, à pratiquer seulement l'immunisation artificielle contre la piroplasmose.

Je n'aurais du reste pas pu procéder en même temps aux deux immunisations, parce que nous ne possédons pas encore, ici au Brésil, de données bien certaines quant à l'existence, dans un endroit déterminé, de l'anaplasma marginale var. centrale.

Le Dr. TORRES COTRIM, a cependant constaté, que dans sa propriété de Campo Bello, certains animaux résistaient parfaitement à l'anaplasmosse, tandis que d'autres, faisant partie de la même importation, y succombaient rapidement et les recherches qui ont été faites par les bactériologistes de l'Institut de Manginhos, paraissent montrer que le sang des premiers renfermaient des anaplasmes de la variété centrale.

Le fait n'est pas encore confirmé d'une façon bien précise, mais comme les recherches continuent, il est probable que nous serons fixés avant peu sur ce point.

Dans les nombreuses importations qui ont été faites en Afrique du Sud, la pratique a montré que les animaux qui avaient été immunisés artificiellement contre la piroplasmose et chez lesquels la maladie avait été arrêtée par le bleu de trypan, étaient, comme le dit le Dr. STOCKMAN, considérablement plus résistants que les autres à l'anaplasmosse.

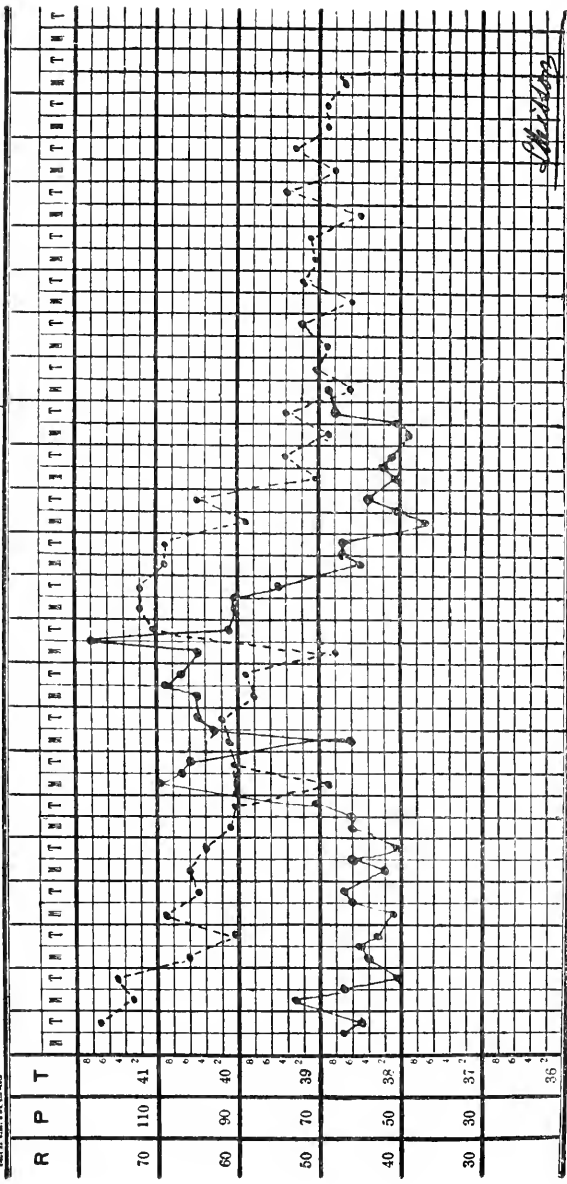
Les cas que nous avons pu étudier ici dernièrement semblent le confirmer.

Un taureau de race flamande qui, en Septembre dernier, avait été atteint de piroplasmose *sous forme naturelle* et auquel il ne fut pas fait d'application de bleu de trypan, est tombé malade, d'anaplasmosse bien caractérisée par l'examen microscopique, le 19 Décembre dernier.

Les températures successives, depuis le moment où la maladie a été nettement constatée, ont été les suivantes :

N^o 1164 **Clinica do Posto Zootecnico Central "Dr. Carlos Botelho"**

Signaes do animal: *Gênise de raça Schwyz.* -
 Diagnóstico: *Singplasmose, anaplasmose naturalis.* -
 Príncipe da moléstia:
 Cura:
 Nome:



Observação: - Os diagrammas de temperaturas correspond a la courbe des températures constatées dans la pyroplasmose infectieuse et à l'élévation, avec les courbes de températures, celle de la pyroplasmose et à la courbe de températures constatées chez le même animal lors d'un attaque naturelle de piroplasmose sans éruption de taches érythémateuses.

Diagramme des températures d'une même génisse Schwyz,

- 1° lors de l'infection artificielle de piroplasmose, (lignes pleines).
- 2° lors de l'infection naturelle d'anaplasmose, (lignes pointillées).

		Matin.	Soir.
le 19	Décembre	40°8	40°3
» 20	»	40°5	39°9
» 21	»	39°6	39°7
» 22	»	36°6	36°6

et la mort est survenue le même jour.

Une application de bleu de trypan qui lui fut faite le 19 après midi ne produisit aucun effet et l'examen microscopique du sang fait le lendemain de cela la présence d'anaplasmes aussi nombreux que ceux qui avaient été constatés la veille.

Nous avons eu par la suite 4 nouveaux cas, bien caractérisés aussi d'anaplasmose sur 2 génisses flamandes et 2 génisses Schwyz, *immunisées artificiellement* fin Novembre ou commencement Décembre, *avec application de bleu de trypan*.

Au moment où la maladie a été constatée, les génisses présentaient des températures variant de 41°1 à 41°7, toutes étaient fort abattues, avec respiration haletante et inapétence, mais *dans tous les cas*, sans emploi d'aucun remède, la température a diminué assez rapidement et elles *ont été rétablies en quelques jours*, comme on peut le voir par le diagramme des températures de la génisse Schwyz 1179.

L'une d'elles a avorté 3 jours après l'apparition de la maladie et a souffert plus que les autres, mais elle est parfaitement remise maintenant.

Une est morte, une génisse flamande, mais l'autopsie a montré que le décès, survenu lorsque le thermomètre accusait une température de 38°5, était dû à une congestion intestinale.

Dans les conditions actuelles, il paraîtrait donc que le système d'immunisation le plus pratique est celui qui consiste à transmettre aux animaux, artificiellement, le piroplasmose pure, ce qui, dans un établissement comme le Poste Zootechnique Central, avec le matériel et les précautions nécessaires, n'est pas chose difficile.

J'y suis du reste parfaitement arrivé, car tous les animaux qui ont eu l'anaplasmose, *l'ont contractée naturellement*.

Si la maladie qui a été constatée avait été injectée avec le sang qui a servi pour l'infection de piroplasmose, elle serait apparue beaucoup plus tôt, (de 14 à 40 jours après l'infection),

ce qui n'est pas le cas ici, puisqu'elle n'a pas été constatée qu'au moins 56 jours après l'infection artificielle.

Si le trypan bleu confère une résistance plus considérable à l'anaplasmose, je ne crois pas qu'il soit indispensable de faire en même temps l'immunisation artificielle contre cette seconde maladie, non seulement parce que les animaux immunisés contre la piroplasmose y résistent mieux, mais encore parce qu'elle est plus rare que la tristeza et n'attaque qu'une proportion peu élevée des animaux importés.

Je dois ajouter qu'afin de la faire disparaître, je prends soin de faire baigner tous les animaux atteints d'anaplasmose, afin que de détruire le plus possible les tiques qui pourraient être infectées et, par le suite pourraient la transmettre.

Je crois aussi qu'il n'est pas nécessaire d'immuniser les animaux contre cette maladie parce qu'il me paraît qu'elle est localisée dans certains endroits ou elle a été importée par des animaux importés de pays où elle existe et que beaucoup d'autres régions sont encore indemnes.

Comme je l'ai montré plus haut, l'immunisation artificielle est pratique, rapide et économique et j'ai indiqué, pour une partie de l'importation faite par l'Etat de São Paulo, l'économie qu'elle comporterait pour lui si elle était faite de suite après l'arrivée des animaux.

Les portes éprouvées par les éleveurs sont plus considérables encore et il serait difficile d'estimer la valeur de tous les reproducteurs importés par eux depuis un certain nombre d'années, qui sont morts peu de temps après leur arrivée dans le pays. Je pourrais citer de très nombreux cas ou les portes éprouvées ont été de plus de 90 % et, très récemment encore, un importateur de Rio a eu à enregistrer la porte de 150 génisses Hereford, tandis qu'un éleveur voyait mourir, en peu de jours, 58 animaux sur un lot de 80 dont il avait fait l'acquisition à l'étranger.

Dans l'Etat de Rio Grande do Sul, beaucoup d'importations faites tant d'Europe que d'Argentine ont été désastreuses, et je possède, entre autres des lettres de Mr. Octavio Lemos, grand éleveur à Santa Maria, dans lesquelles il me dit avoir perdu plus 90 % des animaux qu'il a importés à diverses reprises.

Dans l'Etat de Minas Geraes, il y a eu aussi énormément d'insuccès lors des importations d'Europe.

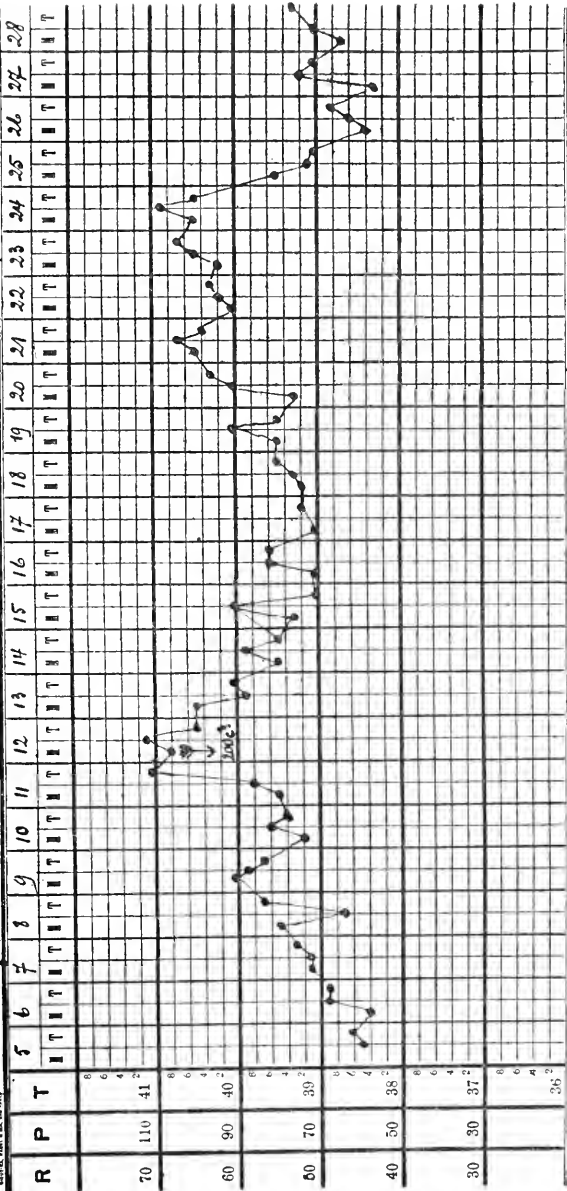
N^o 342 Clinica do Posto Zootecnico Central "Dr. Carlos Botelho"

Principio da doencas: 6. 1. 1913.

Bovina Holandesa "concurrent"
Infecton artificialle de
Diagnostico prophylaxmate

Cura:

Signaes do animal: ni le 6 Jun 1911.
 19. 22. 25. 28. 10. 8. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28.
 19. 22. 25. 28. 10. 8. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28.



Observations: - Le 7, excrement microscopique positif
 " 12, 60 cadaver, excrement positif, j'avais bien de pneumo-bactéries, etc.
 " 28 et 29, excrement négatif.

Misson

Diagramme des températures du taureau No. 342 montrant la reculte qui se produit vers le 15ème jour.

Pour le Gouvernement fédéral, qui accorde chaque année d'importants subsides en vue de favoriser l'importation de reproducteurs de races améliorées, les pertes ont aussi été très fortes. En effet, la plus grande partie des animaux qui ont été amenés dans le pays n'ont pu résister à l'acclimatation et ont péri, de sorte que les subsides, (de 500000 par tête), qui sont accordés aux éleveurs ont été, pour la plupart, absolument perdus. On peut dire, sans crainte d'être taxé d'exagération, que, des 480,000 frs. qui figuraient au budget du Ministère de l'Agriculture et qui ont été dépensés dans le but de favoriser l'importation, les deux tiers, c'est à dire 320,000 frs. ont été dépensés en pure perte parce que les éleveurs qui ont joui de ces subsides ont perdu ces animaux de tristeza.

Si l'on pouvait faire une statistique complète de tous les bovidés de races améliorées débarqués sur le territoire brésilien, obtenir les renseignements exacts quant au nombre d'entre eux qui ont succombé à la tristeza et calculer leur valeur, (prix d'achat augmenté des frais de transport), je suis certain que l'on arriverait à un total de plus d'un million de francs annuellement.

Le gouvernement de l'Etat de São Paulo, qui a été le premier à créer un Poste Zootechnique destiné à venir en aide aux éleveurs, non seulement en étudiant toutes les questions qui se rattachent à l'élevage mais encore en leur permettant d'y acclimater les reproducteurs importés à leurs fermes d'élevage, est outillé maintenant, grâce aux expériences concluantes faites dernièrement, pour immuniser artificiellement tous les bovidés importés et assures ainsi, avec un minimum de frais, un emploi judicieux des subsides accordés, tant par lui-même que par le Gouvernement fédéral et une utilisation aussi complète que possible des sommes dépensées par les éleveurs pour l'achat des reproducteurs.

Malheureusement, le Poste Zootechnique Central de São Paulo a un rayon d'action limité, et, dans les conditions actuelles, ne peut guère s'occuper que de l'immunisation des bovidés importés par les éleveurs de l'Etat. Son action sur l'amélioration des races nationales a cependant été efficace, surtout au point de vue des croisements, parce que son intervention dans l'acclimatement du bétail a rendu aux éleveurs la confiance que de nombreux insuccès leur avait fait perdre.

Grâce à l'application méthodique de l'immunisation artificielle, qui, désormais sera de pratique courante pour tous les reproducteurs importés pour lui même ou avec son concours et à l'énorme diminution de la mortalité qui en sera la conséquence, il est certain que les importations augmenteront encore et que les progrès réalisés par l'élevage seront beaucoup plus rapides.

En ce qui concerne les importations faites pour les autres États, le Ministère de l'Agriculture de Rio Janeiro devrait intervenir.

Il devrait créer, à Rio de Janeiro et à Porto Alegre par exemple des postes d'acclimatation où tous les animaux de race bovine importés avec son autorisation et avec son concours financier *devraient être immunisés artificiellement* contre la piroplasmose avant d'être remis à leurs propriétaires et où, en même temps, il serait permis aux éleveurs qui achèteraient directement de faire immuniser le bétail qu'ils destinent à leurs fermes d'élevage et qui viennent de l'étranger.

De cette façon, non seulement le Gouvernement fédéral réaliserait, pour lui-même et pour les éleveurs, une économie considérable, en sauvant bien des animaux, qui sans cette immunisation artificielle, auraient péri en peu de temps, mais encore, en garantissant en quelque sorte les reproducteurs, il favoriserait énormément leur importation et par là même, contribuerait à augmenter, par le croisement, la valeur du cheptel national.

Cette immunisation du bétail de race qui permettrait son acclimatation facile et rapide, tendrait aussi à faire heureusement diminuer l'introduction du zébu, estimé dans certaines zones par suite de sa plus grande résistance aux tiques et à la piroplasmose.

Avec l'immunisation artificielle, il n'y aurait plus de raisons de conseiller son importation.

São Paulo, 22. 2. 1913.

LA PUTRÉFACTION INTESTINALE ET LA SCLÉROSE DE L'AORTE.

PAR

le Dr. T. S. STEENHUIS,

Assistant-Prosecteur de l'Institut d'Anatomie pathologique de l'Université
de Groningue.

Depuis les publications de NUTTALL et THIERFELDER ¹⁾ et celles de SCHOTTELIUS ²⁾ qui se sont occupés de la possibilité de la vie animale sans l'intervention des microbes, la question de la signification de la flore microbienne intestinale est restée un des points fixes du programme de travail des laboratoires de biologie.

Ce chapitre a surtout été étudié dans l'Institut PASTEUR de Paris par le Prof. EL. METCHNIKOFF ³⁾ et ses collaborateurs.

Au cours de ces dernières années, METCHNIKOFF a fait publier et a publié lui-même une série de recherches sur la sénilité, faites dans l'intention de dénoncer la cause des altérations séniles et de faire connaître les changements anatomiques qui caractérisent le sénium.

Dans la théorie de METCHNIKOFF les leucocytes ont une très grande importance. Les globules blanches mononucléaires du sang attaquent des cellules fixes du corps et les abolissent. Quand le ravage a lieu à un haut degré dans les parties nobles du corps, la mort est inévitable; une démolition modérée cause les symptômes du sénium, et est le stigma anatomique de la sénilité.

METCHNIKOFF et ses élèves ⁴⁾ ont trouvé alors dans les

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 21.

²⁾ Archiv für Hygiene. Bd. 34.

³⁾ Etudes sur la nature humaine.

⁴⁾ SALIMBÉNI et GÉRY. Annales de l'Institut PASTEUR 1912.

organes et les tissus des personnes très âgées, hors l'atrophie et les dégénérescences communes des cellules parenchymateuses, des infiltrations mono-nucléoleucocytaires; les infiltrations sont suivies de la sclérose des tissus, si la mort n'interrompt pas le processus. Mais METCHNIKOFF et ses élèves sont restés seuls à constater les altérations sus-dites. Nulle part dans la littérature ancienne traitant de la sénilité l'infiltration mononucléaire est nommée parmi les signes anatomiques et histologiques de la vieillesse; et MÜHLMANN ¹⁾, un des spécialistes dans ce domaine de la pathologie, qui dans ce but a examiné avec beaucoup de soin les organes d'un vieillard de 90 ans, mort d'une maladie intercurrente, n'a trouvé aucune trace de ces infiltrations.

METCHNIKOFF suppose que les cellules des infiltrations ont dévoré le parenchym, et ensuite il émet une seconde hypothèse. METCHNIKOFF suppose que par une action chémotactique par exemple, les leucocytes se rendent aux tissus qui ont subi une intoxication par les produits toxiques d'origine intestinale de provenance microbienne; enfin il regarde les infiltrations comme une preuve de cette intoxication.

La flore microbienne de l'intestin est donc l'itinéraire pour les phagocytes, les macrophages, qui consomment les organes de l'individu, intoxiqués par les produits de putréfaction de l'intestin, surtout le gros intestin de l'homme.

Parmi ces produits de putréfaction apparaît régulièrement l'indol, qui est formé sans cesse sous l'influence de différents microbes, surtout du *Bactérium coli* commune.

L'indol est absorbé et transformé dans le foie en indoxyl-sulfate et en indoxylglucuronate; sous ces formes, il circule dans le corps. Dans son cours à travers le corps, l'indol affaiblit les cellules des organes, surtout de ceux, qui sont nécessaires à la vie comme le cerveau, le foie, les reins, les capsules surrénales, les vaisseaux (les artères); les cellules affaiblies sont en proie aux macrophages.

Pour contrôler sa théorie et pour mieux la fonder, METCHNIKOFF a fait faire différents travaux, d'une part pour étudier la capacité des microbes quant à la production de l'indol ²⁾, d'autre

¹⁾ Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie. 1913.

²⁾ Annales de l'Institut PASTEUR, 1910. DOBROWOLSKY.

part pour apprendre l'influence de l'indol, du phenol, du paracresol sur les animaux.

Parce que l'athérome est une des altérations les plus caractéristiques du sénium, on a surtout étudié l'influence des matières nommées sur le système vasculaire.

METCHNIKOFF ¹⁾ ne réussit pas dans ses tentatives de créer l'athérome de l'aorte des cobayes, à l'aide du parakrésol; son élève OKKOUBO ²⁾ réussissait avec succès à voir paraître une sclérose de l'aorte des lapins qu'il avait nourris avec de l'indol; et de plus il observait des infiltrations mononucléaires dans les espaces portes du foie des lapins et des cobayes indolés.

S'appuyant sur ces études de METCHNIKOFF et d'OKHOUBO, DRATCHINSKY ³⁾ à l'institut PASTEUR de Paris s'est occupé d'une manière plus étendue de la question, si l'indol est vraiment d'importance dans l'étiologie de la sclérose des artères.

Tout d'abord, il étudia la structure normale de l'aorte des cobayes et il constata que l'aorte des cobayes de nos laboratoires est bien fréquemment altérée en forme d'athérome, ce qui était bien étonnant, parce que WEINBERG ⁴⁾ à l'institut PASTEUR également, n'avait trouvé qu'un cas d'athérome spontané sur 236 cobayes, ainsi que celui-ci avait conclu, que les cobayes n'ont pas d'athérome spontané. Et à l'examen macroscopique DRATCHINSKY n'a pas trouvé non plus de plaques athéromateuses, ni d'autres anomalies des parois des vaisseaux.

L'examen microscopique néanmoins de la partie ascendante de l'aorte, coupée en série révéla des foyers cartilagineux dans la paroi, surtout dans la tunique moyenne, à forme ronde ou ovale, très souvent dans la conjonctive, qui rattache les valvules sémilunaires à la paroi de l'aorte; les parties cartilagineuses se trouvent tantôt dans une, ou deux de ces attaches, tantôt simultanément dans toutes les trois.

DRATCHINSKY a trouvé ces foyers durs dans 50 % de ses cobayes examinés, et quand il ne compte que les animaux ayant un poids de 250 grammes et plus, ce nombre se monte à 67,5 p. 100.

¹⁾ Annales de l'Institut PASTEUR. 1910.

²⁾ Ibid.

³⁾ Annales de l'Institut PASTEUR. 1912.

⁴⁾ Comptes rendus de la Société de Biologie. 1908.

DRATCHINSKY conclut, que nous avons là un processus pathologique: une sclérose de l'aorte »sui generis«, se manifestant par un processus de cartilagination. Il la nomme »sui generis« parce que la cartilagination chez certains autres animaux, qui ont aussi des parties cartilagineuses dans le système cardio-vasculaire, ne se présente pas avec la même constance que chez les cobayes.

Deux des cobayes examinées montrèrent un dépôt de sels calcaires dans les espaces intercellulaires des foyers cartilagineux; dans un cas seulement fut annoté un léger épaissement de la tunique intérieure de la paroi.

Quant à l'étiologie de cette sclérose, on peut éliminer les différents facteurs de l'artériosclérose chez l'homme, comme l'empoisonnement par le plomb, par la nicotine, l'alcoolisme, la syphilis et autres processus infectieux. Il faut donc chercher le moment étiologique d'après les idées de METCHNIKOFF dans l'auto-intoxication intestinale de provenance microbienne; c'est le processus de putréfaction dans l'intestin, et surtout l'indol qui cause l'athérome.

Alors DRATCHINSKY a ingéré par voie buccale à une série de cobayes, une petite quantité d'indol dans une solution d'huile d'olives; il pratiqua cette petite opération tous les jours et ingéra 0,040 grammes d'indol par jour, de sorte que la réaction de l'urine au point de vue de l'indican restait nettement positive.

De plus la même expérience était faite avec un singe (*Macacus Rhesus*).

L'introduction de l'indol chez les cobayes était suivie souvent d'une dégénérescence hyaline en forme de foyers allongés dans la tunique moyenne de l'aorte ascendante; beaucoup de ces foyers étaient imprégnés de sels calcaires. Dans les dépôts calcaires on pouvait quelquefois constater des restes de cellules à aspect cartilagineux.

Deux jeunes cobayes ont présenté une forte cartilagination de la paroi de l'aorte dans la région des valvules.

La dégénérescence calcaire n'entraîna jamais le moindre épaissement de l'intima.

Autour des vasa vasorum il y avait des infiltrations de petites cellules rondes mononucléaires. Par endroits le tissu conjonctif était si fort, qu'il couvrait absolument les fibres élastiques.

Les reins présentait des foyers d'infiltration autour des glomérules et des vaisseaux, avec prolifération consécutive du tissu conjonctif dans la plupart des cas. Dans les tubes urinaires il y avait des dépôts calcaires.

Le foie présentait sous forme d'une infiltration de petites cellules autour des vaisseaux biliaires et sanguins la première phase de cirrhose.

DRATCHINSKY conclut donc, que chez les cobayes l'indol cause une sclérose: une athérome de l'aorte se manifestant par la dégénérescence hyaline et comme nous l'avons vu, la cartilagination de la paroi; la sclérose typique des reins; la cirrhose du foie.

Le singe qui avait été traité avec de l'indol présenta des infiltrations mononucléaires autour des vasa vasorum de la base de l'aorte, dans le cœur, autour des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins du foie; une néphrite interstitielle; des foyers calcaires dans les capsules surrénales.

Quand nous comparons les altérations de la paroi de l'aorte de l'homme, connues sous les noms de l'athérome, de l'artériosclérose, de l'athérosclérose avec celle que METCHNIKOFF et DRATCHINSKY ont décrite sous le titre de l'athérome chez le singe et les cobayes, nous remarquons une différence énorme.

Dans l'aorte du singe, DRATCHINSKY observa des infiltrations de cellules rondes autour des vasa vasorum; en admettant l'hypothèse de METCHNIKOFF sur le rôle de ces cellules mononucléaires comme un fait, il peut prétendre que ces foyers d'infiltration forment la première phase de la sclérose de l'aorte, mais cela reste à prouver. Chez l'homme on ne connaît pas ces infiltrations initiales, et la dégénérescence et l'hyperplasie de l'intima qui sont si caractéristiques pour la sclérose de l'homme manquent tout à fait dans la description bien exacte de DRATCHINSKY.

Chez les cobayes, DRATCHINSKY remarqua des foyers cartilagineux et la dégénérescence hyaline avec dépôt de sels calcaires; ces foyers se trouvent dans la tunique moyenne, et adventitielle de la paroi de l'aorte dans une partie nettement circonscrite, sans qu'il y ait aucune trace d'altérations de la tunique intérieure à ces endroits.

Or il y a quelque temps je me suis occupé en collaboration avec le Prof. REDDINGIUS des recherches sur l'influence des troubles nutritifs sur la paroi des vaisseaux, surtout de l'aorte des lapins et du cobaye.

Dans ce but je détachais une partie de l'aorte abdominale sur une longueur de 3 cM. chez le lapin, de 1 cM. et $\frac{1}{2}$ chez la cobaye, sans troubler la circulation dans l'aorte et sans faire de contusions, en prenant garde de ne pas toucher l'aorte. Pour empêcher une réunion précoce j'ai couvert la partie détachée de cofferdam. L'injection d'indigo-carmin prouve, que l'affluence de sang dans la paroi de la partie détachée est diminuée considérablement.

A ces troubles nutritifs, qui causent une dégénérescence de la couche musculo-élastique, l'intima répond par une hyperplasie consécutive très nette.

Il est bien remarquable, que dans les expériences de DRATCHINSKY, où il suppose la dégénérescence de la tunique moyenne par l'intoxication, qui est aussi un trouble nutritif, il n'y a point d'altérations de l'intima, ni dégénératives, ni hyperplastiques.

Ces résultats contradictoires m'ont fait répéter les expériences du Dr. DRATCHINSKY.

Comme DRATCHINSKY je me suis procuré de l'indol pur de la Badische Anilin- und Sodafabrik à Wilhelmshafen et j'ingérais tous les jours à mes 20 cobayes 0 gr., 040 dans 0.5 ou 1 cM³ d'huile d'olives. La solution était ingérée dans l'oesophage des animaux à l'aide d'une seringue d'injection à laquelle j'avais appliqué un bout de tube de caoutchouc de 4 cM. de longueur.

Durant les expériences, douze cobayes sont morts, les autres je les ai tués par le chloroforme. Mes matériaux consistaient donc en 20 aortes, provenant de cobayes qui avaient reçu de l'indol pendant :

17, 27, 28, 30, 31, 34, 40, 46, 51, 56 jours, 3 mois (2 cobayes) 3 mois $\frac{1}{2}$ (4 cobayes), 6 mois (2 cobayes), 8 mois (2 cobayes).

La durée de l'intoxication de la première dizaine a été trop courte, pour faire usage de ces animaux pour les conclusions; il ne nous reste que les derniers dix cobayes, qui ont été empoisonnés de 5 mois à 8 mois.

L'aorte ascendante de tous les animaux fut coupée transver-

salement en série après l'imprégnation à celloïdine ou à paraffine. En règle, j'ai coloré l'aorte en bloc avec le carmin. Des parties, qui avaient des foyers cartilagineux, ou se trouvaient à la hauteur, où d'autres animaux en avaient présenté, j'ai coloré quelques coupes d'après VAN GIESON et d'après WEIGERT afin d'étudier l'état du tissu conjonctif et des fibres élastiques.

Hors de ces aortes »pathologiques«, j'avais la disposition des aortes de 10 cobayes non traités avec de l'indol; ces cobayes étaient tous adultes; nous les avons sacrifiés, saignés à blanc pour nous fournir du sang pour la réaction de WASSERMANN.

Enfin j'ai fait l'examen de l'aorte de quatre foetus. Pour être sur que le foetus n'avait pas subi l'influence d'agents morbides, les produits d'avortement n'étaient pas propres à mes recherches. Pour cela j'ai fait la section césarienne d'un cobaye presque à terme, et je lui ai enlevé un des trois foetus qu'il portait. Quatre jours après les deux autres sont nés, à terme, et ils se sont très bien développés. Et ce foetus, exstirpé de l'utérus, tout à fait sain, présenta dans la paroi de son aorte, près de l'insertion des valvules sémilunaires un petit foyer de cellules rondes avec des capsules, des cellules différentes des autres cellules, musculaires et fibreuses, imitant comme des cellules cartilagineuses.

Chez les autres foetus je n'ai pas trouvé de cellules pareilles, ni dans cet endroit, ni dans des parties voisines.

Les dix cobayes adultes non traités présentaient sans exception des foyers cartilagineux autour de l'orifice de l'aorte, différents de grandeur, se trouvant presque toujours dans la couche moyenne. L'apparence de ces foyers cartilagineux n'était pas accompagnée d'altérations de l'intima. Les parties de l'aorte thoracique et abdominale examinées n'ont pas présenté de foyers cartilagineux.

La structure microscopique des foyers cartilagineux correspond parfaitement à la description exacte de DRATCHINSKY. Surtout dans les coupes colorées d'après WEIGERT et VAN GIESON, ainsi que les fibres élastiques sont colorés spécifiquement aussi bien que le tissu conjonctif, on peut observer que dans quelques endroits il se trouve des cellules arrondies, au lieu des cellules fusiformes communes, entre les fibres élastiques qu'ils font écarter; au centre de ces foyers les cellules deviennent plus grandes, le réseau élastique devient très lâche et rentre au

second plan en vue des cellules cartilagineuses entourées d'une capsule nette, qu'il contient dans ses mailles.

Les foyers cartilagineux se trouvent toujours dans une région fibreuse; or l'anneau d'attachement des valvules est toujours, aussi hors des foyers cartilagineux moins élastique, plus fibreux que le reste de la paroi de l'aorte.

Chez les animaux à qui j'avais ingéré de l'indol, j'ai trouvé les mêmes foyers cartilagineux que je décrivais ci-dessus. Excepté un cobaye, qui avait été traité pendant 46 jours et qui avait des foyers cartilagineux très étendus, les foyers des animaux indolés n'étaient pas plus grands que ceux de ses pareils normaux. La dégénérescence hyaline et l'imprégnation de sels calcaires n'ont jamais paru. Deux cobayes montraient des infiltrations lymphocytaires du tissu graisseux péri aortique; autour des vasa vasorum je n'ai pas remarqué ces infiltrations.

En me bornant à l'étude de l'aorte, j'ai obtenu le résultat suivant :

Tous les animaux adultes présentaient des foyers cartilagineux de la paroi de l'aorte d'une étendue différente, principalement à la base des valvules sémilunaires, dans le tissu conjonctif qui rattache ces valvules à la paroi, correspondant à une, deux ou tous les trois valvules; quelquefois ils se trouvaient dans la paroi des sinus Valsalvae.

Les cobayes traités avec de l'indol n'ont pas montré de différence avec les animaux non traités; il y a le fait curieux que deux cobayes indolés n'avaient pas de foyers cartilagineux; ces deux animaux avaient reçu de l'indol pendant 3 mois et pesaient 310 et 325 grammes quand je les tuai.

Un foetus presque à terme avait un conglomérat de cellules rondes, capsulées, qui ne peuvent être que des cellules cartilagineuses, je crois.

Je dois stipuler que je n'ai jamais remarqué de dégénérescences ou de l'hyperplasie de l'intima des cobayes normaux ou traités, ni à côté des foyers cartilagineux, ni autre part.

Par conséquent, est ce que les faits autorisent DRATCHINSKY 1^o. de concluer que les foyers cartilagineux, la dégénérescence hyaline subséquente et le dépôt de sels calcaires forment une sclérose sui generis, et de contribuer cette sclérose à l'influence de l'indol,

et 2° est ce qu'il a le droit d'expliquer la sclérose humaine comme la suite d'une intoxication de provenance intestinale, par l'indol?

Quant à la première question: les foyers cartilagineux ne se trouvent qu'autour de l'orifice de l'aorte, donc dans une région où l'on trouve des foyers cartilagineux ou osseux chez différents animaux comme le cheval, le porc, beaucoup de carnivores 1) qui sont aussi susceptibles d'une sclérose, rappelant l'athérosclérose de l'homme; pour le cheval, tout au moins, FABER 2) vient de le démontrer. Selon mon opinion c'est un argument contre la supposition de DRATCHINSKY, et cela me fait accepter plutôt que les foyers indiqués qu'on trouve toujours, forment une partie physiologique de l'aorte, soit qu'ils ne soient pas placés tout à fait régulièrement.

Il n'est donc plus nécessaire de chercher le moment étiologique de ces foyers cartilagineux qui ne sont pas causés par l'alcool, le syphilis, etc. dans l'auto-intoxication chronique par l'indol. Surtout le petit foyer dans l'aorte d'un foetus, qui indiquerait une intoxication placentaire sans autres troubles, ne plaide pas en faveur de l'hypothèse de DRATCHINSKY.

Or il n'est pas vraisemblable du tout, que la cartilagination est la sclérose kat' exochen des cobayes. On a pu causer chez les cobayes des formes d'athérome, qui ressemblent beaucoup plus à l'athérosclérose de l'homme. Tout d'abord je rappelle nos recherches sus-dites par le détachement de l'aorte. Mais ce n'est pas encore l'athérosclérose sensu strictiori.

Le premier qui a réussi à créer chez des animaux une dégénérescence de la paroi de l'aorte ressemblante, même identique à l'athérosclérose humaine, c'était SALTYSKOW 3), qui y parvint par des injections répétées de staphylocokkes chez le lapin. Sur la demande du Prof. REDDINGIUS j'ai pratiqué aussi les injections coccaires et jamais je n'ai obtenu l'athérosclérose de mes lapins. Cela prouve bien qu'il faut être très prudent sur l'interprétation des épreuves expérimentelles. SALTYSKOW lui-même a supposé tout de suite que nos résultats différents

1) DRATCHINSKY, l.c.

2) ARNE FABER. Die Arteriosklerose, Jena 1912.

3) Verhandlungen der deutschen pathologischen Gesellschaft, XIIe Tagung 1908.

s'expliqueraient par la nourriture: il nourrissait ses lapins avec du lait, nous avec de l'avoine et de l'herbe.

Des recherches russes ont alors rendu très probable la supposition de SALTYKOW.

ANITSCHOW 1), CHALATOW 2), WESSELKIN 3) et encore d'autres ont créé des altérations de paroi des vaisseaux, identiques à celles que SALTYKOW avait décrites et à l'athérome humaine, chez des animaux en les nourrissant avec des jaunes d'œuf, avec des cervelles, avec de la cholestérine.

Quand SALTYKOW 4) examinait maintenant l'effet de la nourriture au lait, toute seule, il a vu les mêmes altérations qu'il avait trouvés après l'injection des staphylocokkes, combinée avec l'ingestion du lait. L'examen chimique a démontré alors qu'avec cette nourriture on ingère une quantité de cholestérine aussi grande que dans les expériences d'ANITSCHOW.

Du reste CHALATOW 5) a montré, que les cobayes réagissent à l'ingestion de jaunes d'œuf de la même manière que les lapins, par une athérosclérose.

Je ne veux pas insister ici sur les recherches de CHAUFFARD 6) e. a. 7) qui nous ont démontré la richesse de cholestérine du sang des malades sclérotiques, qui sont d'une grande importance en rapport aux recherches expérimentelles nommées ci-dessus.

Il restait encore la possibilité, quoique peu vraisemblable que l'ingestion de jaunes d'œuf fut cause d'une augmentation des processus de putréfaction intestinale, de sorte qu'elle créait la sclérose par l'intermédiaire de l'intoxication par l'indol.

J'ai contrôlé l'urine des lapins et des cobayes (et à la clinique médicale on a bien voulu vérifier mes résultats) auxquels j'avais donné un jaune d'œuf par jour pendant quatre semaines. Nous n'avons pas obtenu la réaction positive de l'indican.

M'appuyant sur ces faits, mon opinion est qu'on n'a pas le

1) ZIEGLER'S Beiträge, Bd. 56.

2) Centralblatt für Allgem. Path. und Path. Anatomie, 1913.

3) VIRCHOW'S Archiv, Bd. 212.

4) VIRCHOW'S Archiv. Bd. 213.

5) l. c.

6) Revue de Médecine, 1911.

7) p. e. HENES, Deutsches Archiv. für Klinische Medizin, Bd. 111.

droit de dire que l'indol crée une sclérose sui géneris de l'aorte des cobayes et qu'il est très probable que l'indol ne joue aucun rôle dans l'origine de l'athérosclérose animale, qui ressemble à l'athérome humaine.

En ce qui concerne la deuxième question :

METCHNIKOFF et son école ne bornent pas là la théorie de l'origine intestinale de la sclérose aux cobayes et aux lapins qui étaient sujets des expériences à ce chapitre, ils étendent la doctrine sur l'athérome de l'homme.

Les matériaux humains positifs qui pourraient fonder leurs réflexions théoriques sont toujours très peu nombreux.

Il me semble que des cas, dans lesquels des malades ont souffert d'une putréfaction intestinale de longue durée et de grande intensité, où il y avait de résorption de l'indol pendant plusieurs années sont indispensables pour nous former une opinion sur la signification de cette putréfaction et de l'indol pour l'origine de l'athérome humaine.

Le sort m'a favorisé en me procurant un cas de cette sorte.

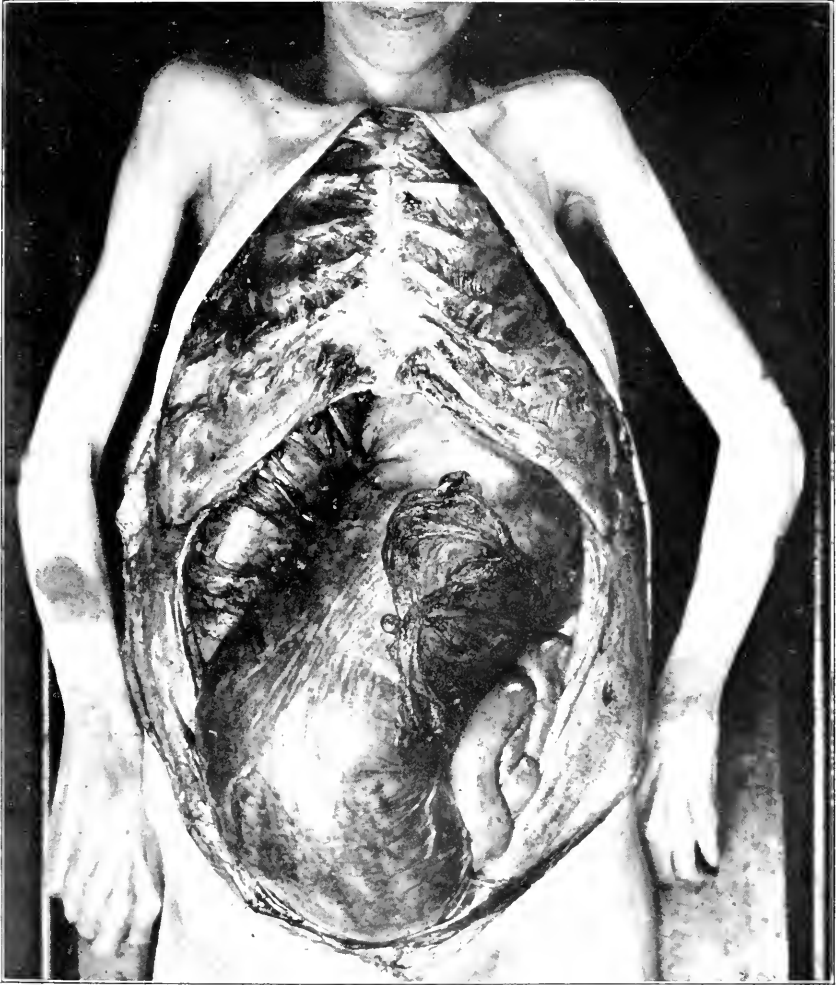
Il s'agit d'une femme, âgée de 59 ans qui avait été atteinte et était morte d'un vice congénital de l'intestin, de la maladie de HIRSCHSPRUNG.

L'anamnèse montre que dès sa septième année elle avait des symptômes graves du mal ; de la dix-septième à la trente-deuxième année les dérangements n'étaient pas forts, mais alors ils sont redevenus intenses pendant une grossesse et ils n'ont pas diminués jusqu'à la mort.

Tous les quatre ou six semaines le gros intestin était évacué à un certain degré à l'aide de drastiques et de lavements ; par ces procédés une grande quantité de matières fécales à l'odeur abominable était mise à jour.

Dans les derniers temps la femme se fit soigner quelquefois dans la clinique chirurgicale à Groningue pour un nettoyage de l'intestin à fond. La dernière fois l'entassement et l'inspissation des selles étaient si énormes que le chirurgien fut forcé de recourir aux instruments obstétricaux, de tâcher de diminuer la grosseur des matières par le perforatoire, et de faire l'extraction forcipale.

Malheureusement la paroi postérieure du colon sigmoideén fut



Situs viscerum de la femme atteinte de maladie de HIRSCHSPRUNG (pag .87.) (Le colon sigmoïdéen énorme occupe presque toute la cavité abdominale. On voit la dilatation de l'aperture thoracique inférieure par le S. Romanum, qui se perd dans le bassin .

perforée par ces manipulations, une collapse suivit et la femme mourut en quelques heures.

l'Autopsie fournit la diagnose :

Megacolon congenitum HIRSCHSPRUNG; perforatio colonis sigmoidei, parietis posterioris; peritonitis diffusa stercoralis incipiens; meteorismus abdominalis; atrophia renum et cordis gradus levioris; atherosclerosis aortae ramorumque gradus levioris.

La reproduction d'une photographie prise pendant l'autopsie et quelques chiffres suivants montreront que l'ectasie du colon sigmoïdéen, le dépôt de matières fécales en putréfaction était énorme :

La circonférence la plus grande du colon mesure 42 cM. (d'après CRUVEILHIER 14 cM. en état normal.)

L'épaisseur de la paroi mesure 5 mM., dont 3 mM. $\frac{1}{2}$ comptent pour la couche musculaire (en état normal l'épaisseur est de 1,8 mM.).

La longueur de la flexure mesurée à l'attachement du mésocolon est 70 cM., selon une ligne opposée au mésentère 105 cM. (VIERORDT note comme valeurs normales des chiffres de 15,7 à 39 cM.)

La contenance de cette partie de l'intestin se montait donc à plusieurs litres, ainsi qu'il avait de place pour une quantité respectable de selles en putréfaction, une source de produits aromatiques. Il est probable que le corps a puisé de cette source pendant la vie. A son séjour dans la clinique la femme avait l'urine donnant la réaction de l'indican positive.

Quant aux organes, nous n'avons pas beaucoup à ajouter à la diagnose sus-dite.

Le cœur est flasque, les valvules ne sont pas épaissies, pas rigides; l'examen microscopique ne révèle point d'infiltrations périvasculaires.

Le foie, de forme et de grandeur normale, consiste de lobules, régulièrement rangées; le tissu conjonctif n'a pas augmenté; point de cirrhose; le tissu périportale n'a pas d'infiltrations mononucléaires.

Les reins, un peu atrophies, ont la surface lisse sans rétractions distinctes; la capsule se détache aisément. A l'examen microscopique les artères arciformes montrent la paroi épaissie; quelques glomérules sont dégénérées en hyaline; l'écorce contient de petits foyers d'infiltration.

Les capsules surrénales ne montrent pas d'altérations à l'examen microscopique; point de dépôts de sels calcaires.

L'aorte ascendante a la paroi mince, qui est de bonne élasticité, l'intima montre quelques petits foyers épaissis de couleur grise, moins transparents. Le reste de l'aorte thoracique est très peu athéromateux; la dégénérescence est limitée à un épaississement léger de l'intima autour de l'origine des artères intercostales. L'aorte abdominale n'est pas dilatée; tout près de la bifurcation la couche intérieure est épaissie et peu transparente, jaunâtre; de plus il y a un petit foyer calcifié qui ne montre pas d'usure.

L'examen microscopique a affirmé la diagnose macroscopique.

Dans les coupes transversales de la paroi de l'aorte abdominale on peut distinguer une couche élastico-muscleuse (THOMA) d'épaisseur moyenne, bornée par des lamelles élastiques nettes. A la surface intérieure de cette couche il s'est formée de place en place une couche de tissu conjonctif contenant peu de fibres élastiques et un peu de lipoid colorable par le Sudan III.

C'est donc une aorte, qui a passé sa période de croissance et montre à un certain degré les altérations de la période de la vieillesse (ASCHOFF) 1).

Récapitulons maintenant les résultats de l'examen.

Nous voyons une femme de 59 ans, qui a souffert d'une constipation grave, avec putréfaction des matières fécales stagnantes, pendant au moins 40 ans, constipation qui à été accompagnée de la résorption de l'indol. Elle ne présentait que des altérations scléreuses de l'aorte et des petits vaisseaux très peu prononcées, pas plus, qu'on les trouve en règle chez les personnes de son âge. Le foie ne montre pas de signes de cirrhose, les reins présentent une sclérose de quelques artères et la dégénérescence de quelques glomérules, aussi très modérées, et pas trop graves pour une femme de presque 60 ans.

Il me semble que ce cas indique, que la putréfaction intestinale, et l'indol, soit qu'ils peuvent être d'une importance pour l'origine des maladies du système vasculaire des rongeurs, ce que je doute après les recherches, décrites ci-dessus, au point de vue de la sclérose humaine en général et de l'artériosclérose en particulier n'ont point l'intérêt que METCHNIKOFF et son école tendent à leur donner.

1) L. ASCHOFF. Über Atherosklerose und andere Sklerosen des Gefässsystems. Beihefte zur Mediz. Klinik, 1908, Heft 1.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der
Molkereigesellschaft »Plancius« in Amster-
dam].

EINE PRAKTISCHE BAKTERIENHARPUNE.

VON

Dr. Jur. A. RAAFF,

Direktor der Molkereigesellschaft.

Für die Abimpfung sehr kleiner Plattenkolonien unter fortwährender mikroskopischer Beobachtung habe ich eine Modifikation der UNNA-ZEISSschen Bakterienharpune herstellen lassen.

Der Apparat (Tafel V.) besteht aus zwei Teilen: der eigentlichen Impfnadel und dem Nadelführer.

Die Impfnadel ist von Stahl statt von Platin angefertigt, damit die Nadel eine gewisse Starrheit besitze. Diese Nadel kann auch zweiteilig gemacht werden, aus der Nadel und einem Schiebehülschen, worin die Nadel festgeschraubt werden kann, zusammengesetzt; man kann auf diese Weise je nach dem beabsichtigten Zweck verschiedene Nadeln einschrauben.

Der Nadelführer dient dazu die Nadel derart zu fixieren, dass ihre Spitze bis unter dem Objektiv des Mikroskops hinreicht und dort sichtbar ist. Er besteht aus einer Hülse, einem Stiel und einer federnden Klemme. Die Hülse umschliesst den Tubus des Mikroskops und der Stiel ist mittelst eines Kugelgelenkes einerseits mit der Hülse, andererseits mit der federnden Klemme verbunden. Die federnde Klemme ist derart konstruiert, dass die Nadel seitlich entfernt werden kann.

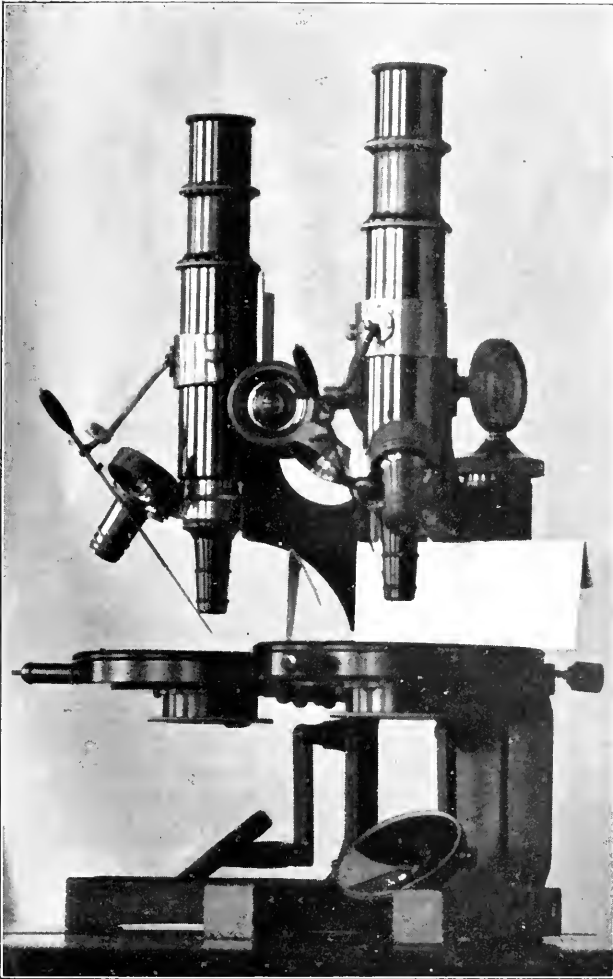
Die Nadelspitze wird etwas über die Bildfläche des Mikroskops (gewöhnlich benutze ich Okular 5, Objektiv A, ZEISS) eingestellt, sodass ihr Bild mehr weniger diffus wahrgenommen

wird. Die Impfnadel wird ausgeglüht und wieder in die federnde Klemme festgesetzt. Man stellt jetzt die abzuimpfende Kolonie scharf ein und bringt sie mittelst des beweglichen Objektisches genau unter dem diffusen Bild der Nadelspitze. Mit der groben Einstellung wird nun die Nadelspitze in die Kolonie getrieben; dieser Handlung kann man durch das Mikroskop ganz folgen. Der Tubus wird wieder gehoben, die Nadel seitlich entfernt und das Impfmaterial in den Nährboden übertragen.

Nach einiger Uebung kann man vorher genau die Stelle bestimmen, wo die Nadelspitze die Kolonie tangieren wird.

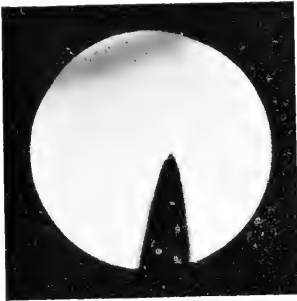
Nachstehende Photogramme (Tafel VI.) (die isolierte Abimpfung einer sehr kleinen Kolonie, in der unmittelbaren Nähe einer viel grösseren Kolonie liegend) demonstrieren die Wirkung der Harpune:

- Photogr. 1. Zeigt das diffuse Bild der Nadelspitze.
- » 2. Die Kolonie ist scharf eingestellt.
 - » 3. Die Kolonie ist unter der Nadelspitze gebracht.
 - » 4. Der Tubus ist wieder gehoben, die abgeimpfte Kolonie unter der Nadelspitze hinweggeschoben und wieder scharf eingestellt.
-

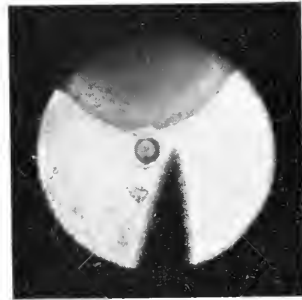


TAFEL VI.

Folia Microbiologia III.
(Raaff.)



1.



2.



3.



4.

STÄNDIGE MITARBEITER DER FOLIA MICROBIOLOGICA:

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.

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica“ veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u. A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

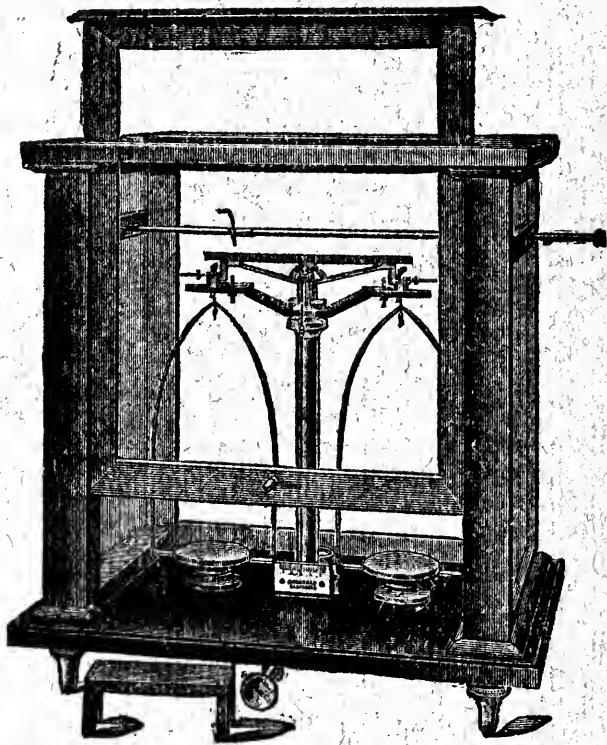
Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Artikel kostenfrei.

Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 3—4 Mal jährlich. Der Jahrgang von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie) fl. 12.—, 20 Mark, fr. 24.—, £ 1, \$ 5 (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica“ sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

BECKER'S SONS

WESTZEEDIJK 51-57.



ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN, EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN VAN BESTUUR, ENZ. ENZ.

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHIEDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY

FOLIA MICROBIOLOGICA.

HOLLÄNDISCHE BEITRÄGE ZUR
GESAMTEN MIKROBIOLOGIE.

HERAUSGEGEBEN VON:

M. W. BEIJERINCK, DELFT.

A. KLEIN, GRONINGEN.

J. POELS, ROTTERDAM.

J. G. SLEESWIJK, DELFT.

III. JAHRGANG, HEFT 2.

AUSGEGEBEN AM 21. DEZEMBER 1914.

(FÜR INHALT UND VERZEICHNIS DER MITAR-
BEITER, SIEHE INNENSEITE DES UMCHLAGES).

ADMINISTRATION UND VERLAG DER

FOLIA MICROBIOLOGICA:

PHOENIXSTRAAT 18, DELFT. (HOLLAND.)

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP

: VOORHEEN :

: J. C. TH. MARIUS :

GANZENMARKT 4-10, UTRECHT

SPECIALITEIT:

**INRICHTING EN COMPLETEERING VAN
WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA**

**MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN
VAN CARL ZEISS TE JENA EN
R. WINKEL TE GÖTTINGEN**

**MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN
MICRO-PROJECTIE APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN**

INHALT.

	Seite
M. W. BEIJERINCK. Ueber das Nitratferment und über physiologische Artbildung. (Mit 1 Tafel)	91
S. L. SCHOUTEN. Eine sprosslose Form von <i>Dematium pullulans</i> de Bary und eine sterile Zwergform von <i>Phycomyces</i> Agardh. (Mit 5 Tafeln)	114
J. HEKMAN. A new method of serological research, for the first time applied to sufferers from tuberculosis	126
H. MARKUS. Transmission de la tuberculose porcine à l'homme; réinoculation au veau. (Avec 3 Planches)	141
N. L. SÖHNGEN. Ueber reduzierende Eigenschaften der Essigbakterien	151
H. C. JACOBSEN. Die Oxydation von Schwefelwasserstoff durch Bakterien	155
BUCHBESPRECHUNG	163

UEBER DAS NITRATFERMENT UND UEBER PHYSIOLOGISCHE ARTBILDUNG

VON

M. W. BEIJERINCK.

I. Allgemeine Bemerkungen.

Es ist eine wohlbekannte Tatsache, dass sowohl im Boden, wie in Kulturflüssigkeiten, worin sehr viele Individuen des Nitratermentes vorkommen, relativ grosse Mengen organischer Körper gegenwärtig sein können, ohne die Nitratation, dass ist die Oxydation von Nitriten, zu stören. ¹⁾

Andererseits bemerkt man bei denjenigen Nitrationsversuchen, wobei das Nitraterment nur in einer geringen Anzahl von Individuen vorkommt, und also um eine deutliche Wirkung auszuüben zunächst wachsen und sich vermehren muss, dass schon sehr geringe Quantitäten der verschiedenartigsten organischen Stoffe die Versuche zum Misslingen bringen und alles Nitrit unverändert im Kulturmedium verbleibt.

Zur Erklärung dieser Erscheinungen wird angenommen, dass das Nitraterment nur dann wachsen und sich vermehren kann, wenn im Nährmedium wasserlösliche organische Stoffe völlig oder beinahe völlig fehlen, während es, einmal ausgebildet, von einer relativ grossen Menge organischer Substanz wenig beeinflusst wird und die Nitratation fortsetzt.

Eigene Untersuchungen haben mich zu einer ganz anderen Auffassung gebracht, nämlich diese, dass das Nitraterment eben mit grosser Leichtigkeit von allerlei organischen Körpern

¹⁾ Im Folgenden setze ich voraus, dass der Leser mit WINOGRADSKY'S Untersuchungen über die Nitrifikation (Handbuch der Technischen Mykologie, Bd. 3. Pag. 132, Jena 1904, wo man auch die Literatur findet) bekannt ist. Doch muss ich einige von ihm schon berührte Fragen, von meinem Standpunkte aus aufs neue behandeln.

leben und sich vermehren kann, 'dabei jedoch, *dass ist beim Wachstum auf Kosten organischer Nahrung*, das Vermögen Nitrite zu Nitraten zu oxydieren sehr bald völlig verliert, wobei es sich in eine scheinbar gewöhnliche saprophytische Bakterie umwandelt.

Diese bei der Assimilation der organischen Substanz stattfindende Umwandlung kann *physiologische Artbildung*, die beiden Formen, worin das Nitratferment demzufolge vorkommt, können als *oligotrophen* und *polytrophen* Zustand desselben bezeichnet werden.

Ferner hat sich herausgestellt, dass dem polytrophen Zustand in den Laboratoriumsversuchen, wobei diese Form, bei Abwesenheit organischer Stoffe, mit einer verdünnten Nitritlösung in Berührung bleibt, das Vermögen Nitrite zu oxydieren nicht zurückgegeben werden kann, selbst nicht in zehn Jahren.

Wird also in Flüssigkeiten, worin viel assimilirbare organische Substanz vorkommt, dennoch Nitratation beobachtet, so muss diese Substanz vorher auf irgend eine Weise verbraucht sein.

Bezüglich des Nitrationsvorganges im Ackerboden muss daraus Folgendes geschlossen werden.

Bei Gegenwart von viel organischer Substanz im Boden, wird diese nicht allein von anderen Mikrobenarten oxydiert werden müssen um die Arbeit der Nitratkeime zu ermöglichen, jedoch wird diese Vernichtung auch stattfinden können durch einen Teil der Nitratfermente selbst, welche dabei allerdings als solche verloren gehen, weil sie sich in die polytrophe Form umwandeln, aber im Boden werden immer Stellen vorkommen, wo keine oder nur Spuren von gelösten organischen Substanzen vorkommen und unveränderte, oligotrophe Nitratkeime sich vermehren und ihre Umgebung, nach Vernichtung des Organischen, wieder mit einer neuen nitratierenden Flora bevölkern können.

Wachstum und Nitratation sind getrennte Funktionen: erst, wenn das Wachstum beendet, setzt die Nitratation ein. Eigentlich ergibt sich schon daraus, dass beim Nitratferment keine Chemosynthese stattfindet. Denn wäre dieses wohl der Fall, so müsste eben die Nitritoxydation Ernährung und Wachstum ermöglichen, was jedoch nicht zutrifft. Immer bemerkt man, dass zunächst ziemlich rasch eine Bakterienvermehrung stattfindet,

und, dass es die neu gebildeten Bakterien sind, welche, ohne sich zu vermehren, das Nitrit in Nitrat umwandeln.

Es steht denn auch fest, dass das Nitratferment, auch in Reinkultur, Spuren von gelösten organischen Stoffen verarbeiten kann ohne das Vermögen zur Nitratation zu verlieren. Concentrationen von $\frac{1}{100}$, ja von $\frac{1}{20}$ Prozent Pepton siccum oder Natriumazetat können unter Umständen vertragen werden; gewöhnlich sind solche geringe Menge jedoch schon verderblich. Der Zustand der Keime ist also nicht gleichgültig; worin dieser Zustand aber besteht ist nicht bekannt. In einzelnen Fällen habe ich gute Nitratationen erhalten bei der Aussaat von auf Fleischbouillongelatine erhaltenen, gemischten Kolonien, welche sich entwickelt hatten aus darauf ausgesäten Nitratationen. Vielleicht handelte es sich dabei um Keime, welche infolge ihrer zufälligen Lage nicht ernährt und nicht gewachsen waren, denn die Regel: „ohne Wachstum keine Veränderung“, dürfte auch hier gelten.

Die Reinkultur des Nitratfermentes im nitratierenden Zustand ist mühsam und erfordert imganzen einige Wochen. Zunächst wird auf bekannte Weise, und in Uebereinstimmung mit WINOGRADSKY'S schönem Versuche, eine Rohnitratation angefertigt. Dazu wird in ein ERLENMEYER-kolben, mit einer dünnen Schicht einer Lösung von: Leitungswasser 100, Natriumnitrit 0,05 à 0,1 und Bikaliumfosfat 0,01, infiziert mit Garten- oder Ackererde, kultiviert bei 30°. Nach 10 bis 14 Tagen ist das Nitrit völlig verschwunden und das Nitratferment derweise angehäuft, dass eine Ueberimpfung weniger Tropfen in eine neue Nährlösung bei übrigens gleichen Bedingungen, jedoch in klarer Lösung, schon nach ungefähr einer Woche das Nitrit zum Verschwinden bringen kann. Bei Versuchen im Laboratorium entsteht nun ebenfalls die für die Rohnitratationen so eigentümliche „Kahmhaut“, welche aus ein paar Bakterienarten besteht, worauf wir noch zurückkommen. In Kolben, welche im Freien aufgestellt sind, entsteht diese Kahmhaut zwar ebenfalls, jedoch in viel schwächerer Ausbildung und wird erst bei genauem Zusehen bemerkt.

Einen Einblick in die Mikrobenbevölkerung der nitratierenden Lösungen, bekommt man am besten durch Aussaat auf Kiesel- oder Agarplatten. Das Agar muss vorher ausgelaugt werden um

dar aus die löslichen organischen Körper zu entfernen, und es soll nicht mehr wie $\frac{1}{20}$ Proz. Natriumnitrit zugesetzt werden, weil anders das Verschwinden dieses Salzes zu spät zur Beobachtung kommt.

Die Anfertigung der Kieselplatten habe ich schon in den Jahren 1896 und 1903 beschrieben. ¹⁾ Gegenwärtig verwende ich das getrocknete und pulverisierte Natriumsilikat des Handels, welches in 8-prozentiger, wässriger Lösung, gekocht und filtriert wird. Eine solche Lösung ist beinahe halb-normal; 100 cc. werden also durch 50 cc. Normalsalzsäure neutralisiert. Die Erstarrung findet bei dieser Verdünnung noch langsam genug statt, um die Silikatlösung und die Säure vollständig zu vermischen und ruhig auszugießen in die Glasdose. Hat die Vermischung nur unvollständig stattgefunden, so bilden sich während der Erstarrung Schlieren, welche die Beobachtung der Kolonien auf der Oberfläche erschweren. Die erstarrte Platte wird durch Auslaugen mit destilliertem Wasser von Kochsalz befreit, mit der Nitrit haltigen Nährlösung übergossen und, wenn die Salze hineindiffundiert sind so lange „getrocknet“, bis die äusserlich anhängende Flüssigkeit entfernt ist, und schliesslich flambiert. Humatzusatz zum Wasserglas, welcher natürlich vor dem Vermischen mit der Salzsäure stattfinden muss, begünstigt einigermassen das Bakterienwachstum, jedoch nicht den Nitrifikationsvorgang in den Platten. Obschon die Humus-säure durch die zugesetzte Salzsäure unlöslich wird, bleibt dieselbe, sehr gleichmässig kolloidal in der Kieselplatte verteilt, kann jedoch wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser, nicht hinaus diffundieren.

Durch viele spezielle Versuche wurde in meinem Laboratorium nachgewiesen, dass die günstige Wirkung der Humate, sowohl bei den Nitrifikation, wie beim *Azotobacter*wachstum, jedenfalls der Hauptsache nach auf die katalytische Tätigkeit der *gelösten* kolloidalen Kieselsäure beruht, während eine günstige Wirkung des kolloidalen Eisenhydroxyds in viel geringerem Maasse nach-

¹⁾ Centralblatt für Bakteriologie Bd. 19, S. 259. 1896, und Centralblatt für Bakteriologie, 2e Abt. Bd. 10, S. 38, 1903. Wie geeignet solche Platten sind für die Kultur der Diatomeen, habe ich ebenfalls daselbst nachgewiesen. Auch Grün- und Blaualgen wachsen darauf vorzüglich.

weisbar war, obschon in der Literatur eben dem letztgenannten Körper eine besondere günstige Wirkung bei der Nitratation zugeschrieben wird.

Es war darum denn auch zu erwarten, dass Humatzusatz zu den Kieselplatten sich nur wenig bemerkbar machen würde.

Bei guter Vermischung des Wasserglases und der Salzsäure erhält man Platten, welche nach der Sättigung mit der Nährsalzlösung und nach dem „Abtrocknen“, eine gleichmässig spiegelnde Oberfläche besitzen, worauf selbst die kleinsten und durchsichtigsten Bakterienkolonien erkennbar sind. Die Platten sind sehr wasserreich und enthalten 3 bis 4 Proz. Kieselsäure als Trockensubstanz. Unterhalb 3 Proz. werden sie so weich, dass sie bei der leisesten Berührung mit dem Platinfaden geschädigt werden. Gut gefertigte Kieselplatten sind fest und elastisch und geben beim Anschlag der Glasdose mit dem Finger, einen eigentümlichen Ton. Vorgreifend muss ich jedoch bemerken, dass solche Kieselplatten zwar sehr geeignet sind um eine Trennung des Nitratfermentes von den groberen Verunreinigungen vorzunehmen, weil die Nitrifikation darin leicht stattfindet, allein dass es ausserordentlich schwierig ist wirklich reine Kolonien des Nitratfermentes von den Kieselplatten zu bekommen: beinahe jede Kolonie ergibt sich nämlich als eine Mischkolonie, sodass man wohl annehmen muss, dass die Einzelkeime des Nitratfermentes viel schwieriger zur Entwicklung kommen, wie die mit anderen Keimen verklebten. Welche diese Symbionten sind werden wir bald sehen. Die Reinkultur geschieht viel leichter durch die Verwendung von Nitritagarplatten, obschon man darin die Nitrifikation erst später beobachtet. Offenbar sind die im Agar gegenwärtigen Spuren von löslichen organischen Substanzen für die erste Entwicklung des Nitratfermentes günstig.

Für die Untersuchung der Nitritfermente, welche die Ammonsalze oxydieren, und die noch viel empfindlicher sind für gelöste organische Stoffe, wie das Nitratferment, können richtig angefertigte Kieselplatten sehr nützlich werden, und bei einer anderen Gelegenheit hoffe ich darauf noch zurückzukommen.

2. Flora der Rohnitrationen.

Ebenso wie in der Natur sind die Rohnitrationen in den Laboratoriumsflüssigkeiten essentiell symbiotische Vorgänge.

Die Reinkulturen geben in keiner Beziehung bessere Erfolge wie die Rohanhäufungen, können denselben jedoch, bei guter Ausführung gleich kommen. Vergleicht man diesen Umstand mit den wundervollen Resultaten, welche man mit Reinkulturen z.B. von Leucht- und Pigmentbakterien erhalten kann, deren Rohkulturen wertlos sind, so sieht man, dass der Unterschied von prinzipieller Bedeutung ist.

Obschon die äusserlich sichtbaren Eigenschaften, sowohl der Rohnitrifikationen von Ammonsalzen, wie die der rohen nitratierenden Kulturen, ungemein charakteristisch sind, habe ich davon nirgend eine Beschreibung gefunden, was um so auffälliger ist, als es sich dabei handelt um eine Frage, welche von der grössten praktischen Bedeutung ist für die Landwirtschaft, und von nicht geringerer theoretischen Wichtigkeit durch die damit in Verbindung stehenden Probleme der Chemosynthese und der physiologischen Artbildung.

Wenn auch die für Nitratation bestimmten Nährsalzlösungen frei oder nahezu frei von löslichen organischen Körpern sein müssen, so sind doch die in verwesenen Bodenproben gegenwärtigen organischen Stoffe der Nitratation nicht ungünstig. Und wenn auch kräftig nitratierende Flüssigkeiten gänzlich klar und durchsichtig sein, und unter Umständen, z.B. bei der Verwendung von Reinkulturen auch bleiben können, so braucht dieses bei den Rohnitratationen (so wie bei den Rohnitrifikationen aus Ammonsalzen) jedoch gar nicht der Fall zu sein: dieselben überdecken sich im Laboratorium schnell, im Grunhause und im Freien langsamer, mit der durchaus eigentümlichen, äusserlich wie „Bierkahn“ aussehenden Haut, welche ich schon im Jahre 1903 beschrieben habe, ohne damals das Nitratferment selbst noch genügend zu kennen.¹⁾ Seitdem sind meine Kenntnisse der hierbei waltenden Wachstumsvorgänge und Bedingungen viel verbessert.

Die treibende Haut enthält gewöhnlich zahlreiche Keime des Nitratfermentes und kann dann, mit einigem Rechte, als „Nitratmutter“ bezeichnet werden. Der Hauptsache nach besteht dieselbe

¹⁾ Farblose Bakterien deren Kohlenstoff aus der atmosphärischen Luft herrührt, *Centrabl. f. Bakteriologie*, 2te Abt. Bd. 10, Pag. 38, 1903. In dieser Abhandlung steht: *paucitrophus*, lies: *paulotrophus*.

jedoch aus zwei nicht nitrifizierenden Arten, welche ich damals *Bacillus oligocarboophilus* und *Actinomyces (Streptothrix) paulotrophus* genannt habe, ohne ihre Verwandtschaft richtig zu verstehen. Seitdem erkannte ich aber, dass *B. oligocarboophilus* ein echter Actinomycet ist, und der von NEUMANN und LEHMANN aufgestellten Gattung *Mycobacterium* zwar nahe steht, davon jedoch generisch getrennt werden muss. 1) Ich schlage darum vor diese wichtige Art als *Actinobacillus oligocarboophilus* zu bezeichnen, und bringe auch die zweite genannte Form zu derselben Gattung als *Actinobacillus paulotrophus*. 2)

Echte *Actinomyces*-arten, wie besonders *A. robur* KRAINSKY 3) und *A. griseus* KRY, finden sich in der treibenden Haut ebenfalls, jedoch in viel geringerer Anzahl, und nur dann, wenn die Kulturen lange aufbewahrt werden. *A. diastaticus* KRY und *A. cellulosa* KRY, wurden bisweilen auch aufgefunden, jedoch in noch geringerer Anzahl. Diese *Actinomyces*-arten gehören nicht zu der Normalflora der Rohnitrifikationen, obschon sie dem Vorgang nicht ungünstig sind.

Wie ich das früher (l. c.) gezeigt habe, leben alle diese Hautbewohnende Mikroben von den organischen Stoffen, welche sich in merklichen Menge in der Laboratoriumsluft und gewiss auch in der Bodenluft vorfinden. Diese Stoffe sind in der freien Aussenluft, sowie in den Grönhäusern, wie ich durch viele spezielle Versuche festgestellt habe, nur in einer sehr viel geringeren Menge gegenwärtig, obschon sie auch darin niemals gänzlich fehlen.

Versucht man die verschiedenen Hautbewohnenden Arten auf bessere Kulturböden, z. B. auf Bouillongelatine, zu kultivieren so stößt man dabei auf Schwierigkeiten. *Actinobacillus oligocarboophilus* wird dabei zunächst unkenntlich, indem die Kolonien das „Kahmmerkmal“ verlieren, was sie auf einem armen Kulturboden jedoch wieder zurückbekommen. *Actinobacillus paulotrophus* konnte ich auf bessere Kulturböden überhaupt nicht kultivieren. Die echten *Actinomyces*-arten wachsen auf solche Böden, wenn

1) Bakteriologische Diagnostik, 1e Aufl. 1899, 5e Aufl. Pag. 582, 1912.

2) Vor kurzem (Folia Microbiologica, Bd. 2. Pag. 196, 1914) habe ich noch eine weitere Actinomycetengattung aufgestellt, nämlich *Actinococcus*, welche bis dahin zu *Micrococcus* gerechnet war.

3) A. KRAINSKY, Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. Centralbl. f. Bakteriologie, 2te Abt. Bd. 41, Pag. 649, 1914.

einmal in Reinkultur, nicht schlecht, viel besser jedoch auf feste Böden mit verdünnter Nahrung, wofür übrigens die verschiedensten organischen Stoffe geeignet sind.

Wenn in den nitratierenden Nährlösungen das Nitrit völlig in Nitrat umgewandelt ist, hört das Wachstum der *Actinobacillus*-haut nicht auf, sondern geht ungestört fort. Offenbar steht die Nitritoxydation nicht in direkter Beziehung zu diesem Wachstum. 1)

Auch in den vollständigen Nitrifikationen mit Ammonsalzen, kann die Hautbildung auf die gleiche Weise stattfinden, wie in den Nitratationen. Dabei beobachtet man aber die folgende wichtige Erscheinung: beim Ueberimpfen der Nitritphase, ehe darin Nitratbildung stattfindet, ist schon bei ein oder zwei Wiederholungen die Hautbildung vollständig beseitigt, sodass weder *Act. oligocarbohilus* noch *Act. paulotrophus* aus solchen stark Nitrit erzeugenden Lösungen überhaupt mehr zur Entwicklung zu bringen sind. Dieses ist desshalb so bemerkenswert, weil das Verschwinden der genannten Arten aus den Kulturen, begleitet ist von dem Verschwinden des Nitratfermentes selbst. Die Gegenwart selbst vereinzelter Keime des Nitratfermentes lässt sich leicht nachweisen durch Aussaat auf Agarplatten worin $\frac{1}{10}$ Proz. Pepton. Das Ferment erscheint darauf in der polytrophen, sehr charakteristischen Form. Die Beseitigung des Nitratfermentes aus den Rohnitrifikationen z. B. von Ammonsulfat, geschieht am schnellsten, wenn man der Lösung keine Kreide oder Magnesiumcarbonat zusetzt. Es ist also leicht zwei Arten von Rohnitrifikationen der Ammonsalze beim ersten Blicke zu unterscheiden, nämlich, erstens, Nitrifikationen, welche kein Nitrat bilden und an ihre Oberfläche klar bleiben, und zweitens vollständige Nitrifikationen, welche neben Nitritferment auch Nitratferment enthalten und sich an ihrer Oberfläche gewöhnlich (aber nicht notwendig) mit der beschriebenen Kahnhaut bedecken. Die Erklärung dieses Umstandes beruht auf zwei Eigenschaften des Nitratfermentes, welche ebenfalls bei den Actino-

1) Ob das Nitratferment selbst auch noch wachsen und sich vermehren kann nachdem die Nitrite völlig oxydiert sind, ohne dabei dieses Oxydationsvermögen zu verlieren, konnte ich trotz vieler Versuche noch nicht einwandfrei feststellen. Weil die Frage offenbar eine interessante ist, hoffe ich später die definitive Antwort geben zu können.

bacillen gefunden werden, nämlich, ihre Empfindlichkeit für freie Säure, und ihre, wenn auch geringere Empfindlichkeit für Ammonsalze, wovon besonders die erstere ausschlaggebend ist.

Anderseits stellt sich heraus, dass die in den Nitritationen herrschende saure Reaktion dem Nitritferment viel weniger schädlich, ist wie dem Nitratferment. Wenn also in den Rohnitifikationen der Ammonsalze Calciumcarbonat und andere Basen in ungenügender Menge vorkommen um alle Säure zu binden, führt dieses zum Verschwinden der Nitratflora. Verwendet man Ammonsulfat, oder besser noch Ammonmagnesiumfosfat, ohne weiteren Zusatz von Carbonaten, so kann eine weitgehende Nitritation stattfinden und wegen der sich langsam anhäufenden Säure, wird die Nitratflora dabei von Anfang an unterdrückt, um schliesslich vollständig zu verschwinden.

Weil die Hautbildung auf den nitrifizierenden Flüssigkeiten in der Aussenluft, sowie im greenhouse, nur schwach ist, muss man um die beschriebenen Verhältnisse unter diesen Umständen zu beobachten, schärfer zusehen als wenn der Versuch in der Laboratoriumsluft stattfindet. Niemals habe ich aber vollständige Rohnitifikationen gesehen, wo die Haut der Actinobacillen gänzlich fehlte, solche lassen sich im allgemeinen nur durch partielle Reinkultur vermittelst der Plattenmethode erhalten, obschon sie natürlich auch zufällig, bei den gewöhnlichen Rohkulturversuchen müssen entstehen können.

Hat man Reinkulturen des Nitratfermentes angefertigt, so bleiben die damit stattfindenden weiteren Kulturen durchsichtig und wasserklar. Hautbildung findet darauf niemals statt, nur an der Glaswand der Gefässer ist eine sehr dünne Schleimschicht bemerkbar, welche aus den kleinen Nitrobakterien besteht.

Wie zu erwarten war entwickeln sich in den Rohnitifikationen massenhaft Amöben, welche auch auf den Platten wachsen und sich dabei oft derweise vermehren, dass sie die Erzielung reiner Bakterienkolonien unmöglich machen, weil sie beim Herumkriechen die an ihrem Körper haftenden fremden Keime überall auf die Platte bringen. Ausser der früher beschriebenen *Amoeba nitrophila*,¹⁾ ist es besonders eine sehr

¹⁾ Kulturversuche mit Amöben auf festem Substrate. Centralbl. f. Bakteriologie Bd. 19, S. 258, 1896.

kleine und weit verbreitete Art, welche ich *Amoeba nana* nenne, die sich in den Nitrifikationen ansiedelt und sich daselbst massenhaft vermehrt, auf Kosten des Nitratfermentes selbst.

Auf Kieselplatten habe ich mehrfach kleine Acarinen gefunden, welche sich ebenfalls mit den Nitratfermenten ernährten.

Eine merkwürdige Eigentümlichkeit, speziell der Rohnitrationen, viel weniger der Rohnitritationen, ist ihre Fähigkeit sich mit Pigmentbakterien zu bevölkern, welche zu der Familie der Actinomyceten und wahrscheinlich zur Gattung *Actinobacillus* und nicht zu *Mycobacterium* gehören, weil sie sich durchaus nicht verzweigen. Dieselben sind ausgezeichnet durch braune oder rein rote Pigmente, welche am Bakterienkörper gebunden sind, sodass diese Bakterien als »chromatophore« bezeichnet werden müssen. Das rote Pigment ist sicher Carotin, denn die roten Kolonien färben sich in concentrirter Schwefelsäure schön indigoblau. Auch kann das Pigment leicht mit Chloroform extrahiert werden; nach Verdunstung bleibt dann das Carotin zurück, das sich mit starker Schwefelsäure wieder indigoblau färbt.

Weil diese Pigmentbakterien sich auf den Nitritagarplatten auf eine ähnliche Weise ernähren, wie die Actinobacillen, und aus atmosferischen Kohlenstoffverbindungen ihre Körpersubstanz aufbauen, lässt sich verstehen, dass ihre Kolonien denjenigen des Nitratfermentes überwuchern und, dass es schwierig ist dieselben von dem Letzteren zu reinigen. Man kann dadurch leicht in den Irrtum verfallen, dass sie imstande sind zu nitratieren, doch ergibt die genauere Untersuchung, dass diese Auffassung unrichtig ist. Solche mit Nitratferment infizierte Kolonien dieser eigentümlichen Pigmentbakterien sind aber für Nitrationsversuche, besonders auf Platten, sehr geeignet. Dabei kann es vorkommen, dass durch unbekannte Ursachen, die Pigmenterzeugung gänzlich ausbleibt, sodass diese Bakterien veränderlich sind.

Dagegen ist sowohl das rote wie das braune Pigment selbst ausserordentlich stabil, sowohl in Dunkeln wie im Lichte. Platten mit diesen Pigmentkolonien habe ich im feuchten Zustande zwei Jahre lang aufbewahrt, ohne die geringste Farbänderung zu bemerken.

Wünscht man Reinkulturen des Nitratfermentes anzufertigen, so ist es geeignet zunächst durch das Plattenverfahren eine vorläufige Trennung auszuführen, wobei bei der Impfung in

die zu nitrifizierenden Lösungen eine partielle Rohkultur erhalten wird, die dann später, auf dieselbe Weise, weiter zerlegt wird.

Die grösste Schwierigkeit, welche man dabei begegnet ist die Trennung des Nitratermentes von *Bacillus nitroxus*, worauf wir weiter werden zurückkommen.

3. Reinkultur.

Die mechanische Schwierigkeit der Erkennung des Nitratermentes auf den Platten hängt damit zusammen, dass der Nachweis, ob eine Bakterienkolonie, auf einer Kulturplatte wachsend, Nitrite in Nitrate überführt, nicht direkt möglich ist.

Dieses ist besonders augenfällig beim Vergleich dieser Umwandlung mit der Nitritbildung auf Platten mit Ammonsalzen, wobei jede einzelne Salpeterigsäure erzeugende Kolonie sofort daran zu erkennen ist, dass sie, z. B. beim Wachstum auf einer Kieselplatte, worin fein verteiltes Ammonmagnesiumfosfat suspendiert ist, Mittelpunkt eines hellen Diffusionsfeldes in der trüben Platte wird, welches Feld dann noch überdies die so empfindlichen Farbereaktionen der Nitrite geben kann.¹⁾

Vergebens habe ich versucht diesen Umstand zu beseitigen durch die Verwendung unlöslicher Nitritsalze, deren Umwandlung in Nitrate zu löslichen Verbindungen führt, nämlich das schön gelbe Kalium-Cobalt-Nitrit, $\text{Co}(\text{NO}_2)_3 \cdot 3\text{KNO}_2 \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, und das weisse Kalium-Iridium-Nitrit. Diese Salze sind aber für das Nitraterment giftig und werden nicht merklich nitrifiziert.

Weil nun die Nitratkolonien auf den Nitritplatten morphologisch wenig charakteristisch sind, ist man genötigt die Einzelkolonien gesondert zu untersuchen. Bisher musste dieses durch den Nitrationsvorgang selbst geschehen, was sehr viel Zeit beansprucht. Es hat sich nun aber herausgestellt, dass die Umwandlung bei besserer Ernährung des Nitratermentes in die polytrophe Art, diese Erkennung sehr vereinfacht.

Für die Reinkultur des Nitratermentes sind Agarkulturplatten

¹⁾ Die Verwendung von Ammonmagnesiumfosfat beim Plattenverfahren, hat mehrere Vorzüge vor derjenigen von Ammonsulfat mit Kreide oder Magnesiumcarbonat. Ich bringe das Ammonmagnesiumfosfat auf die Oberfläche der schon fertigen Kiesel- oder Agarplatte, durch Aufgiessen einer neuen, papierdünnen Schicht Kiesel- oder Agarlösung, worin das Salz suspendiert ist.

viel geeigneter wie Kieselplatten. Es muss jedoch durch Auslaugen mit destilliertem Wasser aus dem Agar das Lösliche vorher entfernt werden, damit das Nitrationsvermögen in den Kolonien erhalten bleiben soll. Jedenfalls steht fest, dass in den Nitritagarplatten, welche nicht vollständig ausgelaugt sind, wenn sich darauf relativ grosse Nitratfermentkolonien entwickeln, diese gar nicht mehr nitratieren, und, wenn sie klein bleiben, erst dann zu deutlicher Nitratbildung veranlassen, wenn man keine Vergrösserung derselben mehr bemerken kann. Letztere Beobachtung ist in Uebereinstimmung mit der Auffassung, dass Wachstum und Nitrationsvorgang nicht zugleich zustande kommen, und erst die erwachsenen, sich nicht mehr vermehrenden Bakterien, die Nitrationsvorgang bewirken.

Weil das Nitratferment, sowie die übrigen in den Rohnitrifikationen vorkommenden Mikroben das Agar nicht angreifen, muss, für die Entwicklung ihrer Kolonien auf der Platte, ein geringer Gehalt an lösliche organische Substanz vorhanden sein, welche Substanz den Nitrationsvorgang überhaupt erst ermöglicht. 1)

Die Nitratkolonien bilden bei dichter Aussaat auf den Agarplatten (Tafel VII Fig. 1) kleine Kolonien von $\frac{1}{2}$ à 1 m.M. Mittellinie, welche als glasartig durchsichtige Plättchen, selbst mit der Lupe etwas schwierig sichtbar, unter dem Mikroskop bei 20 bis 50-maliger Vergrösserung jedoch sehr charakteristisch sind. Bei weniger dichter Aussaat und in Impfstichen können sie, durch seitliche Ausbreitung, viel grössere Dimensionen annehmen, bleiben aber immer sehr dünn. Ist der Wassergehalt des Agars relativ gering, so können die Kolonien rund bleiben; auf wasserreicheren Agar bilden sie dagegen leicht Ausläufer, was zu medusenartiger oder dendritischer Verzweigung der Kolonien veranlasst. Diese Verzweigungen können ausseror-

1) Die Agar verflüssigenden und daraus Zucker erzeugenden Gelasebakterien, können in Grabenmoder vorkommen; auf dem Laade fand ich dieselben nicht. Bei deren Gegenwart kann die direkte Isolierung des Nitratermentes im nitratierenden Zustande auf Agarplatten Schwierigkeiten bieten. Bei Anhäufung und Ueberimpfung in Nitritlösung verschwinden die Gelasebakterien jedoch bald. Im Schlamm des Schiffahrtskanals zu Delft sind besonders sporenbildende Gelasebakterien häufig, während die nicht sporenbildenden Arten besonders in der Nordsee vorkommen. Doch kommen auch im Kanalschlamm nicht sporenbildende Arten dieser Gruppe vor.

dentlich fein werden und zugleich zu einer grossen seitlichen Ausdehnung führen, wodurch dann Kolonien von mehreren Millimetern Durchschnitt entstehen. Solche stark verzweigte Nitratkolonien wachsen leicht in die Kolonien anderer Arten hinein, was man erst bei mikroskopischer Beobachtung bemerkt (siehe die Tafel). Für die Reinkultur müssen die Kolonien auf der Oberfläche gut abgetrockneter Agarplatten liegen, und in so grosser Entfernung von ihren Nachbarn, dass man über ihre Randbegrenzung nicht im Zweifel ist.

Obschon in gut zubereiteten Kieselplatten die Nitratation leichter stattfindet, wie in Agarplatten, ist dennoch die Erhaltung von Reinkulturen von den Ersteren schwieriger wie von Agar. Es stellt sich nämlich heraus, dass bei weitem die meisten auf Kieselplatten entwickelten Nitratkolonien, obschon sie gänzlich homogen aussehen, Mischkolonien sind und zwar seltener mit *Act. oligocarboophilus*, viel öfter dagegen mit dem höchst eigentümlichen, und hier sicher nicht erwarteten sporenbildenden und denitrifizierenden *Bacillus nitroxus*.¹⁾

Diese letztere Art ist bei allen meinen Versuchen, — welche jedoch nur mit Gartenerde aus Delft angestellt wurden, — in den Rohnitratationen ausnahmslos in ungefähr gleicher Individuenzahl gefunden, wie das Nitratferment selbst, und hat auch bei der Verwendung von Agarplatten erhebliche Schwierigkeiten bei der Trennung gegeben. Während langer Zeit meinte ich nämlich, dass eben *B. nitroxus* nitratieren konnte, was jedoch durchaus nicht der Fall ist.

Uebrigens kann ich gegenwärtig, nun ich den Tatbestand gut übersehe, angeben, wie man verfahren muss um in der kürzesten Zeit das Nitratferment und *B. nitroxus* neben ein ander zu erkennen. Dabei muss man Verwendung machen von der schon mehrfach genannten Eigenschaft des Nitratfermentes, bei besserer organischer Nahrung, sich in eine gewöhnliche saprophytische Bakterie umzuwandeln, welche leicht kenntliche Eigenschaften besitzt. Weil dabei das Vermögen zur Nitratation völlig verloren geht, und eine rückläufige Verwand-

¹⁾ Näheres über diese schwierige Art in: Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Centralbl. f. Bakteriologie. 2te Abt. Bd. 25, Pag. 45, 1910.

lung bisher nicht gelungen ist, muss man vorher durch Versuche sich von der Richtigkeit dieser Angabe überzeugt haben. Etwas Aehnliches gilt bei der Virulenzbeurteilung gewisser pathogener Mikroben, wobei jedoch von einer so grundsätzlichen Veränderung, wie beim Nitraterment, niemals Rede ist.

Bevor wir auf diese Unterscheidung von *B. nitroxus* noch etwas näher eingehen, muss die zuletzt genannte sehr wichtige Eigenschaft des Nitratermentes genauer betrachtet werden.

4. Oligotropher und polytropher Zustand des Nitratermentes: Physiologische Artbildung.

Das Hauptresultat der gegenwärtigen Untersuchung ist die Erkenntniss der beiden hier genannten Zustände des Nitratermentes.

Die Umwandlung der nitratierenden oligotrophen, in die nicht nitratierende polytrophe Form, findet, wie wir schon gesehen haben, statt bei besserer Ernährung, nicht nur bei der Impfung auf Platten, sondern auch in Nährlösungen. Impft man z. B. die reine nitratierende Form in Bouillon, so erhält man schon den zweiten oder dritten Tag bei 30° C. eine sich ziemlich lebhaft entwickelnde Kultur von dünnen Stäbchen und Fäden, *wovon sich viele bewegen*. Sie verzweigen sich niemals und ihre Beweglichkeit beweist, dass das Nitraterment unmöglich zur Familie der Actinomyceten gehören kann, welche typisch unbeweglich sind. Ich hebe dieses deshalb besonders hervor, weil der nitratierende Zustand des Fermentes niemals Bewegungserscheinungen zeigt, und unter den gleichen, so eigentümlichen Ernährungsbedingungen lebt, welche für die Actinomyceten *Actinobacillus oligocarbophilus* und *A. paulotrophus* so charakteristisch sind.

Wie man sieht ist die in den Handbüchern vorkommende Angabe, dass das Nitraterment in Bouillon nicht wachsen kann, durchaus unrichtig: *es wächst darin vorzüglich*, nur geht dabei das Nitrationsvermögen verloren.

Auf Bouillonagar oder auf Peptonagarplatten entwickelt das Ferment sich ebenfalls ausgezeichnet. Bouillongelatine wird anfangs nicht, später stark verflüssigt, wobei viel Ammon entsteht. Bei Gegenwart von Pepton entwickelt sich ein schwacher

Fäulnisgeruch; Pigmente oder fluorescierende Körper werden nicht erzeugt.

Auf reine Gelatinplatten, das heisst Gelatin gelöst in Wasser, mit oder ohne Salzen, findet kein Wachstum und keine deutliche Verflüssigung statt, obschon dabei das Nitrationsvermögen verloren geht.

Diastase, Tyrosinase und Glukosidenzyme werden durch das Nitratferment nicht erzeugt; ebensowenig werden dadurch Kohlehydrate unter Gasbildung vergoren; auch Denitrifikation findet nicht statt, was allerdings zu erwarten war, weil die Stickstoffbildung aus wässriger Salpetrigsäure ein endothermischer Vorgang ist, wobei 308 Kal. absorbiert werden.¹⁾

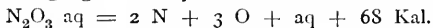
Weil die jungen Nitratkolonien auf Bouillongelatine, (Tafel VII Fig. 2 c, d), so lange sie diese nicht verflüssigen, sowie auf Peptonagarplatten sehr charakteristisch sind, und sich von allen anderen Arten unterscheiden durch die „trockene“, und rauhe Oberfläche und ihre flache Ausbreitung, muss es möglich sein, dieselben in Erdproben durch das gewöhnliche Plattenverfahren, bei oberflächlicher Aussaat, zu erkennen, was mir in einigen Fällen auch wirklich gelungen ist. Natürlich fehlt dabei jedoch die Controle der Nitrationsfunktion, weil nur der polytrophe, nicht nitratisierende Zustand erhalten wird, sodass man für die Erkennung Uebung haben muss. Der Versuch wird am besten ausgeführt durch Aussaat der Bodenproben auf Agarplatten, welche $\frac{1}{20}$ Proz. Pepton siccum und weiter nichts enthalten, und vor dem Gebrauch bei einer Temperatur unterhalb 40° abgetrocknet sind, so dass kriechende Bakterienarten, besonders der *Subtilis*-gruppe, welche in Kulturerde allgemein sind, sich nicht allzusehr ausbreiten können.

Die Concentration löslicher organischer Stoffe, welche die Nitrationsfunktion zum Verschwinden bringt, kann sehr gering sein. Mengen von $\frac{1}{20}$ Proz. Glukose, Rohrzucker, Stärke, Mannit, Natrium- und Calciumazetat, Pepton, Tyrosin, Asparagin

¹⁾ OSTWALD giebt die Formel :



Dagegen soll die Zerlegung des Anhydrids exothermisch sein und stattfinden nach:



(W. OSTWALD, Allg. Chemie, 2te Aufl. Bd. 2, Th. 1, Pag. 143, 1893). Hier findet sich bei OSTWALD ein Druckfehler.

veranlassen mehr oder weniger starkes Wachstum und Verlust des Nitrationsvermögens.

Ist die Concentration der gelösten organischen Substanzen noch viel geringer, verwendet man z.B. nicht ausgelaugten Agar, übrigens ohne jeden weiteren Zusatz, so kann bei dichter Aussaat das Nitratferment anfangs wachsen und später dennoch nitratieren, welcher letzterer Vorgang, wie wir gesehen, erst anfangt, wenn die für das Wachstum verbrauchten gelösten organischen Substanzen verschwunden sind. Das kann aber Monate dauern und manche Versuche misslingen gänzlich.

Ich schliesse noch aus folgendem Umstande, dass das Nitratieren auch bei den Reinkulturen erst dann beginnt, wenn die löslichen organischen Stoffe völlig verschwunden sind. Die kürzeste Zeit, worin ich 0,1 Proz. Natriumnitrit oxydieren konnte war drei bis vier Tage. Dazu musste aber eine sehr grosse von einer Kulturplatte herkünftigen Bakterienmenge in eine sehr kleine Menge der Nitritlösung gebracht werden, und die dazu verwendeten Bakterien müssen auf der Platte, wovon sie hergenommen werden, völlig aktiv sein. Es stellte sich nun heraus, dass so lange die Kolonien oder Impfstriche auf der Platte noch im Wachstum begriffen waren, das davon genommene Material erst nach viel längerer Zeit, z.B. nachdem es zwei bis drei Wochen in der Lösung verweilt hatte, das Nitrit völlig oxydierte, woraus hervorgeht, dass die noch in den Bakterienleibern angehäuften Nährsubstanzen zuerst aufgebraucht werden müssen, ehe Nitratation möglich ist. Nitratation und Wachstum scheinen also unter allen Umständen Funktionen zu sein, welche einander ausschliessen. Dieser Fall steht im Mikrobenleben nicht vereinzelt, doch wird auch bei anderen Oxydationsvorgängen beobachtet, z. B. bei der Melaninbildung aus Tyrosin durch *Actinomyces tyrosinaticus*, welcher Vorgang nur dann kräftig stattfindet, wenn das Wachstum der Kolonien vollständig aufhört.

Wie lange eine solche Oxydation dauern kann, der offenbar stattfinden muss ohne Vernichtung, oder vielleicht richtiger, ohne Regeneration lebender Substanz, ist unbekannt. Nach Analogie mit den enzymatischen Vorgängen wird diese Zeit nicht lange sein und also auch das Nitratferment unter diesen Bedingungen seine Funktion nicht lange fortsetzen können. Es muss aber als

möglich betrachtet werden, dass in der Natur, in ein und demselben Bakterienkörper, lokalisiert an verschiedenen Stellen, Regeneration der bei den Oxydation verschwindenden lebenden Substanz, und, die durch andere Molekülgruppen dieser Substanz bewirkten Oxydation neben einander zustande kommen können.

Volständig umgewandelter Dünger bringt das Nitrationsvermögen nicht zum Verschwinden. Dagegen führen aus Pflanzen, gepresste Säfte, selbst bei starker Verdünnung, die oligotrophe in die polytrophe Form über, was unter gewissen Bedingungen auch im Boden vorkommen können.

Natriumhumat, selbst in grosser Concentration in Platten oder Nitritlösungen gebracht, beeinträchtigt die Nitrations nicht.

Auch Paraffinöl wird gut vertragen, obschon dadurch der Eintritt des Vorganges verzögert wird, vielleicht durch im Paraffinöl vorhandene Verunreinigungen.

5. Unterscheidung des Nitratermentes von *Bacillus nitroxus* und *Actinobacillus*.

Auf bessere Nährböden wachsen das Nitraterment und *Bacillus nitroxus* gleich gut und geben darauf, bei 25° à 30° C. in 2 Tagen deutliche Kolonien. Verwendet man als Kulturboden Agar in Leitungswasser mit $\frac{1}{20}$ Proz. Pepton siccum und eine Spur Kaliumfosfat (oder auch gewöhnlichen Bouillonagar, welcher jedoch kein deutlicheres Resultat giebt), so erkennt man das Nitraterment leicht an die anfangs trockenen, wie Kahmpilz aussehenden Kolonien, welche erst nach mehreren Tagen glänzend feucht werden. Vom Anfang an ist der Rand dieser Kolonien mehr oder weniger unregelmässig ausgeschnitten oder gelappt, während ihre Oberfläche anfangs glatt, später, beim Feuchtwerden, sich mit radialen Leisten oder Rippen bedeckt. Bis zum Ende bleiben die Kolonien flach und dünn und können eine sehr beträchtliche Ausdehnung erlangen. Auf Bouillongelatine sind dieselben ebenfalls sehr charakteristisch durch ihre anfangs gekörnte, rohe und „trockene“ Oberfläche. Später verändert sich dieses Bild, weil dann eine starke Verflüssigung der Nährgelatine stattfindet.

Die *Nitroxus*-kolonien sind unter diesen Bedingungen sofort daran kenntlich, dass sie vom Anfange an, als kleine, feuchte, runde, wenig abgeflachte Massen auf den Platten vorkommen.

Sie bleiben viel kleiner wie die Nitratkolonien, und, wenn mit letzteren in Berührung, werden sie von diesen überwachsen und bedeckt, gleich wie der Nährboden selbst. Beim längeren Aufbewahren entstehen Sporen, was beim Nitratferment nicht stattfindet. Uebrigens ist das mikroskopische Bild der beiden, so weit verschiedenen Arten, sehr ähnlich: äusserst kleine meistens unbewegliche Stäbchen, welchen jedoch die Fähigkeit Schwärmer zu bilden nicht völlig fehlt. Auch *Nitroxus* verflüssigt schliesslich die Kulturgelatine sehr kräftig. Einzelne *Nitroxus*-stämme besitzen das Vermögen zu denitrifizieren, welche Eigenschaft bei der Ueberimpfung aber verloren gehen kann. Bei der Aussaat auf für Nitratation geeignete Böden, arm an organische Nahrung, entwickelt *Nitroxus* sich zwar wenig, jedoch auf ähnliche Weise, wie bei besserer Ernährung und ist dann zwischen und in den sich seitlich viel stärker ausbreitenden Nitratkolonien leicht zu erkennen. In diesem Falle können auch die früher genannten, in den Rohnitrationen so häufigen *Actinobacillus oligocarophilus* und *A. paulotrophus* zur Entwicklung gelangen; dieselben sind jedoch sofort durch die schimmelartig, schneeweisse Farbe ihrer Kolonien kenntlich und leicht von den glasartig durchsichtigen Nitratkolonien zu unterscheiden. Bei besserer Ernährung ist *A. oligocarophilus* eine nur langsam, zu kleinen feuchten Kolonien sich entwickelnde Art, welche durchaus nicht mehr an den Kahmpilzartigen oligotrophen Zustand erinnert. *A. paulotrophus* habe ich auf keinen einzigen guten Nährboden zur Entwicklung bringen können.

Bisher erkannte ich nur eine einzige nitratierende Art. Das mag jedoch Folge des Umstandes sein, dass ich nur mit Böden aus dem Laboratoriumsgarten zu Delft Versuche anstellte. Weil ich aber mit gesonderten Beeten von Ton, Gartenerde, Sand und Moor arbeitete, welche erfahrungsgemäss sehr verschiedene Mikrobenfloren enthalten, und mit allen das gleiche Resultat erhielt, dürfte das Nitratferment sehr gleichmässig sein und auch anderswo in derselben Form vorkommen wie hier.

Die hierbeigegebenen Bilder (Fig. 1 und 2 Taf. VII) sollen die Unterscheidung von *B. nitroxus* und dem Nitratferment erleichtern. Die übrigen für die Rohnitrationen charakteristischen Arten sind so leicht kenntlich, dass es nicht nötig erschien dieselben abzubilden.

Es scheint mir aber nicht überflüssig an dieser Stelle eine Recapitulation zu geben von den, in den Rohnitrationen hier in Delft stets vorkommenden Bewohnern, welche auch nach wiederholten Ueberimpfungen standhalten und deshalb, im Gegensatz zu der accidentellen (wozu z.B. die so merkwürdigen roten und braunen Pigmentbakterien gehören), als „Haupt-Flora“ bezeichnet werden können. Dazu gehören:

Erstens, Nitrobacter oligotrophum → *Nitrobacter polytrophum*, das Nitratferment selbst.¹⁾ Im nitratierenden, meist unbeweglichen Zustand als *N. oligotrophum*, im saprophytischen oft beweglichen nicht nitratierenden Zustand, als *N. polytrophum*, zu bezeichnen. Die beiden Formen müssen als physiologische Arten bezeichnet werden und verhalten sich zu einander als Modifikationen und nicht als Mutationen. Der Uebergang findet, wie der Pfeil andeutet, nur in eine Richtung statt.

Zweitens, Bacillus nitroxus. Sehr kleine sporenerzeugende meist unbewegliche Stäbchen, welche nicht nitratieren, übrigens in ihren Lebensbedingungen dem Nitratferment ähnlich und davon schwer zu trennen sind. Einige Varietäten zeigen Denitrifikation.

Drittens, die Gattung Actinobacillus, welche zu der Familie der Actinomyceten gehört und deshalb typisch unbeweglich ist. Unterscheidet sich von der von NEUMANN und LEHMANN aufgestellten Gattung *Mycobacterium* durch das vollständige Fehlen der Verzweigung, sodass man nur Stäbchen oder Fäden findet. Erzeugt die charakteristische treibende „Kahmhaut“ auf der Oberfläche der nitrifizierenden Flüssigkeiten. Darin finden sich zwei Arten nämlich:

a. *Actinobacillus oligocarbophilus*, welche sich ernähren kann von den Kohlenstoffverbindungen der atmosferischen Luft und dann das „Kahmpilzmerkmal“ zeigt; andererseits auf den verschiedensten organischen Nährböden wächst ohne das „Kahmpilzmerkmal“. Letzterer Zustand auf Kieselplatten zurückgeimpft zeigt das „Kahmpilzmerkmal“ wieder.²⁾ Doch kann das Merkmal

¹⁾ In meiner Mitteilung in der Akademie der Wissenschaften zu Amsterdam, Bd. 23, Pag. 1163, 28 März (10 April) 1914, habe ich das Nitratferment, wegen seiner Beweglichkeit *Nitribacillus* genannt. Doch scheint es mir gegenwärtig, dass der von WINOGRADSKY eingeführte Name *Nitrobacter* bleiben kann.

²⁾ Diesen Tatbestand habe ich in meiner, in voriger Note, genannten Mitteilung etwas anders und nicht ganz richtig vorgestellt.

verloren gehen durch lange fortgesetzte saprophytische Lebensweise. Verflüssigt Nährgelatine nicht.

b. *Actinobacillus paulotrophus*. Erzeugt auf den nitratierenden Platten schimmelartige Kolonien mit „Lufthyphen“; besteht jedoch mikroskopisch anscheinend aus gleichartigen Stäbchen und Fäden. Wächst durchaus nicht bei Gegenwart organischer Substanz.

Viertens, die Gattung *Actinomyces*, wovon verschiedene Arten, in geringer Anzahl in den „Kahmhäuten“ von *Actinobacillus* vorkommen können, daraus jedoch bei den Ueberimpfungen bisweilen gänzlich verschwinden.

6. Kann das Nitratferment Kohlensäure reduzieren?

Die höchst auffallende Tatsache, dass das Nitratferment nur dann funktioniert, wenn gelöste organische Stoffe so vollständig wie möglich fehlen, führt, wie von selbst zur Hypothese, dass die bei der Nitritoxydation freikommende, nicht unbeträchtliche Energiemenge, nämlich 184 Kalorien nach der Formel



vielleicht für die Reduktion atmospherischer Kohlensäure, also zur Chemosynthese dienen könnte. Beweise dafür habe ich bisher jedoch nicht finden können

Kultiviert man das Ferment in Nährlösungen, so bleiben diese gänzlich klar, nur mit dem Mikroskop findet man, besonders an der mit einer äusserst, dünnen Schleimlage bekleideten Glaswand viele sehr kleine Bakterien. Die Masse dieser letzteren ist so gering, dass ein einzelnes Sonnenstäubchen, z.B. ein Fädchen Wolle oder Baumwolle in die Kulturflüssigkeit gefallen, eine Million derselben repräsentieren kann.

Auf Kieselplatten, gesättigt mit Lösungen von 0,1 Proz. à 0,05 Proz. Natriumnitrit und 0,01 Bikaliumfosfat, bildet das Nitratferment erst mit der Lupe deutlich sichtbare, jedoch sehr aktive Kolonien, desto kleiner, aber nicht weniger aktiv, je vollständiger man gelöste organische Körper aus der Platte fernhält. Dass für das geringe Kohlenstoffbedürfniss, welches

¹⁾ W. OSTWALD, Allg. Chemie, 2^e Aufl. Bd. 2, Th. 1, Pag. 145, 1893.

hierbei in Betracht kommt, eine genügende Menge organisches Material als Verunreinigung in den Platten gegenwärtig ist, erscheint durchaus nicht unmöglich.

Sollten die organischen Verunreinigungen der Platte dazu nicht ausreichen, so zeigt das kräftige Wachstum der Oligocarbo-philushäute auf der Oberfläche der nitratierenden Flüssigkeiten, sowie der Rohnitrifikationen im allgemeinen, dass die Atmosphäre, wenigstens für deren Wachstum, genügend gebundenen Kohlenstoff liefern kann.

Werden solche Rohkulturen auf Kieselplatten ausgesät, welche, so vollständig möglich von löslichen organischen Körpern befreit sind, so wachsen, neben den immer sehr klein bleibenden Kolonien des Nitratfermentes, diejenigen der genannten Arten als schneeweisse, trockene Platten (*A. oligocarbo-philus*), oder als kleine, schimmelartige, sehr zarte Pölsterchen (*A. paulotrophus*), welche nach einigen Wochen, wenigstens was *A. oligocarbo-philus* betrifft, hundert oder tausendmal grösser werden können, wie die daneben liegenden Kolonien des Nitratfermentes. Da es nun feststeht, dass weder *A. oligocarbo-philus* noch *A. paulotrophus* imstande sind Nitrite zu oxydieren und deshalb keine Chemosynthese ausüben können, müssen diese Arten in ihrer Umgebung organisch gebundenen Kohlenstoff in genügender Menge vorfinden um damit ihrem, nicht so besonders kleinem Bedürfnis an dieses Element Genüge leisten zu können. Hieraus folgt jedoch mit Notwendigkeit, dass das so viel weniger bedürftige Nitratferment bei diesen Bedingungen dann doch auch sehr wohl eine genügende Nahrung an organisch gebundenen Kohlenstoff in der atmosphärischen Luft muss finden können. Allerdings ist es noch unsicher von welcher Natur die hier in Betracht kommenden Substanzen sind. Vielleicht handelt es sich dabei um Kohlenwasserstoffe, deren Gegenwart in geringer Menge in der Luft festgestellt ist. Die in meiner oben genannten Abhandlung ¹⁾ zitierte Ansicht von HENRIET, dass es sich dabei um Alkylaminen handeln sollte, dürfte aber wenig wahrscheinlich sein. Jedenfalls konnte ich mit Formamid nichts erreichen; ebenso wenig mit Ammonformiat und Hexamethylentetramin.

Andererseits muss es auch als möglich betrachtet werden, dass

¹⁾ Centralbl. f. Bakteriologie, 2^{te} Abt. Bd. 10, Pag. 38, 1903.

flüchtige Stoffwechselprodukte anderer Mikroben dem Nitratferment zur Ernährung dienen können.

Ueberblicken wir das Vorgehende noch einmal, so ergibt sich, dass, wenn wir das Nitratferment, welches nur erblich stabil ist bei Gegenwart von Spuren von löslichen organischen Nährsubstanzen mit den Namen *Nitrobacter oligotrophum* bezeichnen, daraus, bei besserer Ernährung, z.B. mit Bouillon, eine scheinbar gewöhnliche, schwach bewegliche, stark wachsende saprophytische Bakterie hervorgeht, mit sehr charakteristischen Eigenschaften welche *Nitrobacter polytrophum* genannt werden kann. Dieser Vorgang ist nicht umkehrbar, das heisst, bei Laboratoriumsversuchen gelingt es nicht die Umwandlung



zu stande zu bringen.

Wie man sieht handelt es sich dabei um *physiologische Artbildung*, und wenn man sich abfragt, wo diese in das System der Biologie unterzubringen ist, so kommt man zu folgendem Schlusse.

Ein Beispiel von Mutation, so wie ich diese für viele Mikroben, beschrieben habe, ¹⁾ kann est nicht sein, denn die erblich mehr oder weniger stabilen Produkte des Mutationsprocesses entstehen neben der Hauptform und bestehen neben dieser, unter den verschiedensten Ernährungsbedingungen weiter fort.

Allein es handelt sich dabei um ein neues und besonders auffallendes Beispiel *erblich stabiler Modifikation*, nur durch die Deutlichkeit verschieden von dem Virulenzverlust bei vielen pathogenen Mikroben; vergleichbar mit der essentiell einseitig stattfindenden, nicht umkehrbaren Ontogenese der höheren Pflanzen und Tiere, deren Folge wir kennen in der Zellendifferenzierung. Die verschiedenen, bei der Ontogenese entstehenden Zellenformen, woraus schliesslich die erwachsenen Pflanzen und Tiere aufgebaut sind, müssen als Modifikationen der ursprünglichen embryonalen Zelle aufgefasst werden; dass auch sie unter Umständen mehr oder weniger erblich stabil sind, lässt sich in vielen Fällen zeigen. Ich erinnere in dieser

¹⁾ Folia Microbiologica, Bd. 1, Pag. 1, 1912.

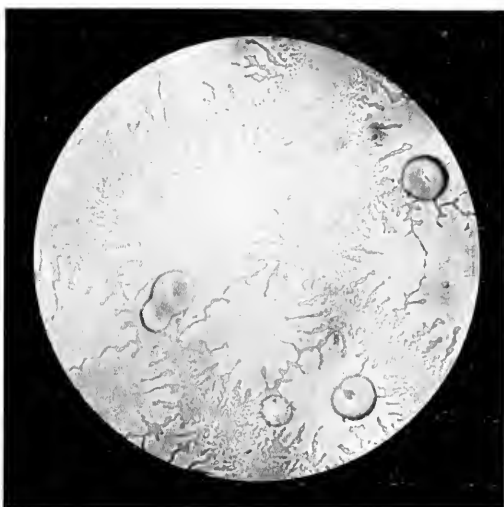


Fig. 1 (37). Nitratferment und *B. nitroxus* auf Nitritagar.

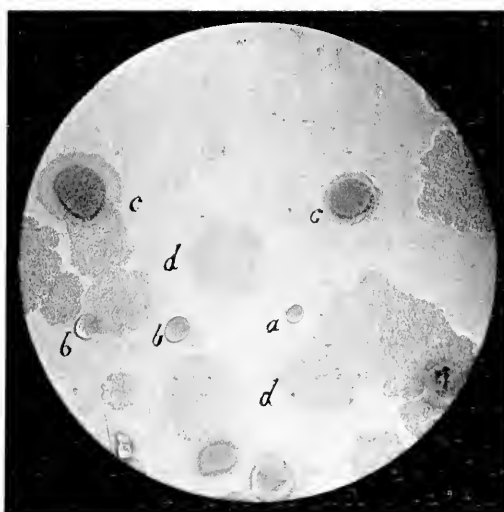


Fig. 2 (37). Nitratferment (*c, d*) und *B. nitroxus* (*a, b*) auf Fleischbouillongelatine.

Beziehung an die Wachstumsverhältnisse der Epidermiszellen der Tiere und der Korkzellen der Pflanzen, welche sich fortwährend aus ihren Mutterzellen regenerieren. Künstlich sind embryonale Bindegewebezellen und Muskelzellen des embryonalen Herzens, während einer Reihe von Generationen in Blutplasma, ohne sich zu ändern, reproduziert bei den Versuchen von CARREL.

Es muss allerdings anerkannt werden, dass es sehr schwierig, wenn nicht unmöglich ist, Mutation und erblich stabile Modifikation in allen Fällen scharf von einander zu unterscheiden. Diese beide Vorgänge fliessen derweise zusammen, dass man manchmal in Zweifel verkehrt, wie ein Entwicklungsprozess, wobei eine neue Entwicklungsrichtung eingeschlagen wird, bezeichnet werden muss.

Ich meine aber, dass, im Falle des Nitratermentes die Verhältnisse deutlich sind, und niemand bestreiten wird, dass der Uebergang „oligotroph“ zu „polytroph“ wirklich als Modifikation zu betrachten ist. Es muss aber bemerkt werden, dass der Modifikationsbegriff zwei verschiedene Begriffe umfasst, welche bisher nicht durch bestimmte Worte angegeben werden, nämlich umkehrbare und nicht umkehrbare Modifikation. Damit parallel im Mutationsbegriff wären Mutation mit und ohne Atavismus. Es ist aus dem Vorgehenden klar, dass beim Nitraterment nur nicht umkehrbare Modifikation stattfindet. Hierin liegt auch eine Verschiedenheit dieses Vorganges mit der Pleomorphie vieler Pilze, welche übrigens an die physiologische Artbildung beim Nitraterment erinnert.

FIGURENERKLÄRUNG ZU TAFEL VII.

Fig. 1 (37). Kolonien des oligotropen Nitratermentes, *Nitrobacter oligotrophum*, und von *Bacillus nitroxus* auf Nitritagar. Die grossen, dendritisch verzweigten Kolonien sind das Nitraterment, die runden, kleinen *B. nitroxus*.

Fig. 2 (37). Kolonien des umgewandelten, polytrophes Nitratermentes, *Nitrobacter polytrophum*, und *Bacillus nitroxus* auf Bouillongelatine. Die grossen, körnigen Kolonien (*c, d*) sind das Nitraterment, zwei davon (*c, c'*) fangen an die Gelatine zu verflüssigen; die kleinen, runden Kolonien (*a, b*) sind *B. nitroxus*, im noch nicht verflüssigenden Zustande.

EINE SPROSSLOSE FORM VON DEMATIUM
PULLULANS DE BARY UND EINE STERILE
ZWERGFORM VON PHYCOMYCES
NITENS AGARDH.

VON

Dr. S. L. SCHOUTEN — *Utrecht* 1).

I.

In einer Petrischale mit Glucose-Pepton-Agar folgender Zusammenstellung: Glucose techn. 5 ‰, Pepton Witte $\frac{1}{2}$ ‰, Monokaliumfosfat $\frac{1}{10}$ ‰, Magnesiumsulfat $\frac{1}{20}$ ‰, welche ich zum Auffangen von Luftkeimen aufgestellt hatte (und der ich 1 ‰ Kupferazetat zu einem bestimmten Zweck, der mit der folgenden Untersuchung nichts zu machen hat, beigefügt hatte), entwickelten sich verschiedene Kolonien, welche aus gegliederten Hyphen und Hefezellen bestanden. Aus einer davon impfte ich nach einigen Tagen auf gewöhnlichen Glucose-Pepton-Agar (d. h. ohne Kupferazetat) über. Aus der darauf entstandenen Kultur isolierte ich unter dem Mikroskop eine Zelle. Die daraus entstandene Kolonie (also bestimmt eine Einzell-Kultur) ist der Ausgangspunkt der hier folgenden Untersuchung.

Indem ich für eine weitläufigere Beschreibung nach früheren Publikationen verweise 2), will ich hier jedoch mit wenigen

1) Nach einem in der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie am 8 Juli 1912 gehaltenen Vortrage.

2) Siehe u. A.: »Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle« in »Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik. Bd. 22 (1905) S. 10 ff. Verbesserungen dieser Methode findet man in den Sitzungs-Berichten der Königl. Akademie der Wissenschaften zu Amsterdam; Naturw. Abteilung, 24 Dec. 1910.

Worten sagen, dass für das Isolieren einer einzigen Zelle (Bakterie, Hefezelle, u. s. w.) unter dem Mikroskop, das Material in einen hängenden Tropfen an der Unterseite eines Deckgläschens gebracht wird, während diesem Tropfen gegenüber sterile Tropfen, worin die Reinkultur entstehen soll, angebracht sind. Mit Hilfe einer feinen, am Ende in ein Auge umgebogenen Glasnadel, welche durch einen einfachen Mechanismus verstellt wird, kann man jetzt eine einzige Zelle, unter Kontrolle der stärksten Vergrößerung, aus diesem Tropfen isolieren und in einen der sterilen Tropfen hinüberbringen.

Uebergeführt in ein gewöhnliches Kulturröhrchen mit Glucose-Pepton-Agar, hatte obengenannte Kultur nach 4 Tagen das Aussehen einer Hefekultur, gelbweiss von Farbe (Fig. 1). Mikroskopisch untersucht, sah ich, dass sie bestand aus Hefezellen, umsäumt durch einen Rand von Hyphen (Fig. 2). Einige Zeit später zeigten sich darin braune Flecke, und bisweilen ein brauner Rand (Fig. 3 und 4), und nach 3 Monaten hatte die Kultur die Gestalt von Fig. 5: ein flacher Teil, schmutzig rosa gefärbt, aus losen Hefezellen bestehend, und dicke schwarze Krusten, gebildet durch dunkelbraune Zellen, die Fetttropfen enthielten (auch etwa wie in Fig. 4). Die Vermutung, dass ich hier *Dematium pullulans* vor mir hatte, war hierdurch ein Gewissheit geworden.

Ueber diesen Pilz, mit dem schon viele Untersucher sich beschäftigt haben, besteht keine Uebereinstimmung, weder über den Platz, der ihm im System zukommt, noch was sein Verhalten bei verschiedenen Kulturbedingungen betrifft. BREFELD ¹⁾ teilt ihn bei *Sphaerulina intermixta* ein, eine Auffassung, die von Anderen bezweifelt wird. Für eine Verwandtschaft mit Hefe sind noch keine stichhaltigen Gründe angebracht. SEILER ²⁾ behauptet sogar, dass man die Hefezellen mehrere Decennien hindurch kultiviert haben müsste, ohne dass sich Myzelium gezeigt hätte, und sich wohl Endosporen gebildet hätten, um das Recht zu haben, eine solche Verwandtschaft als sicher anzunehmen.

¹⁾ »Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie«, 1891, Heft 10.

²⁾ »Studien über die Abstammung der Saccharomyceten« im »Centralblatt für Bakteriologie«. II Abt. 1896. S. 321.

Nach LOEUW ¹⁾ entwickelt sich eine weisse Konidie (so werden wir die Hefezellen nennen) unter günstigen Bedingungen immer zuerst zu einer Hyphle mit Seitenzweigen, welche Konidien hervorbringen, während die Konidien der zweiten Generation sich dann allein durch Sprossung vermehren.

Ich selbst fand meistens das gleiche, aber doch auch wohl, dass eine Konidie sich unter denselben günstigen Umständen zu einer einfachen oder einer doppelten Riesenzelle (Fig. 6) entwickeln kann, welche dann wieder Konidien abschnürt, während bisweilen selbst das Aufschwellen zu einer Riesenzelle unterbleibt. Die braunen Zellen in älteren Kulturen weichen in dem von mir untersuchten Stamm in so fern ab von dem was andere Untersucher bei *Dematium pullulans* aufgeben, dass die runde Gemmen meistens vereinzelt, und beziehungsweise wenig in Ketten vorkamen. Die braunen Zellen können, nach früheren Untersuchern, zu Hyphen entkeimen, welche dann Konidien abschnüren, oder auch gleich Konidien erzeugen ²⁾. Das Erstere solle dann geschehen bei guter, das Letztere bei geringer Nahrung. Ich fand auch Beides, aber unabhängig von der Nahrung. Abweichungen dürften hier auch übrigens nicht befremden. Mit Recht sagt ZOPF ³⁾ — und das gilt auch noch jetzt —: „Wahrscheinlich sind unter dem, was man gewöhnlich *D. p.* nennt, mehrere Spezies versteckt“.

Ich stellte mir folgende Fragen:

1. Was passiert, wenn man in der gewöhnlichen Weise aus dem flachen, schmutzig rosa gefärbtem Teil überimpft? Man bekommt dann eine Kultur, welche nach 6 Tagen noch weiss aussieht und aus Konidien und wenigen Hyphen besteht, aber nach 1 oder 2 Wochen schon schwarze Flecken zeigt — also die schon besprochene Kultur von Fig. 1, 3 und 5.

2. Was passiert, wenn man in der gewöhnlichen Weise aus einer schwarzen Kruste überimpft? Dasselbe; die schwarzen Flecken werden aber später zahlreicher wie im vorherigen Falle.

3. Was passiert, wenn man eine Konidie aus dem rosa Teil isoliert? Ich brachte isolierte Zellen über in Tropfen flüssiger

¹⁾ »Ueber *Dematium pullulans* DE BARY« in »Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik«, VI. S. 468—471.

²⁾ LAFAR, »Handbuch der technischen Mykologie« IV S. 277.

³⁾ »Die Pilze« S. 480.

Glucose-Pepton, und liess die Entwicklung bei 25° C. stattfinden. Man bekommt dann, wie ich sagte, Konidien von sehr verschiedener Grösse und Gestalt (Fig. 6), oder ein Myzelium. Wenn man nun hieraus wieder entweder Hyphe-Fragmente oder grössere und gewöhnliche Konidien isoliert, so bekommt man immer eine Kultur wie sub 1, eine Kultur also, die Konidien erzeugt.

4. Was passiert, wenn man eine dunkle Zelle aus einer schwarzen Kruste isoliert? Nach dem was ich hieroben mitteilte, würden sich dann auch immer Konidien entwickeln, entweder aus einem zuerst gebildeten Myzelium oder unmittelbar. Wenigstens, keiner der Untersucher, welche sich mit *Dematium pullulans* beschäftigt haben, haben je etwas anderes beobachtet. Wenn ich aber Zellen einer bestimmten Gestalt auswählte, und diese isolierte, fand ich eine merkwürdige Abweichung. Einige braune Zellen, unter vollkommen normalen Bedingungen kultiviert, lieferten eine makroskopisch völlig abweichende, konidienlose Myzeliumform, die, unter welchen Bedingungen auch kultiviert, nie Konidien abschnürt, und sich jetzt während 3½ Jahre als constant erwiesen hat.

Um diese braune Zellen zu isolieren, muss man von der Oberfläche vorsichtig ein wenig Material abkratzen und dieses in einen Tropfen steriler physiologischer Kochsalz-Lösung bringen. Es wird danach mit einem flambierten Glasstäbchen gerieben. Selbst nach längerem Drücken mit dem Stäbchen findet man noch wenige lose Zellen, welche isoliert werden können um die Myzeliumform zu liefern.

Ich fing an mit einer Einzell-Kultur, die 3½ Monat alt war, zu arbeiten, und isolierte daraus (Fig. 7) 8 Zellen, jede Zelle in einen Tropfen Glucose-Pepton, und zwar No. 1—4 auf einem Gläschen, No. 5—8 auf einem andern. Die Gläschen wurden auf feuchte Kammern gelegt, welche bei 25° C. gesetzt wurden. Nach 24 Stunden zeigte sich die merkwürdige Erscheinung, dass 4 Zellen (Fig. 7, No. 1, 3, 5 und 8) zu einem kleinen Myzelium entkeimt waren, welches aber angefangen hatte Konidien abzuschnüren, während aus 3 Zellen (Fig. 7, No. 2, 4 und 7) ein Myzelium entstanden war, das *keine* Konidien abschnürte (Fig. 8). Eine Zelle — eine Seltenheit bei diesem Material — war nicht entkeimt. Nach 42 Stunden

waren diese letzten 3 Myzelien so stark gewachsen, dass sie schon aus dem Tropfen herauswuchsen. Darauf wurde aus allen Tropfen in Röhrrchen mit Glucose-Pepton-Agar geimpft. Schon nach 2 Tagen stellte sich heraus, dass 1, 3, 5 und 8 sich wie eine gewöhnliche *Dematium*-kultur entwickelten, während 2, 4 und 7 sich als ein dicker Myzeliumpfropfen mit aufrecht stehenden kurzen Hyphenbündeln entwickelten. Nach 6 Tagen war es eine Scheibe, fast so hart wie Knorpel (Fig. 9), welche nur aus Hyphen bestand, die am Rande etwas länger ausliefen und im Zentrum kurz und gekrümmt waren. Wenige Tage später beginnt die Kultur zu verschrumpfen (Fig. 10). Nach einigen Monaten ist sie schwarz (Fig. 11), an der Oberfläche grobkörnig, und ganz verschrumpft; sie besteht dann aus braunen und weissen Hyphen von grilliger Form (Fig. 12).

Später zeigt sich auf einer alten Kultur bisweilen noch eine weisse oder graue sehr dünne watte-ähnliche Schicht, aus weissen Hyphen von Zellen mit grossen Vacuolen geformt. Das Myzelium produziert Oel.

Wenn man diese Kultur auf festem Boden in eine Lösung von Glucose-Pepton überbringt, entweder in Röhrrchen, oder in Kolben, bleibt das Myzelium sprosslos; ebenfalls wenn man gleich die entkeimende Zelle in Flüssigkeit überbringt. Immer sinkt das Myzelium teilweise auf den Boden, während ein anderer Teil eine Decke formt. Später wird alles schwarz, wie bei Kulturen auf festem Substrat. Gelatine wird verflüssigt.

Auch auf anderen Nährböden bleibt diese Form sprosslos, wie sich aus Kulturen auf Sabouraud-Agar (Glucose 4% Pepton 2%) Malzagar, Hefeextract 20% + Glucose 7½%, Brot, Kokosnuss, Banane, Agar 1½% auf Leitungswasser, erwiesen hat.

Diese Versuche wurden, wie gesagt, genommen mit einer Kultur, welche aus einer einzigen unter dem Mikroskop isolierten Zelle entstanden war. Später wurden sie mit einer 4 Monate alten Kultur desselben Stammes wiederholt. Es wurden die Zellen von Fig. 13 isoliert. Davon lieferten No. 1—3 die Konidienform, No. 4—6 die Myzeliumform.

Wenn man die Form und die Masze der Zellen welche die Myzeliumform geben, nachgeht, wird man bemerken, dass sie fast alle dem mehr länglichen Typus angehören. Wenn man

diejenige Zellen länglich nennt, deren Länge wenigstens $2\frac{1}{2}$ mal grösser ist wie die Breite, sieht man, dass von 7 Zellen, welche die Konidienform liefern, 6 nicht länglich sind und 1 länglich, indem von den 6 Zellen welche die Myzeliumform liefern, 5 länglich sind und 1 nicht länglich. Diese Tatsache brachte mich zu der Frage, weil längliche Zellen hier *meistens* aus Hyphen herkommen, ob es nicht die Zellen der braunen Hyphen sein könnten, welche die Myzeliumform geben, indem die braunen Zellen, welche vom Anfang ab lose in der Kultur vorkommen, oder vor dem Braunwerden als Konidien an den Hyphen entstanden sind, und die *meistens* einen mehr isodiametrischen Form haben, die Konidienform geben könnten.

Es ist mir nicht gelungen dem Zusammenhang dieser Zellen während des Wachsens der Kultur zu folgen. In einem mikroskopischen Praeparat, verfertigt aus einer ausgewachsenen, einige Monate alten Kultur ist dies selbstverständlich noch weniger zu entscheiden. Da liegen alle Zellen mehr oder weniger verwirrt durch einander. Aber doch hat diese Annahme wohl eine gewisse Wahrscheinlichkeit bekommen durch die folgenden Isolierungsversuche. Aus einer 25 Wochen alten Kultur isolierte ich 4 Zellen, und aus derselben, nur 2 Wochen älteren Kultur, wiederum 4 Zellen, welche alle zu dem mehr isodiametrischen Typus gehörten und jedenfalls den Eindruck machten, dass sie nicht aus Hyphen entsprossen waren. Sie lieferten alle die Konidienform. Aus einer andern, 19 Wochen alten Kultur isolierte ich 3 ganze Hyphen, und Stücke, wovon es einigermassen zweifelhaft sein konnte, ob sie von Hyphen herstammten, welche alle die Myzeliumform gaben, und weiter eine zusammenklebende Masse Konidien und eine einzelne Konidie, welche beide die Konidienform gaben.

Obgleich bei gewissenhafter Arbeit die Möglichkeit der Luftinfektion ausserordentlich klein ist, hat man damit doch immer zu rechnen. Ich meinte deshalb, dass ich diese Versuche nicht alle mit einer einzigen Kultur machen dürfte. Darum nahm ich für die letztbeschriebene Probe eine ganz neue Kultur, welche ich wiederum aus einer einzigen, unter dem Mikroskop isolierten, Konidie hatte entstehen lassen.

Ich habe auch nachgeforscht, ob die obenbeschriebene Abspaltung einer Myzeliumform bei jedem Dematiumstamm möglich

ist. Dazu wurden einige an verschiedenen Stellen aus der Luft aufgefangen, und eine davon erwählt, wovon die braunen Zellen in den schwarzen Flecken ziemlich übereinstimmten mit den Zellen des bis jetzt benutzten Stammes. Obgleich ich in derselben Weise arbeitete wie mit dem vorigen Stamm, habe ich daraus aber in keiner Weise eine Myzeliumform erzeugen können.

Einige wenige Worte will ich noch sagen über eine Erscheinung, worauf ich oben schon hingewiesen habe und die gewiss nicht allein bei *Dematium* vorkommt: die starken individuellen Unterschiede was das Entkeimen der Konidien, sowohl weisse als braune, betrifft. Man kann, wenn man den hier beschriebenen Fall der sprosslosen Myzeliumform ausschliesst, 4 Typen unterscheiden:

A. Es entwickelt sich aus der Konidie eine Hyphe, welche sich einigermassen verzweigt und sehr bald (nämlich innerhalb 24 Stunden) zum Abschnüren von Konidien übergeht.

B. Es entwickelt sich aus der Konidie eine Art Riesenzelle, welche gleich Konidien abschnürt.

Diese 2 Arten der Entkeimung kommen am meisten vor; viel seltener sind die folgenden Arten.

C. Es entwickelt sich ein Myzelium, das erst spät, d. h. nach 1 oder 2 Tagen, Konidien abschnürt.

D. Die Konidie schnürt gleich Töchterzellen ab.

Von einigen Untersuchern, u. A. DE BARY, wird angenommen, dass alles dieses unter Einfluss verschiedener Kulturbedingungen stattfindet. Je besser diese sind, desto mehr Möglichkeit für Entwicklung von Myzelium wäre vorhanden. Dem kann ich aber nicht beistimmen. In meinen Tropfenkulturen sah ich nämlich alle diese Formen unter gleichen Bedingungen durch einander entstehen. In einem Tropfen z. B., worin man 20 Zellen entkeimen lässt, können sich kurze und lange Hypphen entwickeln. Bringt man 4 Tropfen Glucose-Pepton auf ein Deckgläschen, und in jeden davon eine Konidie derselben Herkunft, dann kann der eine Tropfen ein sehr kräftiges Myzelium liefern, das Konidien erzeugt, ein anderer aber eine kurze Hyphe, woran Konidien entstehen, während in dem dritten gleich Zellen abgeschnürt werden.

Der Gedanke kam mir, ob hier vielleicht Erblichkeit bestehen könne, welche bei Ueberimpfung tausender Zellen zugleich

selbstverständlich unbemerkt bleibt, aber erst zu Tage kommt wenn man eine einzige Zelle isoliert. Um hier Sicherheit zu bekommen, wurde eine Anzahl Zellen in einen Tropfen gebracht, und, sobald sich eine zeigte, die nach dem Typus C. oder D. entkeimte,³ wurde diese isoliert. Es war aber keine Spur von Erbllichkeit zu sehen. Die Nachkommenschaft einer Zelle von Typus C. zeigte bei der Entkeimung eben so gut die 4 Typen wie die von Typus D.

Mit einer Kultur, abstammend von einem sehr stark entwickelten Myzelium, dass erst spät Konidien abschnürte (Fig. 14) — man könnte sagen: ein Mutant mit Neigung zu Sprosslosigkeit — habe ich noch probiert eine sprosslose Form zu bekommen, wie bei meinem ersten Stamm. Alle Bemühungen, u. A. das Abschneiden allerlei Teile des Myzeliums unter dem Mikroskop, und das Isolieren und weiter Kultivieren der abgeschnittenen Stücke, mislangten; immer kamen wieder Konidien, bisweilen nachdem die isolierte Hyphe erst Chlamydosporen geformt hatte.

Man könnte zum Schluss fragen, ob diese Untersuchung auch nicht möglich gewesen wäre mit der Methode der Plattenkultur. Darauf antworte ich, dass hier für das Erlangen der sprosslosen Form immer längliche braune Zellen isoliert wurden, welche selten, selbst nach langem und intensivem Reiben, lose vorkommen, sondern meistens mit andern braunen und weissen Zellen verbunden bleiben. *Jetzt, wo es einmal bekannt ist, dass solch eine sprosslose Form erhalten werden kann*, und die Form der jungen Kultur, also der Kolonie, bekannt ist, würde man sie vielleicht isolieren können wenn man sehr viele dünn besäte Platten gösse. Für das *Entdecken* einer solchen Form, wenn man ihre Existenz nicht weiss oder selbst nicht vermutet, scheint mir die Plattenkultur-Methode jedoch nicht die gewünschteste.

Die Frage, ob die sprosslose Form selbstständig in der Natur vorkommt, ist schwer zu entscheiden. Vielleicht ist das so; vielleicht wird sie in dem einen oder anderen Laboratorium rein gezüchtet, ohne dass man etwas von Zusammenhang mit *Dematium* vermutet. Vielleicht auch wird sie immer von der Konidienform, worin sie also mehr oder weniger verborgen ist, überwuchert.

II

Aus einer Reinkultur von *Phycomyces nitens* + und —, welche Herr Prof. WENT, Director des hiesigen botanischen Instituts mir in liebenswürdiger Weise zur Verfügung stellte, isolierte ich Sporen zur Erlangung von Einzellkulturen. Fast alle Sporen zeigten die normale elliptische, einige aber eine bizarre Form. (Fig. 15). Ich isolierte auch einige von diesen letzteren, um zu untersuchen ob sie vielleicht eine abweichende Kultur geben würden. Dies schien mir nicht der Fall zu sein, nur mit einer Ausnahme. Eine Spore, aus einer — Kultur herstammend, und abgebildet in Fig. 15 No. 2 wurde, zugleich mit 3 normalen Sporen, auf demselben Deckgläschen isoliert; nach 24 Stunden war sie gekeimt; nach 48 Stunden wurde das sehr kleine Myzelium, und auch das Myzelium aus einer der gekeimten normalen Sporen, auf Röhrchen mit flüssiger Glucose-Pepton übertragen. Nachdem die Myzelien sich hierin in zwei Tagen gut entwickelt hatten, wurde auf festem Nährboden, auf Glucose-Pepton-Agar übergeimpft. Im Anfang wuchsen beide Myzelien darauf gleich schnell; danach produzierten beide niedrige Sporangien. Während diesen aber beim Myzelium der normalen Sporen lange, in den Wattlepfropfen des Röhrchens wachsenden Sporangien folgten, war dies nicht der Fall mit dem Myzelium der abnormalen Spore; dieses brachte somit nur niedrige Sporangien hervor. Der Unterschied blieb beim Ueberimpfen bestehen; viel grösser war er aber auf Brot, das für *Phycomyces* ein weit besserer Nährboden ist als Glucose-Pepton-Agar. Um die Sporangien in eine Lage zu bringen worin sie sich so hoch wie möglich entwickeln konnten, wurden zwei Bechergläser des höchsten Modelles mittels eines geeigneten, rinnenförmigen Verbindungsstückes umgekehrt auf einander gesetzt. 1) Dadurch wurde ein steriler Raum von \pm 13 cm. Durchmesser und 60 cm. Höhe gewonnen. Der Apparat wurde dann in eine an der Innenseite geschwärzte Schachtel gestellt, so dass das Licht nur von oben her einfallen konnte. Hierin erreichten, auf Brot als Nährboden,

1) Ich denke von diesem Apparat, der sich vorzüglich zum steril Züchten von — und Experimentieren mit hochaufwachsenden Pilzen und höheren Pflanzen eignet, später eine spezielle Beschreibung zu geben.

die Sporangienträger der normalen Stammform eine maximale Höhe von 37 cm, und die der Zwerggrasse eine von 15 cm. (Fig. 17). Ist dies schon ein auffallender Unterschied, noch merkwürdiger ist es mit den Sporangien gestellt. Das Sporangium der Zwergform ist meistens von einer feuchten Hülle umgeben, und enthält keine Sporen, sondern einen grobkörnigen, Fetttropfen führenden Inhalt (Fig. 16). Auch auf Brot bleibt dieser Unterschied beim Ueberimpfen bestehen. Ich habe darum die Zwergform *Phycomyces nitens* var. *nana sterilis* genannt.

Da 6 oder 7 Wochen sich wohl ungefähr als die Maximallebensdauer des Myzeliums erwiesen hat, tut man gut, alle 4 oder 5 Wochen überzupfen. Dazu werden — da dennoch mehrmals Parteien des Myzeliums abgestorben schienen — mehrere Stückchen aus verschiedenen Teilen des alten Nährbodens herausgenommen. Als die Zwergform so mehr als ein Jahr gezüchtet war, zeigten sich zwischen den sterilen Sporangien, einige normale. Darüber wird man sich nicht wundern, wenn man bedenkt, dass die Sporen von *Phycomyces* mehrkernig sind. Von 6—10 Kernen in der Spore, welche die sterile Zwergform lieferte, kann sehr gut einer noch die Eigenschaften der Stammform gehabt haben. Man vergleiche die Untersuchungen von BURGEFF ¹⁾, der aus einer Kultur von *Phycomyces* ein Myzelium bekam mit abnormal verdickten Sporangienträgern, das aber am Schluss der Vegetation wieder einige echte lange *Nitens*-Träger erzeugte, eine Erscheinung welche von BURGEFF auch mit Recht Heterocaryose zugeschrieben wird.

Es ist jetzt zwei Jahr her, dass ich in meiner Zwerggrasse zum ersten Mal einige normale Sporangien konstatierte; seitdem hat sich die Erscheinung sporadisch wiederholt, aber ohne das die normalen Sporangien verhältnissmässig zahlreicher wurden; mehrmals hatte ich Kulturen, worin ich sie gar nicht fand. Es scheint somit der Teil des Myzeliums mit den *Nanasterilis*-Kernen leicht die Ueberhand zu behalten.

¹⁾ H. BURGEFF: Ueber Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. Vorläufige Mitteilung. Ber. der deutschen bot. Ges. 1912 Bd. 30. p. 679.

FIGUREN-ERKLÄRUNG.

- Fig. 1—14. *Dematium pullulans*.
- Fig. 1—5. Normale Form von *Dem. pull.* Kultur auf Glucose-Pepton-Agar.
- Fig. 1. 4 Tage alt.
- Fig. 2. Mikr. Bild aus Fig. 1. 500 fach. Weisse Hyphen und Konidien.
- Fig. 3. 11 Tage alt.
- Fig. 4. Mikr. Bild aus Fig. 3. 500 fach. Weisse und braune Zellen und Zellenketten.
- Fig. 5. 13 Wochen alt.
- Fig. 6. Keimung von weissen Konidien. In 1 und 2 ist eine einfache, in 3 und 4 eine doppelte Riesenzelle geformt. In 5 hat die Konidie erst einen Myzelschlauch getrieben. 500 fach.
- Fig. 7. Isolierte braune Zellen, von denen No. 1, 3, 5 und 8 ein Konidien-abschnürendes Myzelium, No. 2, 4, und 7 ein sprossloses Myzelium lieferten.
- Fig. 8. Skizze dieser beiden Keimungsarten.
- Fig. 9—12. Sprosslose Form von *Dem. pull.* Kultur auf Glucose-Pepton-Agar.
- Fig. 9. 6 Tage alt.
- Fig. 10. 11 Tage alt.
- Fig. 11. 13 Wochen alt.
- Fig. 12. Mikr. Bild aus Fig. 11. 500 fach. Braune und weisse Hyphen von grilliger Form. Keine Konidien.
- Fig. 13. Isolierte braune Zellen, von denen No. 1—3 ein Konidien-abschnürendes Myzelium, No. 4—6 ein sprossloses Myzelium lieferten. 500 fach.

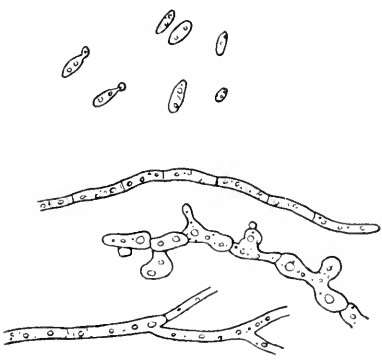
1.



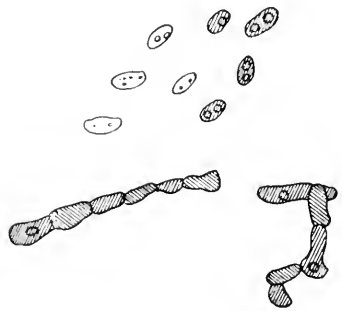
3.



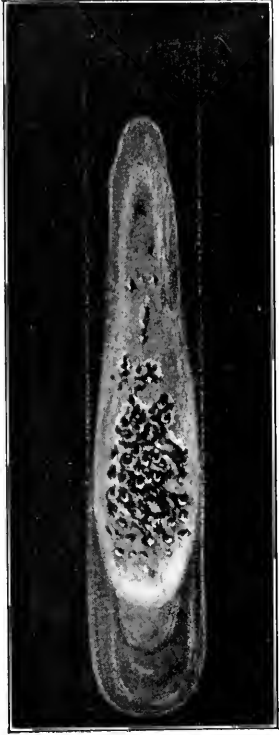
2.



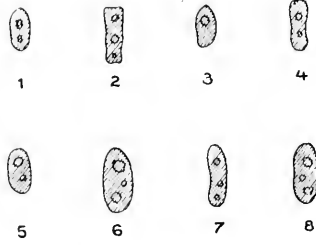
4.



5.



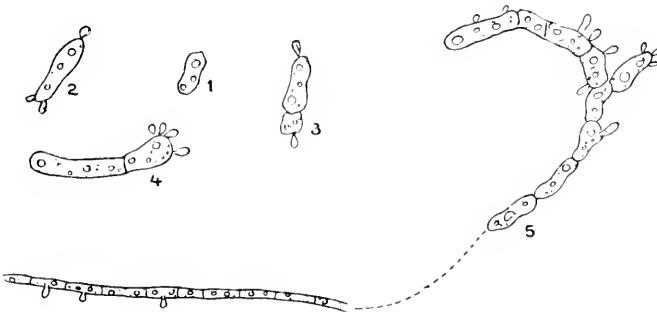
7.



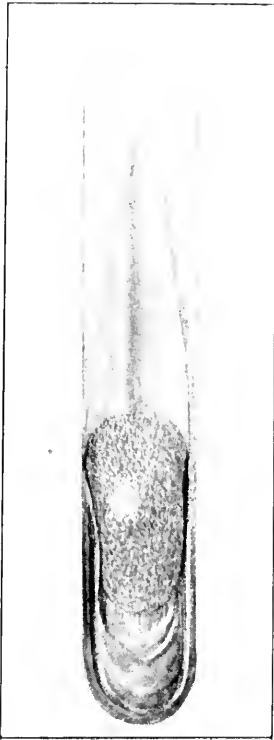
8.



6.



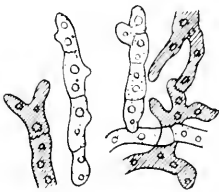
9.



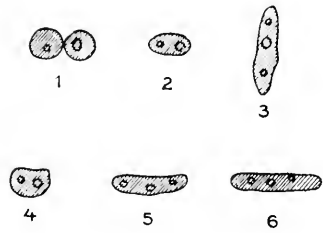
10.



12.



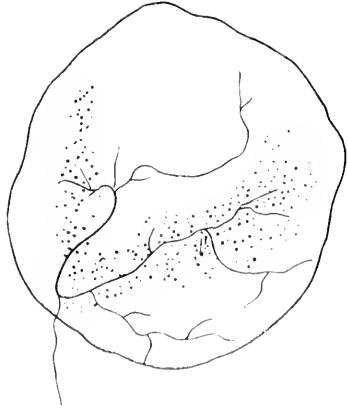
13.



11.



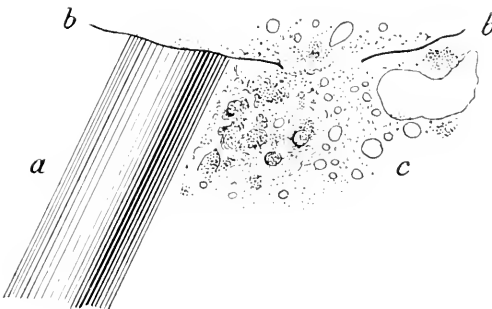
14.



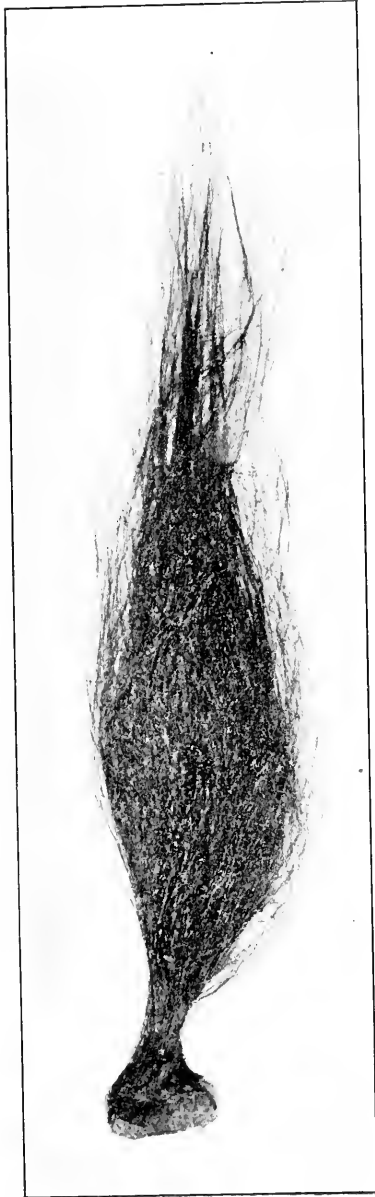
15.



16.



17. N^o. 1.



17. N^o. 2.



- Fig. 14. Myzelium das erst spät Konidien abschnürt. Schwache Vergr.
- Fig. 15—17. *Phycomyces nitens*.
- Fig. 15. Sporen von *Phyc. nitens*. 500 fach. No. 1 normal, No. 2—4 abnormal.
- Fig. 16. Teil eines unter dem Deckglas zerquetschten Sporangiums von *Phyc. nana sterilis*. 500 fach.
a. Sporangiumträger. bb. Wand des Sporangiums, geöffnet. c. Inhalt, aus fetthaltendem Protoplasma bestehend.
- Fig. 17. No. 1. *Phyc. nitens* normal auf Brot. 37 cM. hoch.
No. 2. *Phyc. nitens* var. *nana sterilis* auf Brot. 15 cM. hoch.
-

[From the Municipal Hospital, Bergweg,
Rotterdam].

A NEW METHOD OF SEROLOGICAL RESEARCH, FOR THE FIRST TIME APPLIED TO SUFFERERS FROM TUBERCULOSIS

BY

Dr. J. HEKMAN,

First medical attendant at the above mentioned hospital.

Introduction.

For some time I have been engaged upon the analysis of the effect of tuberculine. In an earlier publication concerning this subject ¹⁾ I already illustrated, that tuberculine, though as good as nonpoisonous to non-tuberculous individuals, may be made poisonous to them too by allowing the serum of a sufferer from tuberculosis to act upon tuberculine for a short time. I illustrated this in the following manner.

Allow such a bloodserum to act upon a solution of old-tuberculine for about 10 minutes in a living-room-temperature (the tuberculine-solution should be so strong, that, after the dilution with serum it is from 4 to 5 ‰); bring a few drops of this mixture into the connective tissue of the eye of a healthy, non-tuberculous cobaya.

Very soon afterwards such an irritation of the connective tissue arises, that a thin secretion, sometimes even, a thick secretion containing much mucus, appears.

The instillation of the serum alone, or of the 5 ‰ tuberculine-solution alone can not cause such a reaction.

¹⁾ Dr. HEKMAN. Bijdrage tot de Analyse der Tuberkuline-werking. Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1913 II, No 24..

If blood serum obtained from a non-tuberculous individual is used for the action upon tuberculine, this reaction does not arise.

So it already appeared from these experiments that in the bloodserum of sufferers from tuberculosis a substance occurs, which can transform tuberculine in such a way, that from non-poisonous it may be made poisonous also to non-tuberculous individuals.

I further proved this by injecting a mixture of such bloodserum and tuberculine into the abdomen, into the veins and beneath the skin of healthy cobayas.

In this way I could poison the experimental animals to a high degree. After injections into the veins of rabbits I could even cause important rises of temperature, which did not appear when I injected either only bloodserum or only tuberculine-solution. Neither did I see this, when I took bloodserum of healthy persons. It seems to me, that by means of these series of experiments I have supplied further proofs for the correctness of the theory, composed by WOLFF-EISNER ¹⁾ in order to explain the peculiarity of the tuberculine-action. A theory, also treated of in detail and defended by SAHLI ²⁾ in his well known booklet.

After the finishing above mentioned experiments, I began to analyze the peculiar reaction of tuberculous tissues following an injection of tuberculine, administered to a tuberculous individual. Such a strong reaction of the tuberculous tissue has often been known to take place, that necrosis and decline may often be the result. I have made an endeavour to imitate these phenomena artificially. In the first place I asked myself, which factors co-operate in this reaction. It is probable that chiefly the tuberculous tissue, white corpuscles, blood or tissue-fluid and the injected tuberculine must bring about the reaction together. "How" I now tried to unravel.

In a test-tube I brought together the following substances: a tissue (for which I took fibrine obtained from horse-blood), white corpuscles (also extracted from horse-blood), tuberculine (Alt-Tuberkuline, KOCH, HÖCHST) and bloodserum, obtained from a

¹⁾ WOLFF-EISNER. Früh-Diagnose u. Tuberk. Immunität. Berlin 1909.

²⁾ SAHLI. Tuberkulin-Behandlung u. Tuberk. Immunität. 1913.

sufferer of tuberculosis. In the first experiments I coloured the fibrine with methylic-blue and in the following with eosine. The mixtures obtained in this way, were placed in an incubator, for the time of 16 hours in a temperature of 37° C. If after 16 hours the fibrine had been consumed, the liquid became blue (resp. pink). If there was no consumption, the above-mentioned liquid remained colourless.

As tissue I took fibrine, an indifferent substance, in order to be able to trace the influence of the nature of the tissue on the reaction. For, by replacing fibrine by tuberculous tissue I could trace, what influence the nature of the tissue had on the result of the reaction.

I had expected, that I should see the most intense consumption of the fibrine, if I brought blood-serum, tuberculine and white corpuscles together. According to my train of thought, the leucocytes would be killed by the poisons, coming free by the action of serum on tuberculine. Out of the killed leucocytes would come free peptically working ferments and these would again especially transform the fibrine. But the result of the experiments was quite different. Consumption of the fibrine *did* always arise, when I added it to blood-serum; but was always less intense, when I moreover added either tuberculine, or white corpuscles or both. This greatly astonished me. Therefore I submitted the checking influence exercised by tuberculine and leucocytes on the transformation of coloured fibrine by means of human-serum, to a closer research. From this a new method of serological research has proceeded. Before setting forth this method I have first to treat of the preparatory researches first to be held.

Preparatory researches.

So I found as the result of the above-mentioned experiments that serum, obtained from tuberculous people can transform coloured horse-fibrine to a rather high degree. Immediately the two following questions present themselves:

1. Does the serum of every man possess the property of being able to transform fibrine; or does this property specially belong to serum, obtained from tuberculous persons?

2. Can human serum also dissolve other albumina besides fibrine?

ad. 1. It is well-known, that in human serum different ferments occur, which partially occur in the serum itself, partially come free with the falling asunder of the leucocytes. Besides fibrine-ferment, peptic-, amyolytic-, and lipolytic- ferments are known.

To my knowledge, in the clinic no use has as yet been made, towards diagnostic purposes, of the fact that serum possesses one of these ferments in a more or less high degree.

The anti-tryptic property of serum has indeed often been a point of research. If we remember e. g. the many researches, made after the method of JOCHMANN & MÜLLER, which comes to this, that the anti-tryptic action is traced by mixing the serum on a smooth LÖFFLER-serumplate with tryptically acting liquid.

The anti-tryptic property of serum especially seems to have increased, when abnormally much human albumen is lost (cancer, tuberculosis, pregnancy a. o.)

Of late many researches by ABDERHALDEN ¹⁾ and his pupils have appeared about the property of human serum being able to destroy certain organs under certain circumstances.

In pregnancy specific ferments were said to occur in the blood, which can destroy placenta.

With sufferers of cancer specific ferments were said to occur which can corrode cancer-tissue.

ABDERHALDEN used different methods. First he followed the *dialysing method*. To 1 gram of organ (e. g. placenta) in a dialyser, 1.5 c.M³ serum is added. When this has been left undisturbed for 16 hours in a temperature of 37° C. we try to indicate the products formed from the placenta in the dialysiswater (15 c.M³ distilled water) by means of the biuret — (or better) the ninhydrin — reaction. This method is still universal and more used than the so called *optic method*. For this method we want a small and sensitive polarimeter; by means of this instrument we determine the refractive index, changed because of the formed transformation products. After-

¹⁾ ABDERHALDEN. 4te Auflage der »Abwehrfermente« 1914.

wards the *microkjeldahl method* ¹⁾ is used in order to be able to determine the quantity of nitrogen in the dialysis-liquid. Later still he makes use of an analogical method, the same as I have followed ²⁾; viz. tissue (placenta) is *coloured with carmine* and from the colour coming free, the intensity of the consuming-process is judged.

It would ask too much space, if I here entered in detail upon the researches made after these different methods. Let the short information suffice, that the results are very different. While ABDERHALDEN and his school maintain that the ferments occurring e. g. in pregnancy in the serum of women, are specific and consequently can alone destroy placenta-tissue, there are on the other hand a great many other investigators, who cannot agree to this. According to the last, the serum of pregnant women destroys placenta oftener and in a larger quantity than serum of not-pregnant women, but certainly it occurs not seldom that the serum of not-pregnant women can destroy placenta. Even the serum of men is said to be able to do this! At all rates the Abderhalden-reaction has as yet not conquered a place of its own as a diagnostic expedient. Elaborate researches and a list of literature are to be found in the dissertations of GOUDSMIT ³⁾ and BIJLEVELD ⁴⁾.

In searching the different tables given in the researches meant here, I have made it my particular study to find an indication of the solution of the problem on which we are now engaged, whether the serum of tuberculous individuals possessed a stronger peptic property than the serum of non-tuberculous persons. I consequently investigated, if perhaps the serum of the former, *but not pregnant*, destroyed placenta oftener than that of others, non-tuberculous and *also not pregnant*. For other states, of disease (cancer, lunacy etc.) I searched this in an analogical way.

From the published tables I could not at all conclude that the bloodserum of tuberculous individuals regularly differed from the serum of non tuberculous persons. *My own researches*

¹⁾ *Munch, Mediz-Wochenschrift*, 7 April 1914, No. 14.

²⁾ *Munch, Mediz-Wochenschrift*, 21 April 1914, No. 16.

³⁾ M. E. GOUDSMIT. De biologische Zwangerschapsreactie volgens Abderhalden. Diss. Amsterdam 1913.

⁴⁾ J. W. BIJLEVELD. De zwangerschapsreactie van Abderhalden. Diss. Leiden 1913.

also taught me, that there was a great individual difference, while I did not find that, in general, blood serum of tuberculous persons possessed a stronger peptic power than that of non-tuberculous persons. As albumen, in regard to which I determined the peptic power, I chose (as mentioned) horse-fibrine. This was coloured at first with methylic blue, afterwards with eosine. The fibrine freed from blood and blood-colour by means of washing, was put in a watery solution of methylic-blue or eosine for 24 hours. The fibrine absorbed much colour. The superfluous colour was removed by boiling the fibrine with constantly renewed water, until the water remained quite colourless. This is indeed a work taking up much time, but in this way we can prepare coloured fibrine, which, when brought into the controlling-tube, filled with water or *Na.-Cl.* solution, does no longer let loose any colour. Afterwards I coloured the fibrine with eosine instead of methylic blue, because I found that the digestibility of this albumen suffered more by the colouring-process when I used methylic-blue than when I used eosine. It is desirable always to take *fresh* fibrine, for this digestibility of the fibrine also decreased during the time it was kept.

The mixtures of serum and fibrine were always put in test-tubes of the same width and thickness, which were closed with a cork. The solutions were placed in an incubator for about 16 hours in a temperature of 37° C. Great care was also taken to add *equal pieces* of fibrine to the different mixtures. This was necessary from the point of view of comparison, as the experiments taught that the intensity of the consuming process was greater when the surface of the albumen increased.

The peptic property of human serum in regard to coloured horse-fibrine I determined in 2 ways :

a. To equal quantities of undiluted or very little diluted serum I added *equally big, equally fresh and equally coloured pieces* of fibrine. From the stronger or weaker colour of the liquid the intensity of the consuming-process was judged.

b. Each serum was so far diluted with 0.9 % *Na. Cl.* solution, till consuming of fibrine no longer took place. The stronger the fibrolytic power of a serum, the more it had to be diluted in order to find this decisive point. Here is an example of an experiment.

Of 6 persons, respectively suffering from tabes dorsalis, chlorosis, tubercul. pulm. II, tubercul. pulm. I, lues and liver-cancer the sera are investigated in regard to their fibrolytic power. If each serum was diluted 5 times, the dilutions, made from the sera, obtained from persons suffering from tabes dorsalis and chlorosis both proved to be coloured equally strong and strongest of all. Then followed: tubercul. pulm. II, tubercul. pulm. I, lues and liver-cancer.

The final dilution of each serum, by which fibrine was no longer transformed, was of tabes 1 : 900; chlorosis 1 : 800; tubercul. pulm. II 1 : 600; tubercul. pulm. I 1 : 500; lues 1 : 450; cancer 1 : 350. Consequently there was a rather satisfying harmony in the results obtained in both ways. From this series of experiments also appeared already the great individual variety of the fibrolytic power of the investigated sera. I found this confirmed in all my experiments.

From these experiments I consequently obtained the following result: *The fibrolytic power of human serum is not constant, but individually shows great variety.* I did not succeed at all in finding any fixed rules; in no state of disease did I find the fibrolytic power constantly increased or decreased. With older people this power mostly seems to be stronger than with younger people.

ad. 2. In order to be able to answer the question, whether human serum can also transform other albumina instead of fibrine, I used for further consuming experiments, hen's albumen, lung- and kidney-tissue; these two last substances, obtained both from a man and a rabbit. (Healthy lungs and kidneys were used). These tissues I again coloured with eosine. Lung- and kidney-tissue, cut into small slices and then put in the colour, absorb much colour, but also lose a great deal of it again through the boiling. Moreover I found that even though the water was quite colourless, the coloured pieces of lung and kidney repeatedly let loose colour when in the controlling-tubes, if they remained in the incubator for 16 hours in a temperature of 37° C.

The result of the consuming-experiments was, that *every human serum that I have searched, corrodes hen's albumen as well as kidney-tissue.*

Whether these substances can be transformed to as high a degree as fibrine I cannot state with absolute certainty, as I was not quite sure that the quantity of colour occurring in all 3 substances was the same per unit of surface and capacity. Probably this was not the case, as hen's albumen was weaker coloured than fibrine. Also I again found (the same as I found for fibrine) *that the consuming power of the serum with regard to hen's albumen, lung and kidney-tissue again individually showed great variety.* Mostly hen's albumen was still consumed in 100 times diluted serum. Lung- and kidney-tissue in still stronger diluted serum. *Serum, obtained from a sufferer from chronic disease of the kidneys-however, corroded kidney-tissue to a much higher degree than that of non-sufferers.* And it makes little or no difference whether lung- and kidney-tissue of a man or of a rabbit is taken for this purpose.

In general however human serum could be further diluted still to be able to obtain transformation of fibrine, than to reach the same purpose for the other mentioned albumina. Therefore I think it probable that, with a reservation as to the just made restriction, human serum, speaking in general, can transform fibrine more strongly than hen's albumen, lung- or kidney-tissue. If, however, I investigated the consuming power of serum, obtained from a sufferer from chronic disease of the kidneys, both in respect to horse-fibrine and coloured kidney-tissue, the kidney-tissue was also repeatedly corroded in a still stronger dilution of the serum.

This result, viz. that each serum can corrode organic albumen contradicts, what has been pretended by ABDERHALDEN and his school (page 4). If A. however coloured the placenta with carmine, he also found that nearly every serum transformed placenta-tissue (see note 4, page 5). Moreover BIJLEVELD (5) found that in dialysis continued for more than 16 hours every human serum corroded placenta-tissue in such a way, that this could be indicated by the ninhydrin-reaction. Apparently there is a harmony between these results and mine. The indication of consumption of the organic tissue by means of colour, is, however, a much more sensitive method than the dialysis-method. Hence that every human serum can corrode organic

albumen while in using the dialysis method this cannot be proved in all cases.

What kind of ferment may this be, which exercises such a consuming power in the serum? If the serum is heated for half an hour to 56° C., the fibrolytic power has been weakened but not destroyed. Consequently it is not the complement. Nor does it only proceed from leucocytes, which have fallen asunder, for the activity of the serum is almost the same, when immediately after the coagulation the serum is centrifugated from the blood, as when this is not done till after some hours. Most probably in the last serum a rather greater number of leucocytes have fallen asunder than in the first; still the fibrolytic power is almost the same.

How is it to be explained that tuberculine checks the transformation of coloured fibrine by serum? The solution of this problem is not so difficult, for from further experiment it soon appeared that this checking power belongs not only to tuberculine, but to many other uncoloured albumina. If for instance, besides coloured fibrine, hen's albumen is added, the transformation of fibrine is also impeded. The fibrine-transformation may even be absolutely checked, when the serum is sufficiently diluted (100 times or still further). The same thing takes place when, instead of hen's albumen, uncoloured kidney-tissue is taken. And when besides fibrine, coloured by eosine, fibrine coloured by methylic blue is added to serum, the transformation of the eosine-fibrine predominates.

All the mentioned albumina check the fibrine transformation, because the digestibility of the fibrine has decreased because of the colouring; the other albumina are now easier transformed and are now more corroded than fibrine. And, as methylic-blue fibrine is again less easy to digest than eosine-fibrine (pag. 6) in a mixture of both fibrine-kinds and serum, eosine-fibrine is most corroded.

In order to explain this checking, we should also remember that in the serum now occur two instead of one albumen; and that consequently the ferment now corrodes two substances instead of one, but by this the absolute checking cannot be explained. For by all the mentioned albumina the fibrine-trans-

formation can be absolutely checked and that in a much weaker solution of the serum than that in which (without addition of one of the mentioned albumina) fibrine alone is no longer transformed.

Moreover I took care in my experiments that the surface of the uncoloured albumen was no larger than that of the fibrine. With an increasing digestion-surface the intensity of the digestion-process also increases. With this factor we must however reckon in order to explain the checking action of fibrine. For tuberculine contains a dissolved albumen, viz. of the character of an albuminoid.

As albuminoid is again easier to digest than ordinary albumen (e.g. hen's albumen) and the surface of tuberculine is so large because of its dissolved state, the checking influence of this substance upon the transformation of coloured fibrine is therefore so great. And especially greater than that of hen's albumen.

By a simple experiment may be indicated that each serum easily transforms tuberculine. For if we allow any serum to act upon tuberculine for 3 hours in a temperature of 37° C, and if we only then add the fibrine, no or nearly no fibrine, is transformed. If we place serum in the incubator for 3 hours in a temperature of 37° C., this has nearly no influence on the transformation of fibrine, then added. Probably this simple experiment also sufficiently explains why every man finally reacts upon an injection of a very large dose of tuberculine (more than 10 mG.) The quantity of tuberculine is so great that only by the action of the peptic ferment occurring in every human serum enough transformation-products can be formed to cause temperature rises, etc.

A new method of serological research.

All these preparatory researches were necessary clearly to understand the now to be treated new serological method.

For soon it appeared to me that tuberculine, added to the blood-serum obtained from a sufferer from tuberculosis less checked the fibrine-transformation than when added to non-tuberculous serum. This I found repeatedly confirmed. *Consequently: If the fibrolytic power of 2 sera, the one obtained*

from a sufferer from tuberculosis, the other from a non-sufferer, is equal, absolute checking of fibrine-transformation by tuberculine appears with the first serum in a weaker dilution than with the second. If the fibrolytic power of the 2 sera is not equal, but e.g. that of the second much stronger than that of the first, the dilution for the absolute checking of the fibrine transformation need not be weaker for the first serum than for the second.

I will illustrate this by some experiments.

Serum A is obtained from a female sufferer from phthisis in the first stage with a temperature up to 38° C. Serum B originates from a female sufferer from ulcus ventriculi. Both sera are respectively diluted 50, 100, 200 and 400 times with Na. Cl. solution. To all dilutions of both sera pieces of fibrine of the same size, the same date and the same colour-strength are added. The fibrine is fresh, 2 days old.

The following mixtures are prepared :

1. 2 cM³. Na Cl. + 0,5 M³. Serum A (10 × diluted) + fibrine.
 2. 2 » » » + 0,5 » » » (20 × ») + »
 3. 2 » » » + 0,5 » » » (40 × ») + »
 4. 2 » » » + 0,5 » » » (80 × ») + »
 5. 2 » » » + 0,5 » Na Cl. + fibrine (to be controle!)
- 6, 7, 8, 9 and 10 are to be prepared in the same way from serum B.
11. 1,5 cM³. Na Cl. + 0,5 cM³. Serum A (10 × diluted) + 0,5 cM³. 10⁰/₁₀ T + fibrine.
 12. 1,5 » » » + 0,5 » » » (20 × ») + 0,5 » » + »
 13. 1,5 » » » + 0,5 » » » (40 × ») + 0,5 » » + »
 14. 1,5 » » » + 0,5 » » » (80 × ») + 0,5 » » + »
 15. 1,5 » » » + 0,5 » Na Cl. + 0,5 cM³. 10⁰/₁₀ T + fibrine (controle!)
- 16, 17, 18, 19 and 20 are to be prepared in the same way from serum B.

For the preparation of the different mixtures, the dilutions are first prepared, then the tuberculine-solution is added. Then the mixtures serum-tuberculine are placed in the incubator for 15 minutes in a temperature of 37° C. Finally the pieces of fibrine are added. For experience teaches that *when serum is first allowed to act upon tuberculine, the tuberculosis-serum is still less checked in its fibrolytic power by tuberculine than non-tuberculous serum.*

As we see, all sera are diluted 50, 100, 200 and 400 times. To the second series a 10 ⁰/₁₀ tuberculine solution is added, but, as this is 5 times diluted, the T solution is 2 ⁰/₁₀. From

a practical point of view this has experimentally proved the most suitable solution, as a stronger T solution is too deeply brown-coloured and a weaker one checks too little.

The controlling tubes 15 and 20 too, were prepared in order to be able to determine more easily, in comparison with a tuberculine-solution, in which dilution of the serum the fibrine was absolutely no longer corroded; so where the absolute checking of the fibrine-transformation by tuberculine commenced.

These mixtures were placed in the incubator for 16 hours in a temperature of 37° C. and then the result was examined. In comparing the tubes of the first series it appeared that the fibrine-transformation in serum B., obtained from a non tuberculous, is somewhat stronger than in serum A. In the 400 times diluted solution of both sera fibrine had still been transformed; in serum B. however not much less than in serum A. Still almost absolute checking of the fibrine transformation of the 2 % tuberculine-solution had already begun in the 100 times diluted solution of serum B.; in the 200 times diluted solution no more eosine had been let loose at all. In the dilution of serum A it was quite different, however. In the 300 times diluted solution of this serum no absolute checking by the T solution had even as yet arisen. So quite a difference!

This experiment beautifully illustrates the first part of the above-mentioned rule. If on the contrary, the fibrolytic power of the sera to be compared mutually, is not the same, but if that of non-tuberculous sera is much stronger than that of tuberculous sera, quite another result will be seen. For instance: From 2 patients, one healthy, the other suffering from abdominal tuberculosis the sera are examined. The decisive point of the fibrine-transformation of serum A. is reached when the serum is 1200 times diluted. With Serum B. this decisive point is already reached with the 400th dilution. Absolute checking by a 2% tuberculinesolution in serum A. with a solution of 1:350; in serum B. with a solution of 1:250. Serum obtained from the non-tuberculous person must now be further diluted than that of the tuberculous individual. If we consider the results of our preparatory researches however, this is not difficult to understand. The stronger the primary peptic power of the serum is, the more tuberculine will have to be added, or the

further the serum will have to be diluted in order to obtain absolute checking of the same.

Does the serum of every tuberculosis-sufferer possess this property? I cannot answer to this with absolute certainty, as we have only been able to indicate this peculiarity in the tuberculosis-serum, by comparing sera obtained from tuberculous and non-tuberculous individuals.

Still I already have at my disposal more than 100 observations which all gave me a confirmation of this fact.

Also I have already found that the checking influence of tuberculine is not the same in every tuberculosis-serum, even if the fibrolytic power is the same. With acute, active tuberculosis the checking action of tuberculine is much weaker than with tuberculosis on the way to recovery. Only a short time ago I was able to indicate with miliar-tuberculosis how the checking action of T in the serum decreased the longer the illness lasted. And on the reverse we find that T in the serum checks more than before, when the illness passes into recovery, or is cured. In a period of 2 months we could often already perceive obvious differences. An increase of the checking action of tuberculine in tuberculosis serum I consider as a prognostic favourable symptom, *except however with cachectic sufferers*. There we often find very low numbers, and this symptom does not hold good.

In order to increase the practical value of this reaction, I am now engaged in determining *the checking-index* of each serum. By this term I understand what follows: Determine the decisive dilution of the serum, in which fibrine is no longer transformed, exactly down to 1 : 50th parts (consequently 1 : 700, or 1 : 750 etc.). Also investigate with which dilution of the serum a 2% tuberculine-solution absolutely checks the fibrine-transformation also exactly down to 1 : 50. *The quotient of the first number, divided by the second, I propose to call checking-index.*

We need not demonstrate that this index is smaller in tuberculosis-serum than in other sera. Suppose e. g. that the decisive point of the fibrine-transformation of 2 sera A. (tuberculous) and B. (non-tuberculous) is for both in a dilution of 1 : 500. The decisive point of the absolute checking by tuberculine is of A 1 : 300; of B. 1 : 100. Checking-index of A. $\frac{500}{300} = 1\frac{2}{3}$; of B $\frac{500}{100} = 5$.

It is necessary to determine the normal index from a great number of observations. I am engaged upon this and will soon publish it.

How is it to be explained that tuberculine checks the fibrine transformation to a lower degree? The following explanation seems to me the most reasonable. Before this (page 2) I could indicate, that in such serum a substance occurs, which can transform tuberculine in such a way as to make it poisonous to every individual. If the action of the serum on tuberculine lasts too long, the tuberculine is perfectly neutralised, so that it is then even no longer poisonous to a tuberculous individual. In the here-meant fibrolitic system-substance (bacteriolysine?) also destroys the tuberculine, if tuberculine-serum is used. By this the checking influence of tuberculine will decrease.

In normal serum that substance of the character of a bacteriolysine does not occur. The peptic ferment will now corrode both fibrine and tuberculine, while the tuberculine in the tuberculosis-serum (besides by the peptic ferment) is also destroyed by the specific ferment. Consequently the peptic ferment will be less weakened in the last serum through the co-existence of the specific ferment, and will be able to transform to a higher degree.

If we heat tuberculosis-serum for half an hour to 56° C., the fibrolytic power has decreased (see page 9), but then the tuberculine proportionally more checks the fibrine-transformation than before the heating. Probably the specific ferment is consequently more weakened by the heating than the peptic ferment.

I will also try to apply this principle of serological research in another department. If it is true that with different states of disease different defensive ferments circulate in the blood, by bringing together coloured fibrine (which is corroded by each serum), the albumen, in regard to which the specific ferment occurs in the blood, and the specific serum, it must be possible to indicate a smaller transformation of the fibrine, than when serum is used in which the here-meant specific ferment does not occur. It seems to me that especially in the department of the serological cancer-diagnostic important results may be obtained here.

Synopsis.

1. In the blood-serum of every man a substance occurs, which can transform coloured horse-fibrine to a rather important degree. Hen's albumen, lung and kidney-tissue, coloured with eosine, can also be transformed by human serum. With other albumina no experiments have been made.

2. In general the peptic power of the serum individually shows great variety; fibrine is generally transformed to a higher degree than hen's albumen, lung- and kidney-tissue, except that the serum of sufferers from a kidney-disease corrodes kidney-tissue to a higher degree.

3. These outcomes, differing from the results of the well-known researches of ABDERHALDEN and his school, may probably be brought in concord with these through the fact, that the method of research followed by me (colouring of tissues) is much more sensitive than the methods used by ABDERHALDEN (dialysis, optic and other methods).

BIJLEVELD. (Dissertation Leiden 1913) too found, that by an action of serum on placenta continued for more than 16 hours it may be proved by the dialysis-method, that every human serum corrodes such a tissue. This result beautifully harmonizes with my results.

4. The transformation of coloured horse-fibrine may be absolutely checked by the addition of other uncoloured albumina: tuberculine, hen's albumen, kidney-tissue.

5. As tuberculine checks the transformation of fibrine in tuberculosis serum to a lower degree than in non-tuberculous serum, from this a new principle of serological research for sufferers from tuberculosis has arisen.

6. The proposition is made to call the very last dilution of serum, the first in which fibrine is no longer transformed, divided by that dilution, in which a 2 % tuberculine-solution just succeeds in quite checking the fibrine-transformation, the *checking-index*.

7. This checking-index is smaller in tuberculous-serum than in non-tuberculous serum. The normal number of this index has still to be determined more exactly.

[Institut de Pathologie de l'Ecole Vétérinaire d'Utrecht].

TRANSMISSION DE LA TUBERCULOSE PORCINE À L'HOMME; RÉINOCULATION AU VEAU.

PAR

le Dr. H. MARKUS, ¹⁾

Directeur de l'Institut.

Au printemps de 1908 le vétérinaire X. ²⁾, âgé de 24 ans, était à plusieurs reprises incommodé par de petites gerçures ou déchirures de la face interne du pouce de la main droite. Ces gerçures se manifestaient dans une callosité de la peau à cet endroit. Malgré le peu d'importance de ces petites plaies, X. croit après coup que ce sont elles, qui ont dû constituer la porte d'entrée du virus.

Cette supposition est d'autant plus fondée que X., en se servant de ce pouce blessé, a examiné un grand nombre de *porcs tuberculeux*. Il est vrai qu'il avait d'abord couvert une déchirure d'un morceau de taffetas gommé, mais pendant l'examen en question, ce morceau s'était facilement perdu.

Quelques jours après cet examen, X. avait traité manuellement quelques vaches qui souffraient de la rétention des secondines.

Peu après X. commença à souffrir de douleurs du thénar du pouce droit. Les douleurs devinrent à la fin si violentes, que X. invoqua l'aide d'un médecin. Ce dernier appliqua d'abord pendant une journée un pansement-PRIESSNITZ et incisa ensuite la partie la plus élevée du thénar; un peu de

¹⁾ Conférence, faite à Delft le 1^{er} juillet 1914, à l'Association Néerlandaise de Microbiologie.

²⁾ Mr. X. avait la bienveillance de me communiquer les détails suivants concernant le cours de sa maladie.

pus se dégagea. La petite plaie guérissait vite et les douleurs avaient disparu.

Peu à peu cependant se développait sur le dos du pouce un bouton, entouré d'une zone hyperémique, qui s'étendait jusqu'à l'endroit du thénar où l'abcès s'était trouvé caché. Après ces symptômes X. commençait à croire que son état était plus ou moins grave. Et il ne le croyait pas à tort. La preuve en est qu'au bout de quelques jours il pouvait constater des douleurs dans l'aisselle droite et le gonflement du ganglion lymphatique axillaire, qui était devenu gros comme une bille.

X. alla chez un autre médecin et lui mit au courant de son indisposition. Le thénar du pouce fut incisé une seconde fois assez profondément et dans la peau du bouton on fit une grande incision. Ensuite X. porta la main pendant plusieurs jours dans un bandage de sublimé. Le ganglion axillaire gonflé subissait d'abord un traitement d'onguent de mercure, puis un traitement de solution de BÜROW.

La plaie du thénar du pouce guérissait encore assez rapidement, mais le bouton se changeait en un petit ulcère. Sur cet ulcère se formait toujours une croûte, au dessous de laquelle était sécrété un pus liquide et gris, qui la soulevait. La teinture de iode, la pierre infernale ou l'onguent de zinc étaient impuissants à amener la guérison.

Le gonflement du ganglion axillaire grossissait d'ailleurs toujours, malgré le traitement mentionné, sans que cependant les douleurs augmentent dans la même mesure.

Sur ces entrefaites, plusieurs mois s'étaient écoulés et X. résolut d'aller consulter un spécialiste (chirurgien). On discutait longuement la nature de l'infection; X. attachait le plus d'importance à la possibilité d'une infection par les vaches souffrant de la rétention des secondines. Il ne pensait pas alors à l'examen des porcs tuberculeux.

Le chirurgien traitait X. à l'aide de bandages élastiques et de ventouses, afin de causer de l'hyperémie veineuse. C'est que les vaisseaux lymphatiques du bras droit s'étaient enflammés; raccourcis qu'ils étaient par l'inflammation, on pouvait les palper facilement à la tension du bras.

Pendant l'examen qui avait lieu régulièrement et pendant lequel les autres ganglions lymphatiques étaient contrôlés tou-

jours, on découvrit quelques petits nodules le long d'un des vaisseaux lymphatiques à la face interne du bras. C'est cette découverte qui immédiatement faisait supposer qu'on avait affaire à la tuberculose. Pour en être convaincu une partie du vaisseau lymphatique avec des nodules fut extirpé et examiné au microscope. Il parut alors que les petits nodules étaient des tubercules typiques, dans lesquels se trouvaient une très grande quantité de bacilles de KOCH.

On résolut d'extirper le ganglion lymphatique axillaire et l'endroit ulcéré du pouce. On avait d'abord l'intention d'extirper également les vaisseaux lymphatiques enflammés, mais on y renonça. Les plaies provenant de l'extirpation du ganglion lymphatique et du morceau de la peau guérissaient rapidement.

Les vaisseaux lymphatiques atteints, dans lesquels on pouvait d'abord palper facilement les tubercules, furent traités à l'hyperémie veineuse. A la suite de ce traitement le raccourcissement de ces vaisseaux et les tubercules disparaissaient peu à peu. X. portait le bras en écharpe et le tenait en repos autant que possible. Plusieurs mois s'écoulaient avant que la guérison fût complète.

Durant la maladie, l'état de santé de X. était du reste assez bon; la température ne s'élevait pas sensiblement; le malade prenait une nourriture substantielle et vivait d'une façon très hygiénique.

Par l'intermédiaire du malade, je recevais dans une petite bouteille stérilisée une partie (à peu près la moitié) du ganglion axillaire tuméfié, pour en faire l'examen.

En coupant le ganglion on avait ouvert un foyer mou et caséux, ayant environ la grandeur d'une noisette. Ce foyer était entouré d'une façon irrégulière par une zone de tissu lymphatique gonflé et hyperémié, large environ de 5 m.m., évidemment tuberculeux déjà. Dans les préparations, faites de la substance caséuse, molle et jaune clair et colorées selon la méthode de KOCH-EHRLICH et avec la liqueur de ZIEHL, se trouvaient de rares bacilles, plus ou moins granuleux et relativement fins.

L'examen histologique du tissu ganglionnaire faisait découvrir une tuberculose diffuse de l'organe avec une multitude de foyers caséux. Le tissu tuberculeux abondait de cellules

épithéloïdes et de cellules géantes. Ces dernières étaient de grandes dimensions et renfermaient le plus souvent un grand nombre de noyaux, qui n'étaient pas toujours situés à la périphérie comme dans les cellules du type LANGHANS. Dans plusieurs cellules géantes ces noyaux étaient dispersés sans ordre dans le cytoplasme et y formaient parfois de grands amas. (Pl. XIII).

Il se trouva que dans les coupes aussi le nombre de bacilles était assez petit.

Le lendemain deux cobayes furent inoculés sous la peau de la face interne de la cuisse gauche. L'injection se composait d'une émulsion de la substance caséuse du ganglion dans de l'eau stérilisée. Cette émulsion avait été acquise en triturant la dite substance dans un pilon en porcelaine, qui avait été stérilisé par l'ébullition pendant une demi-heure. La seringue-RECORD aussi était stérilisée de la même manière avant et après l'usage. La désinfection de la peau des animaux d'expérience avant l'injection se fait de la manière suivante. Après avoir éloigné les poils soit avec des ciseaux, soit (chez les grands animaux) par de la poudre à raser, on lave bien la peau à l'alcool savonneux, ensuite à l'alcool-70 %, puis au sublimé-1/00.

Le premier des cobayes, inoculés le 8 juillet 1908, succomba le 31 octobre de cette année, c'est à dire au bout de 114 jours; tandis que le second fut tué le 1^{er} novembre 1908, c'est à dire 115 jours après l'injection. Le premier cobaye pesait le jour de l'inoculation 427 grammes; le poids montait malgré la tuberculose expérimentale à 525 grammes le 9 septembre, pour baisser ensuite à 418 grammes le jour de la mort.

Le second cobaye qui le jour de l'inoculation pesait 382 grammes, atteignait son maximum de 480 grammes également vers le 9 septembre et baissait ensuite jusqu' à 422 grammes le jour de la mort.

A l'autopsie on trouvait chez les deux animaux de la tuberculose généralisée; pour un cas de tuberculose humaine expérimentale chez le cobaye, la maladie était très lente, ce qui pourrait indiquer un bacille peu virulent ou une grande résistance individuelle de ces cobayes.

Des pommes de terre glycélinées et du serum glycéliné, ensemencés de pulpe de rate de ces deux cobayes, restaient stériles.

Le 2 novembre 1908 un autre cobaye fut inoculé de la façon susmentionnée avec la pulpe de rate tuberculeuse du cobaye, tué le 1^{er} novembre; l'inoculation fut pratiquée en même temps plus ou moins intra-musculaire.

Le poids de l'animal, qui au début de l'expérience était de 470 grammes, baissa rapidement; le 15 novembre l'animal pesait 410 grammes. Le poids diminuait toujours, de sorte que le 11 décembre il était de 370 grammes; le ganglion pré-crural gauche était un peu tuméfié et les muscles au lieu d'injection étaient fortement gonflés. C'est pourquoi je résolus de tuer ce cobaye le lendemain, afin d'acquérir une matière aussi pure que possible pour les expériences de culture.

Le 12 décembre 1908, donc 40 jours après l'infection, ce cobaye fut tué par effusion sanguine et immédiatement après l'autopsie fut pratiquée. La désinfection de la peau fut effectuée de la façon susdite; les pincettes, les scalpels, les ciseaux avaient été stérilisés auparavant dans de l'alcool savonneux et après avoir été lavés dans de l'alcool-70 %, ils étaient déposés dans une solution aqueuse stérilisée d'acide borique, où ils se trouvaient prêts à l'usage.

Après l'ouverture de la cavité abdominale ce fut d'abord la rate qu'on extirpa à l'aide d'instruments stérilisés et qu'on mit dans une boîte de PÉTRI stérile. Dans *la rate* se trouvaient un grand nombre de tubercules miliaires, souvent conflués et caséeux. Dans les préparations (ZIEHL) il se trouva que ces tubercules renfermaient beaucoup de bacilles de KOCH, fins et colorés d'une façon homogène. Dans les *muscles* au lieu d'inoculation se trouvait un abcès, ayant la grandeur environ d'une bille et qui renfermait une substance caséuse et molle. Les préparations de cette substance montraient beaucoup de bacilles de KOCH, fins pour la plupart et réunis en petits tas; ces bacilles étaient ou très granuleux ou colorés d'une façon homogène.

Le ganglion pré-crural gauche n'était que médiocrement gonflé, mais déjà en partie caséeux; il renfermait beaucoup de bacilles de KOCH fins et souvent granuleux ou pâles.

Dans *le foie* et *les poumons* on trouvait un grand nombre de tubercules miliaires, renfermant au centre souvent un petit foyer caséeux; dans le foie les tubercules étaient fortement conflués.

Le ganglion précrural droit, le ganglion iliaque gauche, les ganglions du foie et les ganglions cervicales et axillaires étaient tous plus ou moins considérablement agrandis et déjà caséeux en partie.

De la tuberculose généralisée s'était donc développée chez ce cobaye en 40 jours.

J'essayais de cultiver le bacille de KOCH en question, provenant de la rate tuberculeuse du cobaye, sur des milieux artificiels. C'est pourquoi une partie de l'organe fut coupée dans des morceaux aussi petits que possible dans une boîte de PÉTRI stérile avec des ciseaux stériles. La pulpe ainsi acquise fut ensemencée par un fil de platine en forme de spatule sur plusieurs tubes de sérum glyciné et de pommes de terre glycinées, lesquels tubes furent placés à l'étuve à 38° C.

Pendant les premières semaines suivantes il n'y avait pas de changement à remarquer. Peu à peu cependant de petits tas de cultures grises se montraient, de sorte que le 8 mars 1909, donc au bout de 85 jours, s'était déclarée sur le sérum une culture peu abondante, sèche, jaunâtre, verruqueuse ; sur chacune des pommes de terre s'étaient déclarées quelques protubérances globuleuses, blanches ou grises.

A cette date les cultures sur sérum furent transplantées sur le même milieu. Le développement était un peu plus abondant maintenant, de façon que le 11 juin 1909, donc 99 jours après, on se trouvait en présence d'une culture bien développée ; elle était moins sèche que la précédente, un peu grasseuse d'aspect et d'une consistance assez solide. En en prenant un peu de matière pour une préparation microscopique, la culture manifestait une cohésion assez grande ; il était plus facile de la détacher du fond, que d'en séparer une particule. Dans des préparations de ZIEHL des cultures sur sérum, je trouvais des bacilles *très longs, fins*, colorés d'une façon homogène. Le 8 mars 1909, les cultures sur pommes de terre furent transplantées sur le même milieu et sur du sérum glyciné.

Quant à ces dernières transplantations, il est à remarquer, que lorsque le bacille de KOCH avait été cultivé d'abord sur des pommes de terre, le développement sur du sérum glyciné était bien moindre, que lorsqu'il avait été emprunté à une culture sur sérum. Le sérum ensemencé de la pomme de terre

montrait ou uniquement un développement du bacille en forme de voile à la surface du liquide qui baigne le fond du tube ou en outre un développement peu abondant sur le milieu lui-même.

Parmi les cultures sur pommes de terre, c'est la culture avec sa série, que j'indiquerai comme *a*, qui pour le moment est surtout importante. Cette culture *a* ayant étéensemencée comme *culture primaire* le 12 décembre 1908, montra le 8 mars 1909 un développement sous la forme de quelques petites protubérances blanches. A cette date elle fut transplantée sur des pommes de terre et elle montra le 11 juin 1909, donc au bout de 99 jours, une *culture secondaire* presque entièrement analogue à la culture primaire. A cette date la culture secondaire fut transportée sur des pommes de terre et le 30 juillet 1909, donc en 49 jours, elle s'était bien développée sous la forme d'une quantité de granules sèches et blanches qu'on pouvait facilement détacher du milieu.

Dans des préparations de ZIEHL faites de cette *culture tertiaire* je trouvais des bacilles de KOCH ayant la forme de baguettes *courtes et lourdes*, souvent piriformes, colorés d'une façon homogène en rouge, ou étant plus clairs avec des endroits foncés. Après que cette culture tertiaire était transplantée le 1^{er} et le 30 juillet sur des pommes de terre, je résolus de me servir d'elle pour l'inoculation d'un veau, afin de découvrir quelle était la virulence de ce bacille de KOCH pour l'organisme bovin.

Pour cette expérience nous avions à notre disposition une génisse vigoureuse et saine, âgée de 16 semaines. Le 15 juillet on l'avait tuberculinée avec un résultat négatif; (0,300 gramme de tuberculine bovine, préparée à l'institut).

Le 30 juillet la culture tertiaire de la série *a*, suspendue dans de l'eau stérile, fut inoculée à ce veau sous la peau de la face droite du cou, dix centimètres environ avant l'articulation scapulaire. Le poids de la quantité injectée de bacilles humides (c. à. d. tels qu'ils sortaient de la pomme de terre) était de 0.061 gramme.

Le lendemain, le 31 juillet, je constatai au lieu d'inoculation un gonflement ayant la grosseur d'un œuf de poule. Le 2 août ce gonflement était moindre, mais le ganglion lymphatique préscapulaire était un peu agrandi. Le 4 août le gonflement

au lieu d'inoculation était réduit à un endroit dur, grossi et douloureux dans la peau et au dessous; le ganglion préscapulaire était encore tuméfié davantage. Le 6 août le lieu d'inoculation était toujours douloureux; l'enflure augmentait encore.

La température du veau, qui avant l'injection ne dépassait pas les 39,5° C. ne s'était pas élevée sensiblement jusqu'ici. La température la plus élevée qui avait été notée était de 39,7° C., (la température normale est selon MAREK de 38,5 à 40° C.).

Peu à peu cependant la température s'élevait; le 11 août à midi elle était de 40° C., à 6 heures du soir de 40,3° C., et à partir de cette date les températures notées s'élevaient continuellement au dessus de 40°, que ce fût à 8 heures du matin, à midi ou à 6 heures du soir. La température la plus élevée était de 40,7° C. le 14 août à 6 heures du soir.

Le 11 août je constatai au lieu d'inoculation une tuméfaction ayant un diamètre de \pm 8 c.m. et qui vers le bas se terminait en pointe; le ganglion lymphatique préscapulaire avait maintenant la grandeur d'un œuf de poule.

Le 16 août le foyer au lieu d'inoculation était considérablement gonflé et se continuait vers le bas dans un ganglion lymphatique prépectoral, ayant la grandeur d'une pomme de terre. Le ganglion préscapulaire était très grand et très douloureux.

Le 23 août l'épaississement disciforme au lieu d'inoculation avait 13 c.m. de long et 6 c.m. de large; le ganglion préscapulaire avait maintenant 11 c.m. de long.

Le 7 septembre à 4 heures de l'après-midi la température était de 39,8° C., la fréquence de la respiration était de 60 et celle du pouls très faible était de 82 par minute.

A partir du 12 septembre la température restait au dessous de 40°. Le 20 septembre la température la plus élevée était de 39,4°; la fréquence de la respiration était alors de 123 par minute.

Dans l'après-midi du 21 septembre, *donc 53 jours après l'inoculation*, le veau succombait.

L'autopsie fut pratiquée dans la soirée du même jour.

La *peau* au lieu d'inoculation était unie au foyer au dessous par un tissu très fibreux. Ce foyer était disciforme; il avait un diamètre de \pm 10 c.m. et \pm 1 c.m. d'épaisseur. Il se composait d'une substance caséuse solide, se trouvant dans le peaucier cervical et au dessous.

Le ganglion lymphatique préscapulaire droit était enveloppé d'un tissu conjonctif œdémateux et il était très agrandi. Il avait une longueur de $10\frac{1}{2}$ c.m. et une largeur de $5\frac{1}{2}$ c.m. A l'examen interne il se trouva, qu'il était presque entièrement caséeux d'une façon diffuse et avec de petites hémorragies. (Pl. XIV).

Les poumons étaient parsemés d'une façon diffuse et très dense de foyers miliaires, souvent confluents. (Pl. XV).

Les ganglions lymphatiques bronchiques et médiastinaux postérieurs étaient très agrandis et entièrement caséeux.

Le foie montrait sous la capsule quelques tubercules miliaires; *les ganglions lymphatiques du hile* étaient devenus plus volumineux et ils étaient caséeux, surtout à la périphérie.

Dans *la rate* se trouvaient des tubercules miliaires.

Dans *le rein gauche* se trouvait un seul foyer miliaire; dans *les capsules surrénales* se trouvaient quelques foyers miliaires; *les ganglions lymphatiques rénales* aussi étaient tuberculeux.

La muqueuse de l'intestin grêle était fortement hyperémiée et portait plusieurs petits foyers tuberculeux et caséeux de la grandeur environ d'un chènevis; quelques-uns de ces foyers allaient percer vers l'intérieur de l'intestin.

Les ganglions mésentériques étaient oedémateux, gonflés; de petits foyers caséeux et de petites hémorragies se trouvaient à la périphérie.

Dans *les tonsilles* se trouvaient de petits foyers tuberculeux caséeux; on en trouvait encore dans la partie postérieure de *la muqueuse du nez*.

Les ganglions lymphatiques suivants étaient encore tuberculeux.

Les ganglions brachiaux; le ganglion préscapulaire gauche; les ganglions précruraux; les ganglions supermammaires; les ganglions lombo-aortiques; les ganglions ilio-pelviens; les ganglions poplités, les ganglions maxillaires; les ganglions prépectoraux.

Le feuillet viscéral du péricarde séreux était oedémateux et portait sur le paroi du ventricule droit et sur la pointe du cœur quelques petits foyers tuberculeux.

Sur *les plèvres diaphragmatique et costale* et sur *le péricarde* je trouvais des flocons hémorragiques.

Les autres organes étaient normaux.

Les préparations (ZIEHL) montraient ce qui suit :

Le foyer au lieu d'inoculation : de très rares bacilles fins, très granuleux, de longueur moyenne.

Le ganglion préscapulaire droit : de très rares bacilles longs, très granuleux.

Les poumons : Une assez grande quantité de bacilles fins, point ou très peu granuleux ; ceux qui sont longs prédominent, mais il y en a aussi de très courts.

Les ganglions bronchiques et mésentériques : peu de bacilles granuleux de longueur moyenne.

Dans le *mucus bronchial* il ne se trouvait pas de bacilles.

A l'examen histologique des différents organes se montrait l'image caractéristique du tissu tuberculeux.

Il s'est donc trouvé que le bacille de KOCH, cultivé à travers le cobaye, et provenant du ganglion lymphatique axillaire du vétérinaire X., est pour le veau d'un degré de virulence, qu'à l'ordinaire on trouve chez des bacilles d'origine bovine.

Le développement lent et peu abondant sur les milieux artificiels indique également des qualités bovines.

Ce résultat, en rapport avec la clinique, donne la certitude presque absolue, que X. a été infecté en examinant les porcs tuberculeux.

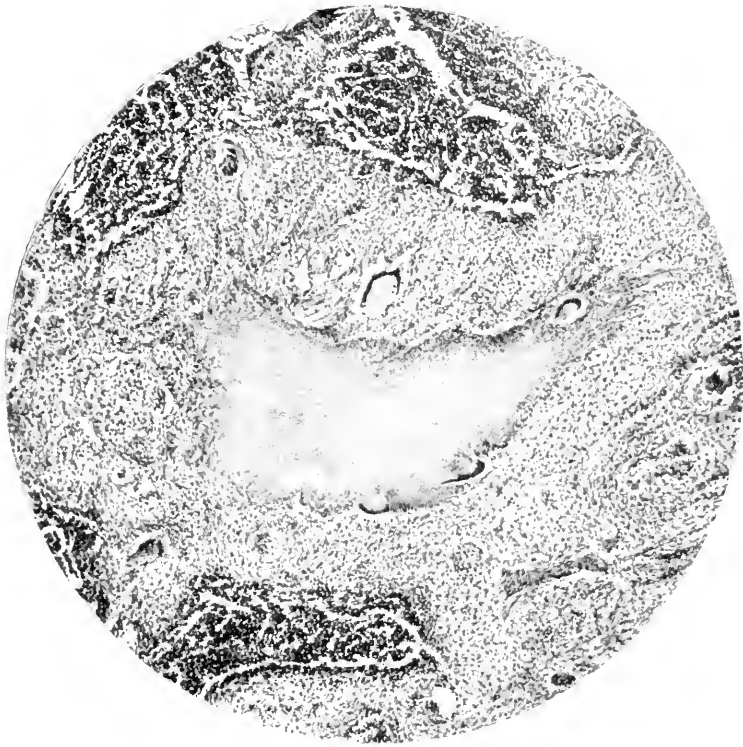
La tuberculose des porcs est presque toujours de provenance bovine ; aussi n'est il pas étonnant qu'à l'examen expérimental du cas en question, le caractère bovine du bacille se manifestait clairement.

L'étude de ce cas de tuberculose chez l'homme a démontré que le bacille de KOCH, provenant du porc tuberculeux, peut avoir également des qualités pathogènes pour l'organisme humain.

Quant à l'état de X. après l'extirpation du ganglion axillaire tuberculeux, il faut mentionner ce qui suit :

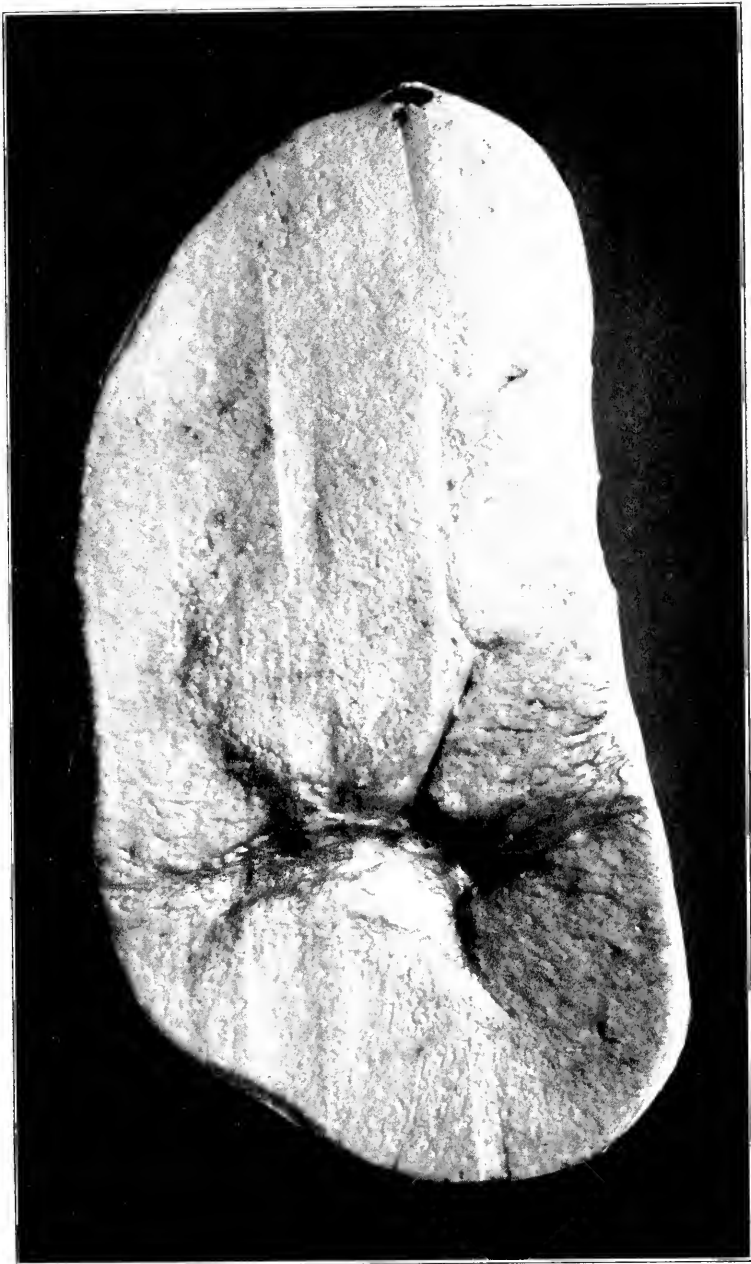
X. ne s'est plus senti des suites de l'infection. Les cicatrices au pouce et dans l'aisselle ne montrent rien de particulier et pour le reste le bras est normal aussi. A des examens réitérés nul symptôme suspect n'a été trouvé.

Octobre 1914.



Ganglion arillaire de l'homme.

Coupe, montrant des cellules géantes et épithéloïdes, un centre caseux et des lymphocytes Obj. A.A. oc. 3 ZEISS.



Ganglion préscapulaire droit du veau.

Totalement caséux et avec de petites hémorragies. ($\frac{3}{2}$ grandeur naturelle).



Poumon gauche du veau.
Parsemé de tubercules miliaires ($\frac{1}{3}$ grandeur naturelle).

[Aus dem Institut für Mikrobiologie der
Technischen Hochschule in Delft].

UEBER REDUZIERENDE EIGENSCHAFTEN DER ESSIGBAKTERIEN ¹⁾

VON

N. L. SÖHNGEN.

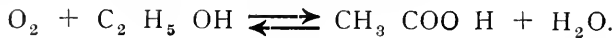
Von den biochemischen Umwandlungen durch Essigbakterien sind bis heute diejenige mehr speziell erläutert worden, welche eine Folge der oxydierenden Eigenschaften dieser Mikroben sind. Diese Tatsache darf wohl daran zugeschrieben werden, dass diese Eigenschaften im allgemeinen und besonders das Vermögen Alkohol zu Essigsäure oxydieren zu können, für diese Bakteriengruppe von grösster Bedeutung ist, während der technische Wert des letztgenannten Prozesses sofort die Interesse für weitere Untersuchungen zufolge hatte.

Zugleichzeitig aber, dass in Essigbakterienkulturen organische Substanzen oxydiert werden, entstehen reduzierte Verbindungen, welche aus den ursprünglich in der Kulturflüssigkeit anwesenden Substanzen wahrscheinlich durch hydrolytische Spaltung, Wasserstoffaddition und Sauerstoffentziehung entstehen. Die Reduktionserscheinungen mit anorganischen und einfachen organischen Verbindungen weisen darauf hin. Merkwürdig ist es, dass auf diesen Weg aus verschiedenen organischen Verbindungen wie Zuckerarten, organischen Säuren und Salzen sogar aus Essigsäure neben andern Produkten auch Alkohol gebildet wird.

Der für die Essigbakterien kennzeichnende Prozess der Alkohol-oxydation zu Essigsäure kann also, sei es auch in geringem

¹⁾ Mitgeteilt in der Sitzung der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie am 1 Juni 1914 in Delft.

Masse und unter Hinzufügung von Energie der Oxydationsprozesse, in umgekehrtem Sinne stattfinden.



Die Wasserstoffadition und Sauerstoffentziehung an anorganischen Verbindungen lässt sich leicht mittels der BEIJERINCKschen Methoden ¹⁾ nachweisen. So werden Schwefel, Sulfit, Thio-sulfate und Sulfate in Essigbakterienkulturen zu Schwefelwasserstoff reduziert. In Agar oder Gelatine-kulturen kann das Auftreten von Schwefelwasserstoff mittels darin verteilten Bleicarbonats sehr empfindlich angezeigt werden, indem Impfstriche von Essigbakterien sich auf solchen Böden durch Bildung von Bleisulfid schwarz färben.

In flüssigen Kulturen wird die Schwefelwasserstoffbildung mittels darüber gehängtes Bleipapiers festgestellt. Auf dieselbe Weise werden auch Selen- und Tellurverbindungen zum elementaren Zustande und weiter zu den höchst übelriechenden Wasserstoffverbindungen reduziert. Ebenso entsteht durch Schwefelwasserstoff aus Mangandioxyd Mangansulfid, dass an der Luft zu Mangansulfat oxydiert wird; doch muss bei diesem Versuch darauf geachtet werden, dass die Essigbakterien verschiedene Zuckerarten zu Oxysäuren oxydieren, welche mit Mangansuperoxyd Manganosalze bilden. Ein Verschwinden des hinzugefügten Mangansuperoxyds in solchen Kulturen deutet also nicht nur auf Schwefelwasserstoffentwicklung hin. Die folgenden Untersuchungen über die Reduktion organischer Verbindungen durch Essigbakterien, wobei vornehmlich die Bildung von Alkohol und Fehlingsche Lösung reduzierenden Körpern nachgegangen wurde, geschahen in Erlenmeyerschen Kolben von 450 c. c. Inhalt, versehen mit einem etwa 2 c. m. dicken Kulturflüssigkeitsschicht, während zwischen 28° und 30° kultiviert wurde. Die Kultur fand also unter aeroben Verhältnissen statt.

Als Kulturflüssigkeit diente meistens eine Lösung der organischen Verbindungen in Hefenextrakt, das zuvor durch auskochen vom Alkohol vollkommen befreit war. Es wurden aber auch einige Versuche mit Würze und eiweissfreien Kulturflüssigkeiten genommen. Wird an eine gut wachsende Essigbakterien-

¹⁾ Phénomènes de réduction produits par les microbes, Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles. Serie II, Tome IX p. 131.

kultur, z. B. eine Xylinum-oder Pasteurianum-kultur in Malzextrakt, Methylenblau hinzugefügt, so wird der Farbstoff bald in die Leukoverbindung umgewandelt und entsteht daraus wieder durch Schütteln der Kultur mit Luft. *Unter* der Oberfläche ist ein anaerober Zustand vorhanden und nur die Oberfläche, besonders an der Glaswand bleibt blaugefärbt. In diesem anaeroben Teil der Kultur werden die folgenden Reduktionsprozesse von organischen Verbindungen stattfinden. Glucose wird durch Essigbakterien zu Gluconsäure oxydiert, aber zugleichzeitig entsteht in den Kulturen Alkohol und Essigsäure. Sehr befriedigend ist die Alkoholbildung unter Xylinum-und Pasteurianum-häuten, besonders wenn die Glucosekonzentration 20 % bis 30 % beträgt. Neben viel Gluconsäure enthält dann die Flüssigkeit nach 14 Tage Kultur bis zu 1 % Alkohol. Die ebenfalls gefundene Essigsäure kann durch Oxydation von Alkohol, vielleicht auch durch intramolekulare Atmung entstanden sein nach der Formel:



Aldehyde oder Ketone konnten in der Kulturflüssigkeit nicht nachgewiesen werden.

Diese Prozesse finden also unter reichlichem Luftzutritt zur Kultur statt. Während der kräftigen Oxydation in der Oberfläche entstehen die reduzierten Verbindungen, welche sich im anaeroben Teil der Kultur unter der Oberfläche anhäufen können.

Unter anaeroben Umständen wird Glucose aber auch, sei es in sehr geringen Mengen, zu Kohlensäure und Alkohol zerlegt, wie dies aus Versuchen mit Xylinum-häuten in einer 5 %-igen Glucoselösung in Leitungswasser in geschlossenen Stöpfelflaschen hervorging. Essigsäure war nun aber nicht in der Lösung gebildet, sodass diese beim obengenannten Versuch sehr wahrscheinlich durch Oxydation des Alkohols entstanden war. Organische Säuren und Salze werden aber durch Acetobakter xylinum, so weit ich nachgehen konnte, unter anaeroben Umständen nicht zersetzt.

Wird nun weiter aus Glucose gebildete Gluconsäure oder Calcium-gluconat in Hefentrakt gelöst, den Essigbakterien unter aeroben Bedingungen als Nahrung geboten, so bilden sie

auch hieraus neben Dioxyaceton, Kohlensäure und Wasser wieder Alkohol, der nach 20 Tagen Kultur bei 28° C in einer 15 %-igen Calciumgluconatlösung in Hefenextrakt zu einem Betrage von fast 0,4 % vorhanden war. Als Impfmateriale dienten bei diesen Versuchen *Acetob. xylinum* — *Pasteurianum* oder — *rancens*. Kulturen mit Gluconsäure als Kohlenstoffquelle enthielten nur Spuren Alkohol.

Ich möchte hier beiläufig mitteilen, dass die Bereitung von Gluconsäurem Calcium aus Glucose zu einer Ausbeute von etwa 60 % gelingt, wenn Hefenextrakt mit 50 % Glucose und einem Ueberschuss von Kreide in Erlenmeyerschen Kolben in 2 bis 3 Zentimeter dicker Schicht mit *Acetob. Pasteurianum* oder — *rancens* infiziert wird und die Kultur bei 28° bis 30° getrieben wird. Auf diese Weise lässt sich das sehr teure Salz, und daraus Gluconsäure, billig herstellen.

In ganz ähnlicher Weise wie mit Calciumgluconat wurden Versuche angestellt mit Milchsäure, Aepfelsäure, Brenztraubensäure, Essigsäure und deren Calciumsalze, welche zum Resultat führten, dass auch aus diesen Verbindungen durch Essigbakterien kleine Mengen Alkohol gebildet werden. Eine *Pasteurianum*-kultur in Hefenextrakt mit 10 % Calciumlactat z. B. enthielt nach 10 Tagen Kultur bei 28° C 0,3 % Alkohol. Die Essigbakterien sind also imstande aus Milchsäure Alkohol und wie OSTERWALDER ¹⁾ beschrieb ebenfalls aus Alkohol Milchsäure zu bilden. OSTERWALDER kultivierte aber in Flaschen in hoher Flüssigkeitsschicht, während bei meinen Versuchen in Erlenmeyerschen Kolben bei gutem Luftzutritte kultiviert wurde. Die Versuche mit Essigsäure und Calciumacetat als Kohlenstoffnahrung, woraus die Essigbakterien auch Alkohol bilden, stellten die schon im Anfang dieser Mitteilung genannten Umkehrbarkeit des Prozesses der Alkoholydation zu Essigsäure fest.

¹⁾ Milchsäurebildung durch Essigbakterien, *Centralbl. f. Bakt. Abt. 2. Bd. 37, 1913, S. 353.*

[Aus dem Institut für Mikrobiologie der
Technischen Hochschule in Delft].

DIE OXYDATION VON SCHWEFELWASSERSTOFF DURCH BAKTERIEN 1)

VON

H. C. JACOBSEN.

Bekanntlich liefert die Natur fortwährend verhältnismässig grosse Quantitäten Schwefelwasserstoff. Nicht nur in den natürlichen Schwefelwasserstoff-haltigen Quellen, welche die Fundorte der Schwefelbakterien WINOGRADSKY's 2) waren, sondern auch überall in den Kanälen und Gräben, also den Schmutzwässern, findet sich dieses Gas. Besonders der schwarze Meeresschlamm der Küsten ist an Schwefelwasserstoff sehr reich.

Die Ursache für die Anwesenheit dieser Schwefelverbindung findet sich hauptsächlich in dem bekannten Prozess der Sulfatreduktion durch Bakterien, welcher überall wo der atmosphärische Sauerstoff schwer durchdringen kann und sonstige Bedingungen vorhanden sind, intensiv stattfindet.

Dennoch ist das Ungemach, welches durch das fortwährende Entstehen eines so übelriechenden Gases verursacht wird, nicht im Verhältnis mit der gebildeten Quantität. Zuzufolge der Unbeständigkeit des Schwefelwasserstoffs, der in wässriger Lösung leicht zu H_2O und S oxydiert werden kann, gelangt meistens nicht eine Spur in die Atmosphäre.

Nicht nur auf rein chemischen Weg verschwindet der Schwefelwasserstoff, sondern auch und vermutlich wohl in erster Linie durch die Tätigkeit von Mikroorganismen.

WINOGRADSKY hat dies für eine bestimmte Gruppe von

1) Mitgeteilt in der Sitzung der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie am 1 Juli 1914 in Delft.

2) WINOGRADSKY, S. Bot. Ztg. 1887. Bd 45 S. 489.

Bakterien festgestellt. Innerhalb der Körper der von ihm »Schwefelbakterien« genannten Organismen scheidet der durch Oxydation entstandene Schwefel in feinsten Tröpfchen sich ab. Diese Schwefeltröpfchen werden, wie WINOGRADSKY nachwies, weiter oxydiert sodass, wenn Schwefelwasserstoffmangel eintritt, die anfangs mit Schwefel überfüllten Zellen schliesslich ganz leer erscheinen. Der Schwefel wird zu Schwefelsäure oxydiert.

Schon WINOGRADSKY erkannte diesen Vorgang als ein an die Stelle der bei den meisten andern Organismen vorkommenden Atmung tredender Prozess, mit dem Unterschied, dass hier statt der Kohlenstoffverbindung der Schwefel als Energiequelle fungiert. Er studierte hauptsächlich ein Paar Vertreter der Gattung *Beggiatoa*, welche ihm als ein fast reines Material in einem an organischen Substanzen und Bakterien sehr armen Brunnenwasser zur Verfügung stand. Die Frage nach dem Ursprung des Kohlenstoffs, welchen seine *Beggiatoa*fäden zum Aufbau ihrer Zellsubstanz notwendig bedürftten, meinte er auf die Anwesenheit geringer Spuren humusartiger Verbindungen zurückführen zu müssen. Einen Beweis dafür hat er aber nicht erbracht.

Später hat KEIL ¹⁾ für *Beggiatoa* und *Thiothrix*, die er in Reinkultur gezüchtet hatte, festgestellt, dass diese Bakterien die Kohlensäure zu reduzieren imstande sind und also zu den autotrophen Organismen zu rechnen sind.

Mögen vielleicht andere Vertreter dieser Gruppe, ähnlich wie die von MOLISCH ²⁾ beschriebenen nahe verwandten »Purpurbakterien«, ihren Kohlenstoff organischen Verbindungen entnehmen können (worüber bisjetzt noch nichts Sicheres bekannt ist) so kann man für *Beggiatoa* und *Thiothrix* wohl annehmen, dass sie durch Chemosynthese sich ernähren.

Nicht weniger belangreich als die Schwefelbakterien für das Verschwinden des Schwefelwasserstoffs sind die kleinen stäbchenförmigen »*Thiobakterien*«. Diese von NATHANSOHN ³⁾ im Meerwasser, später von BEIJERINCK ¹⁾ im Süßwasser als die Erreger

¹⁾ KEIL, F. Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1912. Bd. 11 S. 335—372.

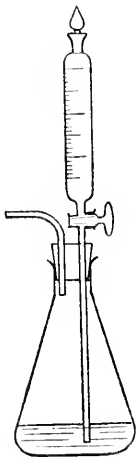
²⁾ MOLISCH, H. Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen. Jena, 1907.

³⁾ NATHANSOHN, A. Ueber eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. Mitth. aus der Zoolog. Station zu Neapel. 1902, Bd. 15, Heft 4, S. 655.

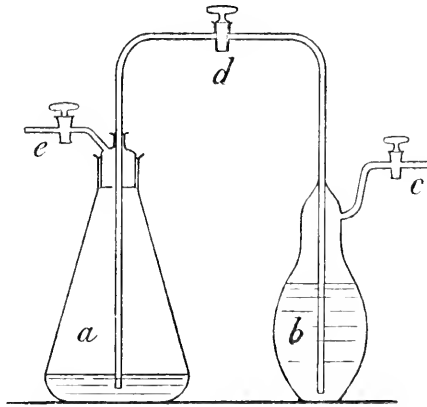
der Thiosulfatoxydation entdeckten und neuerdings von mir ²⁾ als schwefeloxydierende Organismen beschriebenen Bakterien, oxydieren den Schwefelwasserstoff in einer mit den »Schwefelbakterien« analogen Weise.

Auch bei der Schwefelwasserstoffoxydation durch die Thio-bakterien kann man zwei Phasen deutlich unterscheiden; erstens diejenige, worin der H_2S zu S und H_2O , und eine zweite, worin der abgeschiedene Schwefel zu H_2SO_4 oxydiert wird.

Durch nachstehende Versuchsanordnung lässt sich die H_2S -Oxydation durch Bakterien leicht demonstrieren. Den Gebrauch der hierneben abgebildeten Glasapparate kann ich hierbei empfehlen. Sie ermöglichen den ganzen Vorgang, sowohl mikroskopisch als auch quantitativ zu verfolgen, ohne dass dabei der Geruch des Schwefelwasserstoffs hinderlich zu sein braucht.



App. 1.



App. 2.

Der Apparat 1 eignet sich mehr für die Rohkulturen. Er besteht aus einem Erlenmeyerkolben von etwa 300—400 cc. Inhalt, welcher mittels eines mit Trichter und gebogene Glasröhre versehenen Gummistöpsels, verschlossen ist.

¹⁾ BEIJERINCK, M. W. Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können.

Centralbl. f. Bakt. 2. Abt. 1904, Bd. 11.

²⁾ JACOBSEN, H. C. Die Oxydation von elementarem Schwefel durch Bakterien. Folia Microbiologica 1912, Bd. 1, Heft 4, S. 485.

Man bringt 100 cc. einer mit Grabenschlamm, Gartenerde oder Meeresschlamm beimpften Kulturlösung:

H ₂ O	—	100	gramm
K ₂ HPO ₄	—	0,05	»
NH ₄ Cl	—	0,05	»
Mg Cl ₂	—	0,02	»
CaCO ₃ (MgCO ₃)	2		»
(NaCl	—	3	»)
Fe Cl ₃	—		Spur.

in den Kolben und lässt nach dem Aufsetzen des Stöpsels aus dem graduierten mit Hahn und Stöpsel versehenen Trichter, welcher mit H₂S-Wasser gefüllt wird, anfangs eine sehr kleine Quantität hinzufließen.

Der Gehalt des H₂S-Wassers wird zuvor durch Titrieren mit Jodlösung bestimmt. Zu diesem Zwecke lässt man eine bestimmte Quantität in eine abgemessene überschüssige zehntelnormal Jodlösung fließen, worin der H₂S zu HJ und S oxydiert wird. Das unverbrauchte Jod wird mit zehntelnormal Thiosulfatlösung zurücktitriert,

Weil Schwefelwasserstoff ein starkes Bakteriengift ist, auch für die Thiobakterien, von denen die Süßwasserformen am empfindlichsten sind, füge man im Anfang nicht mehr als 1—2 Mgr. H₂S pro 100 cc. der Flüssigkeit hinzu. Eine Konzentration von 50 Mgr. pro Liter tötet die meisten der Thiobakterien innerhalb 24 Stunden, während kräftige Bakterienarten wie *Bac. coli*, *Bac. fluorescens* und *Bac. prodigiosus* darin noch lebendig geblieben sind.

Die Anwesenheit der anfänglich zugegebene Menge des H₂S (1—2 Mgr.) ist an dem Geruch deutlich bemerkbar und nachdem man den Kolben ein bis zwei Tage im Brutschrank bei 30° C. kultiviert hat, kann man nach Abheben des Kautschukverschlusses feststellen, dass dieser Geruch verschwunden, der H₂S also vollständig oxydiert worden ist. Man kann nun aufs neue eine kleine Menge H₂S zusetzen und nach dessen Verschwinden dasselbe wiederholen.

Nach kurzer Zeit sieht man eine dünne Bakterienhaut an der Oberfläche der Flüssigkeit sich bilden. Man findet darin beim Mikroskopieren eine Unmenge kleiner Bakterien, welche teilweise stark beweglich sind oder auch in unbeweglichem

Zustände im Bakterien Schleim sich vorfinden. Zugleichzeitig nimmt man eine grössere Anzahl kleiner stark lichtbrechender Schwefeltröpfchen wahr.

Bemerkenswert ist es, dass man, auch bei sorgfältigster Beobachtung, niemals diese Schwefeltröpfchen in den Bakterienkörpern zu finden vermag. Wenigstens habe ich bei vielen Beobachtungen niemals den Eindruck bekommen, dass das erste Produkt der Oxydation, der elementare Schwefel, wie es bei den grösseren Schwefelbakterien WINOGRADSKY's der Fall ist, in den Zellen sich absetzt; im Gegenteil fand ich sie ausschliesslich ausserhalb.

In wiefern der Schwefel in gelöster bezw. kolloidal-gelöster Form in den kleinen Thiobakterien vorkommen kann, muss natürlich unentschieden bleiben. Der weitere Verlauf des Prozesses hat mich überdies in der Meinung gestärkt, dass die Schwefelabscheidung in den betreffenden Kulturen in der Tat »extrazellular« stattfindet.

Sobald die Bakterienhaut sich gebildet hat, kann man die Mengen des H_2S — Wassers, welche man hinzufügt, steigern ohne dass dadurch die Bakterien wie im Anfang geschadet und der Prozess dadurch gehemmt wird.

Ja, man kann bei den älteren Kulturen 20—30 Mgr. H_2S zu gleicher Zeit zugeben; eine Quantität, welche sonst sicher tödend wirkt. Man bemerkt alsdann, dass eine solche schleimige Haut, welche nach vollständiger Oxydation des Schwefels, nicht mehr weisslich trübe, sondern durchscheinend aussieht, innerhalb kurzer Zeit (eine halbe Stunde) nach Hinzufügung des H_2S wieder stark getrübt ist durch ausgeschiedenen Schwefel. Diese Oxydation vollzieht sich sehr schnell und in wirksamen Kulturen kann nach etwa zwei Stunden der H_2S schon gänzlich verschwunden sein. Die weitere darauffolgende Verbrennung des Schwefels in der Bakterienhaut beansprucht eine bedeutend längere Zeit. Während nämlich die erste Stufe der Oxydation zu S und H_2O schon nach wenigen Stunden zuende geführt ist, dauert es 2 bis 3 Tage bevor die zweite Phase, die vollständige Verbrennung zu H_2SO_4 , beendet ist.

Es stimmt dies mit meinen früheren Beobachtungen, wobei unter günstigen Bedingungen in drei Wochen maximal 180 Mgr. präzipitierter Schwefel oxydiert wurden, gut überein. Im Ver-

gleich mit andern bakteriellen Vorgängen gehören diese auf der Reduktion der Kohlensäure sich gründenden Prozesse, zu den langsamen. Auf Grund der Tatsache, dass die erste Phase in diesem Vorgang so schnell sich vollzieht, muss man wohl zum Schluss kommen, dass man es hier bei der Oxydation von H_2S zu H_2O und S nicht mit einer auf die hierbei freiwerdende Wärmeenergie beruhenden chemo-synthetischen Ernährung zu tun hat.

Nur kann man sagen, dass die an der Oberfläche der Flüssigkeit sich befindenden Thiobakterien auf den giftigen Schwefelwasserstoff eine spezifische oxydierende Wirkung ausüben und denselben in kurzer Zeit unschädlich machen. Offenbar erfüllt diese Bakterienhaut die Stelle eines Sauerstoffübertragers. Diese Schlussfolgerung ist ganz im Einklang mit der mikroskopischen Wahrnehmung, dass die Schwefeltröpfchen nur ausserhalb der Bakterien zu finden sind. Von welcher Natur die hier beschriebene oxydierende Wirkung der Thiobakterien ist, konnte ich bisjetzt noch nicht feststellen, beabsichtige aber diese Frage näher zu untersuchen.

Sowie bei den Versuchen über die Oxydation des elementaren Schwefels, stellte es sich auch hier heraus, dass die Oxydation in den salzhaltigen mit Meeresschlamm infizierten Kulturen bedeutend schneller verlief wie in den Süsswasserproben. Auch konnte hierbei mit Vorteil statt des Calciumcarbonats das mehr alkalische Magnesiumcarbonat zur Bindung der Säure verwendet werden.

Wie gross die maximale Quantität des H_2S ist, welche in diesen Kulturen in einem bestimmten Volum verarbeitet werden kann, ist schwer zu sagen, weil dieser Stoff nicht in Übermass vorhanden sein kann und man ihn von Zeit zu Zeit in abgemessenen Dosen hinzufügen muss.

Über die in den Rohkulturen auf den Vordergrund tretenden Bakterien sei hier hervorgehoben, dass sie zu der von BEIJERINCK *Thiobacillus thioparus* genannten Art zurückzubringen sind. Die Erkennung und Reinkultur gelingt ziemlich leicht auf Agarplatten, welche ausser den gewöhnlichen Nährsalzen noch 0,5 Proz. $Na_2S_2O_3$ 5 aq. und ein wenig $CaCO_3$ enthalten. Die Kolonien der Thiobakterien unterscheiden sich hierauf von den andern sich vorfindenden Bakterien, durch die Einlagerung von Schwefeltröpfchen und die Auflösung des $CaCO_3$ durch Säure-

bildung. Mit den Reinkulturen können die Versuche über die H_2S -Oxydation ebensogut wie mit den Rohkulturen ausgeführt werden; der Verlauf ist ganz derselbe.

Alle die aus den H_2S -Oxydationen isolierten Stämme waren imstande sowohl den elementaren Schwefel als das Thiosulfat zu oxydieren. Für die quantitative Bestimmung der aus dem Schwefelwasserstoff gebildeten Produkte fand der Apparat 2 Anwendung.

Dieser Glasapparat, welcher sterilisiert werden kann, besteht aus einem Kulturgefäß (a) in der Gestalt eines Erlenmeyerkolbens und einem Behälter (b) für H_2S -Wasser. Diese zwei Teile stehen, wie es die Figur angibt, durch eine mit einem Glashahn d versehene gebogene Röhre mit einander in Verbindung und können durch die Hähne c und e geschlossen werden.

Der Behälter b wird vorher evakuiert und man lässt dann eine genau gemessene H_2S -Lösung von bekannter Konzentration aus einer Bürette, welche einerseits mit einem Reservoir mit H_2S -Wasser in Verbindung steht und daraus gefüllt wird, anderseits mit einem kurzen Kautschukschlauch mit dem Hahn c verbunden ist, hineinfließen. Darauf wird b mit Wasserstoffgas ganz gefüllt. Durch Öffnen des Hahnes d ist man in der Lage eine beliebige Menge des H_2S -Wassers in den geimpften mit Nährlösung beschickten Kulturkolben hineinzulassen. Anfangs genügt hierzu der bei höherer Temperatur in dem Gefäß b auftretender Druck, später wird der Hahn c mit einem Wasserstoffapparat in Verbindung gebracht und also durch Öffnen der Hähne das H_2S -Wasser übergepresst.

Der Sauerstoff der Luft, der in dem Kulturgefäß verdrängt und durch die Bakterien verbraucht wird, kann wenn nötig durch Ausaugen eines Teiles des restierenden Gasgemisches und Einfüllen von reinem Sauerstoff oder durch Luft ersetzt werden.

Nach Beendigung der Kultur, wenn der Vorrat des H_2S -Wassers grösstenteils verbraucht ist, wird die übriggebliebene Quantität mit Jodlösung titriert und das gebildete Sulfat und der eventuell noch vorhandene freie Schwefel bestimmt. Die Kulturflüssigkeit wird dazu abfiltriert; im Filtrat das Sulfat auf übliche Weise und der auf dem Filter zurückgebliebene Schwefel nach Oxydation mit Brom und Kalilauge ebenfalls als Ba SO_4 bestimmt.

Es ergab sich, dass der verbrauchte Schwefelwasserstoff quantitativ zu Schwefelsäure oxydiert wurde.

Durch diese Versuchsanordnung konnte leicht nachgewiesen werden, dass auch bei der Oxydation von als Schwefelwasserstoff den Bakterien dargebotenem Schwefel, das Bakterienmaterial durch Reduktion der Kohlensäure gebildet wird. Lässt man nämlich in dem ganz von der Luft abgeschlossenen Apparat 2 in der Kulturflüssigkeit absichtlich das Carbonat fort, so gelingt es nicht die Bildung von Schwefelsäure und Wachstum der Bakterien zu erzielen. In diesem Falle wurde statt des Magnesiumcarbonats, für die Neutralisierung möglicherweise sich bildender Säure, stark geglühtes MgO zugefügt, welches bei Anwesenheit von freier Kohlensäure, die Entwicklung ermöglicht. Wie gesagt blieb dieselbe vollständig aus.

Dass bei Vorhandensein des Carbonats als Kohlensäurequelle in der anfangs an organischen Substanzen sehr armen Kulturlösung bei der Oxydation des H_2S eine Zunahme dieser Verbindungen tatsächlich stattfindet, wurde durch Analyse festgestellt.

Der Inhalt des Kulturkolbens wird zu diesem Zwecke nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure zur Zerstörung des unzersetzten Carbonats auf dem Wasserbade bis etwa 30 cc. eingedampft. Darauf kann die organische Substanz darin nach der Methode DESGREZ ¹⁾ als Kohlensäure bestimmt werden.

In der ursprünglichen Kulturflüssigkeit wurde ebenfalls den Gehalt an organischen Verbindungen, welche nur sehr gering war, bestimmt. Auf diese Weise konnte eine ansehnliche Steigerung der organischen Substanz nachgewiesen werden.

Die genauen Zahlen der bei diesen Analysen erhaltenen Resultate hoffe ich später zu veröffentlichen.

Durch die hier beschriebenen Versuche glaube ich bewiesen zu haben, dass die Thiobakterien bei der Oxydation des Schwefelwasserstoffs in der zweiten Phase (die Verbrennung des abgeschiedenen Schwefels zu Schwefelsäure) autotroph sich ernähren. Es ist dies dann auch mit den bei dem Studium der Oxydation des freien Schwefels erhaltenen Resultaten in Übereinstimmung.

¹⁾ CALMETTE, A. Recherches sur l'épuration biol. et chim. des eaux d'égout. Analyse des eaux d'égout. 1^{er} Supplément. 1908. p. 42.

BUCHBESPRECHUNG.

Tijdschrift voor vergelijkende geneeskunde, gezondheidsleer en parasitaire en infectieuse dierziekten, onder redactie van Prof. Dr. D. A. DE JONG, te Leiden. Deel I, Aflevering 1, Leiden S. C. VAN DOESBURGH. (Zeitschrift für vergleichende Medizin, Hygiene, parasitäre und infektiöse Tierkrankheiten. Herausgegeben van Prof. Dr. D. A. DE JONG, Leiden. Band I, Heft I, Leiden, S. C. VAN DOESBURGH.)

Mitten im Europäischen Kriegsgewoge erscheint auf unsrem neutralen Boden, wo man glücklicherweise noch wissenschaftlich arbeiten kann, diese neue Zeitschrift, welche wohl von keinem Berufeneren als DE JONG geleitet werden könnte. Die Arbeiten dieses Heftes sind alle in holländischer Sprache publiziert, obwohl unter den Mitarbeitern auch einzelne Ausländer genannt sind.

Die Publikation dieses neuen Organs erscheint wohl berechtigt; der Prospekt sagt darüber ungefähr Folgendes. Menschliche und Tiermedizin sind sehr eng mit einander verknüpft. Das zeigt sich bei verschiedenen, infektiösen sowie parasitären Tierkrankheiten, welche auf den Menschen übergreifen können. Auch können Tiere die Entwicklungsstadien menschlicher Parasiten beherbergen. So bringt der Gebrauch tierischer Produkte im menschlichen Haushalt vielerlei Gefahren mit sich. Es gibt also in dieser Richtung nicht nur rein wissenschaftliche, sondern auch wichtige praktisch-hygienische Fragen. Schliesslich deckt sich die experimentelle Pathologie, und i. Bes. die moderne Mikrobiologie mit dem Arbeitsgebiet der neuen Zeitschrift.

Das erste Heft enthält die folgenden Arbeiten:

D. G. UBBELS, *Trichinenkrankheit in Holland*. — Der Autor weist darauf hin, dass wir noch nicht genau bekannt sind mit der Frequenz von Trichinosis bei Schweinen aus *allen* Teilen Hollands. Diese Kenntnis brauchen wir aber mit Rücksicht auf die Einführung eines Reichskontrollgesetz für Fleisch.

E. A. R. F. BAUDET behandelt die *Parasiten der Krätze* und gibt an der Hand von instruktiven Mikrophotogrammen die differentialdiagnostische Merkmale zwischen Sarcptes, Psoroptes und Chorioptes.

E. QUADKKEKER empfiehlt für die Diagnose von *Milzbrand* in Kadavern *Färbungsmethoden* welche Kapselsubstanz und Stäbchen differenzieren. Dazu kann man wählen zwischen den Methoden von FOTH oder GIEMSA.

J. R. F. RASSERS behandelt *drei Fälle von Milzbrand* bei Menschen. Zwei davon waren atypisch, heilten leicht, während die bakteriologische Untersuchung eine Begleitinfektion mit Proteus, und mit Coli und Paratyphus (als Antagonisten) anzeigte. Ein dritter Fall von reiner Milzbrandinfektion dagegen verlief tödlich, und trotzte jeder Behandlung.

D. A. DE JONG publiziert die Arbeit über *Vogeltuberkelbazillen bei Säugetieren*, welche schon in dieser Zeitschrift (B. III, H. 1.) erschienen ist.

J. ROOS weist darauf hin, dass die Bakterien der paratyphus-enteritis-Gruppe die Saccharose nicht vergären dürfen. Hat man die Pepton-Kochsalzlösung mit Natriumkarbonat neutralisiert, so kann durch die Säurebildung Kohlensäure frei werden. Man soll darum, wenn überhaupt, den Nährboden nur mit NaOH alkalisieren.

W. C. DE GRAAFF bestätigt dass die Bakterien der paratyphus-enteritis-hogcholera-Gruppe die Saccharose nicht vergären. Einige (9) genau bestimmten Coli-Stämme verhielten sich in dieser Hinsicht verschieden: einzelne vergärten die Saccharose, andere nicht. Saccharose-haltige Nährböden sind also in diagnostischer Hinsicht für die coli-typhus-paratyphus-Gruppe ohne Wert.

T. VAN HEELSBERGEN beschreibt eine Entensterbe, verursacht durch eine Mischinfektion von Staphylokokken und Colibazillen. Nur die Kombination war tödlich bei den Fütterungsversuchen, nicht jeder Stamm für sich.

J. G. S.

STÄNDIGE MITARBEITER DER FOLIA MICROBIOLOGICA:

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,¹² Utrecht –
C. A. PEKELHARING, Utrecht – H. E. REESER,
Rotterdam – N. L. SÖHNGEN, Delft – C. H. H. SPRONCK,
Utrecht – C. S. STOKVIS, Amsterdam.

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica“ veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u. A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

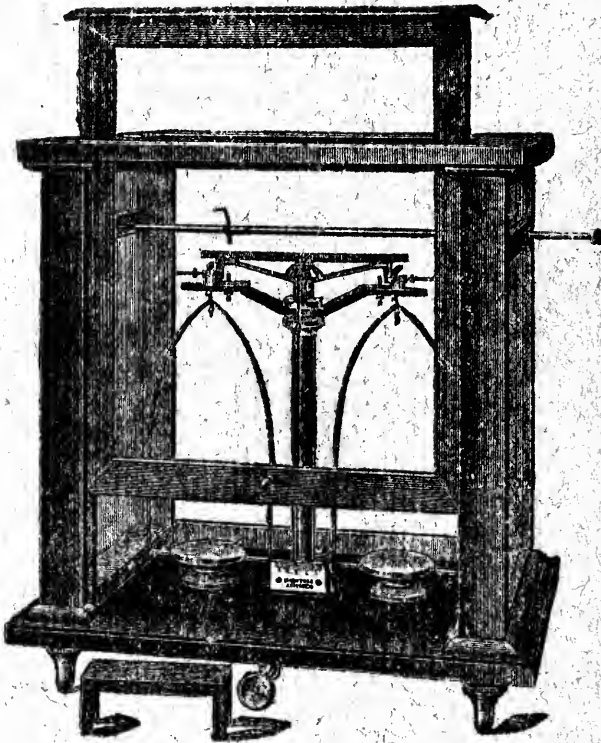
Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Artikel kostenfrei.

Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 3–4 Mal jährlich. Der Jahrgang von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie) fl. 12.—, 20 Mark, fr. 24.—, £ 1, § 5 (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica“ sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

BECKER'S SONS

WESTZEEDIJK 51-57.



ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN- EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN VAN BESTUUR, ENZ. ENZ.

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHELDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY

FOLIA MICROBIOLOGICA.

HOLLÄNDISCHE BEITRÄGE ZUR
GESAMTEN MIKROBIOLOGIE.

HERAUSGEGEBEN VON:

M. W. BEIJERINCK, DELFT.

A. KLEIN, GRONINGEN.

J. POELS, ROTTERDAM.

J. G. SLEESWIJK, DELFT.

III. JAHRGANG, HEFT 3.

AUSGEGEBEN AM 20. MAI 1915.

SCHLUSSHEFT DES III. BANDES.

(FÜR INHALT UND VERZEICHNIS DER MITAR-
BEITER, SIEHE INNENSEITE DES UMSCHLAGES).

ADMINISTRATION UND VERLAG DER

FOLIA MICROBIOLOGICA:

PHOENIXSTRAAT 18, DELFT. (HOLLAND.)

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP

: VOORHEEN :

: J. C. TH. MARIUS :

GANZENMARKT 4-10, UTRECHT

SPECIALITEIT:

**INRICHTING EN COMPLETEERING VAN
WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA**

**MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN
VAN CARL ZEISS TE JENA EN
R. WINKEL TE GÖTTINGEN**

**MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN
MICRO-PROJECTIE APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN**

INHALT.

	Seite
C. VAN WISSELINGH. Ueber die Anwendung der in der organischen Chemie gebräuchlichen Reaktionen bei der Phytomikrochemischen Untersuchung. (Mit 1 Tafel)	165
C. W. BROERS, The bacteriological diagnosis of Diphtheria	199
J. J. VAN LOGHEM. Bacterium (Proteus) anindolo- genes n. sp.	212
H. SCHORNAGEL. Beitrag zur Wertbestimmung der Tuberkulinprobe beim Huhn nach van Es und Schalk (Mit 1 Tafel).	220
J. IDZERDA. Ueber die kultivierbare Bakterienmenge menschlicher Fäzes	227

VEREENIGING voor MIKROBIOLOGIE.

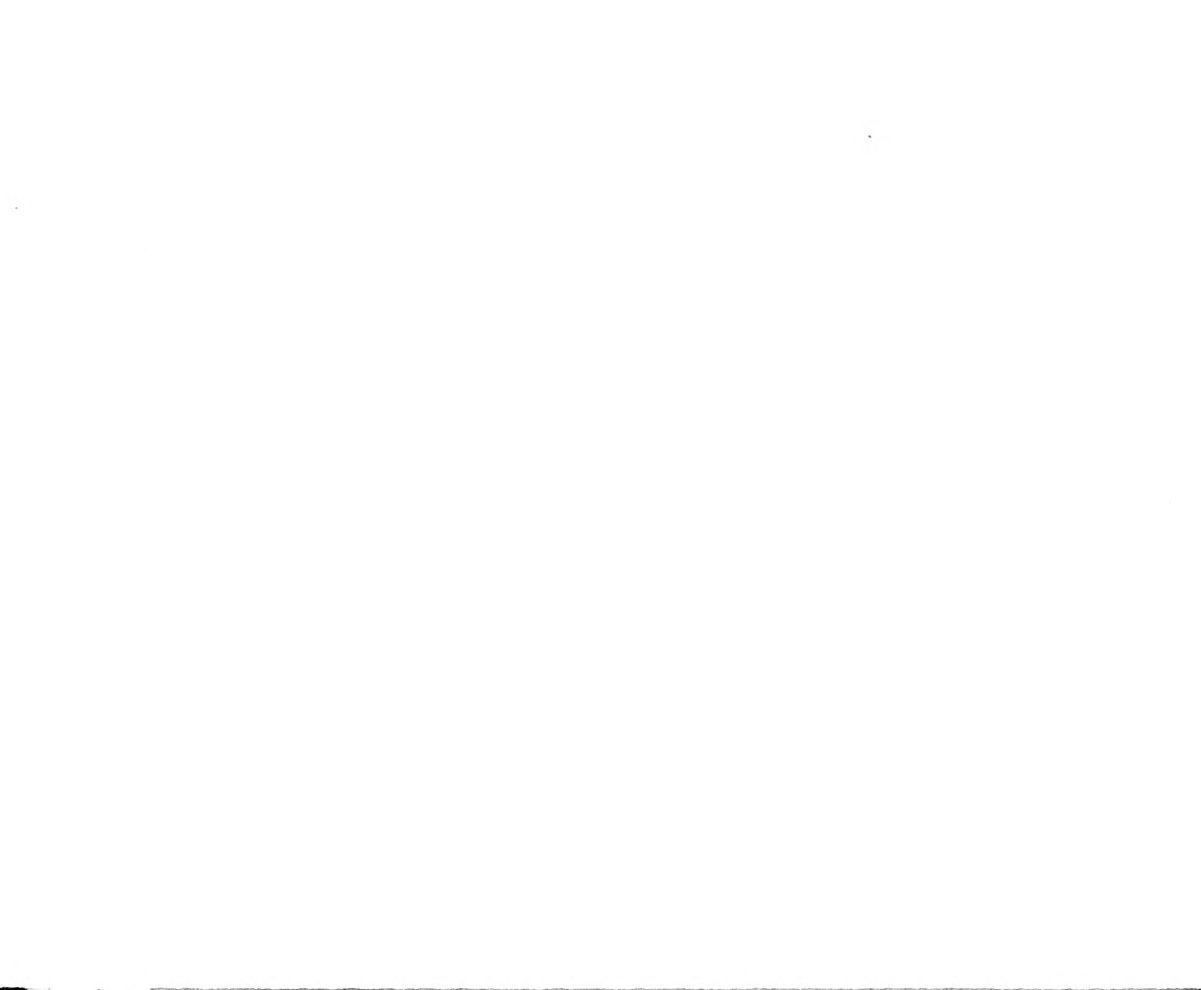
Het Bestuur bericht aan de Leden, dat in het begin van Juli de jaarlijksche zomervergadering zal worden gehouden. Zij, die eene voordracht of mededeeling ten beste wenschen te geven, worden uitgenoodigd, daarvan ten spoedigste aan ondergeteekende mededeeling te doen.-

Namens het Bestuur,

J.G.Sleeswijk.

Secretaris

1ft, Mei 1915.



ÜBER DIE ANWENDUNG DER IN DER ORGANISCHEN CHEMIE GEBRÄUCHLICHEN REAKTIONEN BEI DER PHYTOMIKROCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG.

VON

C. VAN WISSELINGH.

Professor der Pharmazie an der Universität in Groningen.

Einleitung.

Besonders während der letzten zehn oder zwanzig Jahre hat es sich gezeigt, welche grosse Bedeutung die Chemie für das Studium der Botanik hat. Im Jahre 1905 erschien das Handbuch von F. CZAPEK »Die Biochemie der Pflanzen«. Wie sehr diese grosse wertvolle Arbeit einem groszen Bedürfnis entsprach, geht daraus hervor, dasz schon im Jahre 1913 eine zweite, ganz umgearbeitete Auflage herausgegeben wurde. Auch das Studium der Mikrochemie der Pflanzen erregt während der letzten Zeit mehr das Interesse und demselben wird jetzt mehr Wert beigelegt als es früher der Fall war. Über diesen Teil der Phytochemie erschienen auch im Jahre 1913 ungefähr gleichzeitig zwei Handbücher, die »Pflanzenmikrochemie« von O. TUNMANN und die »Mikrochemie der Pflanze« von H. MOLISCH, welche einem von mehreren Forschern gefühlten Bedürfnis entsprachen. TUNMANN sah mit Recht ein, dasz man für diesen Teil der Phytochemie einen Namen benötigte und gewisz werden die Namen Pflanzenmikrochemie und Phytomikrochemie Eingang finden.

Wenn man die Frage stellt, ob man nicht nur der makrochemischen Untersuchung der Pflanzen, sondern auch der Phytomikrochemie groszen Wert beilegen darf, so meine ich, dasz man diese Frage sehr bestimmt bejahen musz. Vorteile der phytomikrochemischen Untersuchung sind die geringe Quantität des Materials, welche erforderlich ist, die einfachen Hilfsmittel, welche für die Untersuchung genügen und die relativ kurze Zeit, welche sie beansprucht. Bei der makrochemischen Untersuchung musz man sich oft auf einige besonders dafür geeignete Objekte beschränken, weil man in vielen Fällen das Material nicht in hinreichender Quantität bekommen kann und die erforderliche Zeit fehlt. Sich stützend auf die Resultate der makrochemischen Untersuchung, kann man in solchen Fällen durch mikrochemische Versuche die Kenntnis der Chemie der Pflanzen oft bedeutend erweitern. Mit ein paar Beispielen will ich dieses erläutern.

Als GILSON ¹⁾ und WINTERSTEIN ²⁾ durch ihre bahnbrechende Untersuchungen über die Chemie der Pilzmembranen in einigen Fällen nachgewiesen hatten, dasz sie keine Zellulose sondern Chitin enthielten, wurde bald darauf eine mikrochemische Methode für den Chitinnachweis ausfindig gemacht ³⁾. Dadurch konnte leicht die chemische Untersuchung der Pilzmembranen über einhundert Objekte ausgedehnt werden, wobei es sich zeigte, dasz mit wenigen Ausnahmen das Chitin bei Fungi allgemein vorkam ⁴⁾.

¹⁾ E. GILSON, Recherches chimiq. sur la membr. cell. des champignons. Extr. de la Revue »La Cellule« t. XI, 1^r fasc. (1894). — Bull. de la Soc. chimiq. de Paris, No. 23 (1894). — Das Chitin und die Membranen der Pilzzellen. Ber. d. D. chem. Ges., Jahrg. XXVIII (1895), Heft 7, p. 821. — De la présence de la Chitine dans la membr. cell. des champignons. Extr. des Compt. rend. d. séance de l'Acad. d. scienc., mai 1895.

²⁾ E. WINTERSTEIN, Zur Kenntnis der Pilzzellulose. Ber. d. D. bot. Ges. Bd. XI (1893), p. 441. — Über Pilzzell. ebenda Bd. XIII (1895), p. 65. — Zur Kenntn. der in den Membranen der Pilze enthaltenen Bestandteile. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XIX (1893), p. 521 u. Bd. XXI (1895), p. 134. — Über ein Stickstoffhaltiges Spaltungsproduct der Pilzzell. Ber. d. D. chem. Ges. Bd. XXVII (1894), p. 3113. — Über die Spaltungsprodukte der Pilzzellulose, ebenda Bd. XXVIII (1895), p. 167.

³⁾ C. VAN WISSELINGH, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXXI (1898), p. 637.

⁴⁾ l. c. p. 684.

Von den gelben, orangenen und roten Farbstoffen, welche man unter dem Namen Carotinoide ¹⁾ zusammenfasst, sind bis jetzt nur einige makrochemisch untersucht worden. Hunderte von Kilogrammen Material müssen manchmal verarbeitet werden, um nur wenige Gramme reinen Farbstoffs zu erhalten. Eine einfache mikrochemische Untersuchung setzt uns instand in vielen Fällen wichtige Tatsachen betreffs der Anwesenheit dieser Körper in den Pflanzen festzustellen ²⁾. Diesen beiden Beispielen können leicht noch andere hinzugefügt werden.

Noch mehr fällt die Bedeutung der mikrochemischen Untersuchung auf, wenn man berücksichtigt, dass auf mikrochemischem Wege Resultate erzielt sind, welche anfangs nicht mit denen der makrochemischen Untersuchung übereinstimmten, aber später gerade durch solche Untersuchung bestätigt wurden. Als Beispiel nenne ich die Untersuchungen über die Korkzellwand. Ein Teil dieser Wand, nämlich die Korklamelle besteht aus eigentümlichem Zellstoff, dem sogenannten Korkstoff oder Suberin. Vor ungefähr 25 Jahren hatten die Forscher verschiedene Meinungen über die chemische Natur dieses Zellstoffes. Auf Grund makrochemischer Untersuchungen betrachtete KÜGLER ³⁾ das Suberin als ein Gemisch von echten Fetten. GILSON ⁴⁾ war mit dieser Ansicht nicht einverstanden, weil die Korklamelle beim Erwärmen bis auf ungefähr 300° C nicht schmilzt und weil sie in Alkohol, Aether und Chloroform unlöslich ist. Er betrachtete das Suberin, gleichfalls auf Grund makrochemischer Untersuchungen, als ein Gemisch von zusammengesetzten Aethern, die wenig schmelzbar und unlöslich in Alkohol, Aether, Chloroform u.s.w. waren oder als ein Produkt von Kombination, Kondensation oder Polymerisation von Säuren oder ihren Derivaten.

¹⁾ Siehe besonders R. WILLSTÄTTER und A. STOLL, Untersuchungen über Chlorophyll usw. (1913), p. 231.

²⁾ C. VAN WISSELINGH, On the demonstration of carotinoids in plants. Koninkl. Akad. van Wetensch. at Amsterdam, Proceeding 1912, p. 511, 686 u. 693. — Über die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze. Flora, N. F. 7. Bd. Heft 4, (1915) p. 371.

³⁾ K. KÜGLER, Über den Kork von Quercus Suber. Archiv der Pharmacie 22. Bd., 6. Heft, p. 217.

⁴⁾ E. GILSON, La subérine et les cellules du liège. La Cellule t. VI, 1^{er} fasc. Sep. Abdruck p. 44.

Die von mir ¹⁾ auf mikrochemischem Wege erzielten Resultate hielten die Mitte zwischen den Ansichten der beiden obengenannten Forscher. Nach mir kommen in der Korklamelle bei ziemlich niedriger Temperatur schmelzbare und nicht schmelzbare Stoffe vor, wie aus der folgenden 1892 gegebenen Zusammenfassung meiner Resultate hervorgeht: Ich halte es für erwiesen, dass schmelzbare und in Chloroform lösliche Stoffe eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung der verschiedenen Korklamellen spielen, dass man diese Stoffe verseifen und aus denselben Säuren absondern kann. Wenn ich hierbei die Absonderung von Glycerin aus dem Kork von *Quercus Suber* berücksichtigt, so bin ich geneigt das Suberin in seinen verschiedenen Modifikationen als ein Produkt zu betrachten, das aus Fetten oder mit diesen ähnlichen Stoffen, aus Glycerylestern oder anderen zusammengesetzten Aethern, und aus einem oder mehreren in Chloroform unlöslichen, nicht schmelzbaren Stoffen zusammengesetzt ist, welche alle durch Kalilauge auf eine mehr oder weniger ähnliche Weise zersetzt werden ²⁾.

Nach den späteren makrochemischen Untersuchungen von VON SCHMIDT ³⁾ besteht der Korkstoff teils aus unlöslichen Anhydriden und Polymerisationsprodukten fester und flüssiger Fettsäuren und teils aus Glycerinestern von Fettsäuren, zum Teil deshalb auch aus schmelzbaren und löslichen Stoffen. Die Resultate, die ich vor mehr als zwanzig Jahren auf mikrochemischem Wege erhielt, sind also in Übereinstimmung mit denen der letzten makrochemischen Untersuchungen.

Aus obigem geht hervor, dass die mikrochemische Untersuchung Fragen beleuchten kann, deren Lösung auf makrochemischem Wege mit groszen Schwierigkeiten verbunden ist.

Grosze Bedeutung hat die phytomikrochemische Untersuchung für das Studium der Lokalisation der chemischen Körper in den Geweben, den Zellwänden und dem Zellinhalt. Mit

¹⁾ C. VAN WISSELINGH, Sur la lamelle subéreuse et la subérine. Arch. Néerl. T. XXVI, p. 305.

²⁾ l. c. p. 347.

³⁾ M. VON SCHMIDT, Zur Kenntnis der Korksubstanz, II. Mitteilung, Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wiss. Wien, CXII. Bd. Abt. II b, Jahrg. 1903, p. 1134 und III. Mitteilung, l. c. CXIX. Bd. Abt. II. b, Jahrg. 1910, p. 241.

großer Genauigkeit kann man bestimmen, welche Zellwände oder Teile von Zellwänden Zellulose und Chitin enthalten, aus suberinartigen Stoffen bestehen, kutikularisiert und verholzt sind. Für viele Bestandteile des Zellinhalts ist das Vorkommen im Cytoplasma, in den Chromatophoren, in dem Kern oder im Zellsaft festgestellt.

Für das Studium des Wachstums der Zellwand halte ich es von großer Bedeutung, dass die chemischen Modifikationen, welche die Zellwand während ihrer Entwicklung erleidet, festgestellt werden. Ungefähr vor einem Vierteljahrhundert widmeten Forscher ersten Ranges dem Studium des Zellwachstums ihre besten Kräfte. Es scheint, dass jetzt dieses Studium durch andere Probleme zurückgedrängt ist, obschon das ebenfalls sehr interessante Problem des Zellwachstums bei weitem noch nicht in einer befriedigenden Weise gelöst ist. Größtenteils führe ich dieses auf die geringe Aufmerksamkeit zurück, welche man beim Studium des Zellwachstums den chemischen Modifikationen gewidmet hat. Dass man beim Studium dieser Modifikationen besonders mikrochemische Arbeit leisten muss, liegt auf der Hand.

Für das Studium vieler physiologischen Probleme ist die Feststellung der chemischen Änderungen in dem Zellinhalt von großer Bedeutung. Sowohl von makrochemischen als von mikrochemischen Untersuchungen darf man auf diesem Gebiet wichtige Resultate erwarten. Wenn man aber die Änderungen des Zellinhalts beim lebenden Objekt studieren will, sind makrochemische Untersuchungen ausgeschlossen, während man mikrochemische Methoden manchmal mit Erfolg anwenden kann. Als Beispiel nenne ich die Antipyrin- und Caffein-Methode, welche ich bei der Untersuchung nach der physiologischen Bedeutung des Gerbstoffes anwendete ¹⁾.

Obschon ich, wie aus obigem ersichtlich, der phytomikrochemischen Untersuchung großen Wert beilege, kann ich nicht leugnen, dass diese Untersuchung mit besonderen Schwierigkeiten

¹⁾ C. VAN WISSELINGH, On the tests for tannin in the living plant and on the physiological significance of tannin. Koninkl. Akad. van Wetensch. te Amsterdam, Proceedings 1910, p. 685. — Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. Beihefte z. Bot. Centralbl. Bd. XXXII (1914), Abt. I, p. 155.

und Gefahren verbunden ist. Das erste Erfordernis bei makrochemischen Untersuchungen ist Absonderung des Stoffes, den man untersuchen will, in hinreichender Menge und reinem Zustande. Der Forscher, der phytomikrochemische Versuche anstellt, wendet Reaktionen auf Stoffe an, welche in relativ geringer Quantität in der Zellwand oder in dem Zellinhalt anwesend sind und zwar oft neben anderen Stoffen, deren Anwesenheit Verwechslung und Modifikationen der Reaktionen veranlassen kann. Wenn man Schlüsse zieht, musz man deshalb allen Nebenumständen Rechnung tragen und möglichst vorsichtig sein. Beim Studium der Lokalisation der chemischen Körper musz man auszerdem die Tatsache berücksichtigen, dasz nach dem Tode des Protoplasmas eine Wanderung von im Zellsaft gelösten Stoffen stattfinden kann.

Die Unterschätzung und das Nichterkennen der Schwierigkeiten, welche mit der mikrochemischen Untersuchung verbunden sind, haben oft Veranlassung gegeben zur Verwechslung chemisch sehr verschiedener Körper. Mit einigen Beispielen will ich dieses erläutern. Bei den mikrochemischen Untersuchungen der Korkzellwand hat man die Violett färbung, welche die Korklamelle nach Behandlung mit Kalilauge mit Chlorzinkjod infolge der Anwesenheit der Phellonsäure zeigt, für eine Zellulosereaktion gehalten und Verseifungsprodukte, welche aus Kaliumphellonat bestanden, als Zellulosemembranen gedeutet ¹⁾.

Von den Fungi hat men lange Zeit allgemein behauptet, dasz ihre Membranen aus Zellulose mit fremden Beimischungen bestehen, während später festgestellt wurde, dasz sie mit wenigen Ausnahmen keine Zellulose sondern Chitin enthalten. Die Violett färbung, welche Chitosan, ein Zersetzungsprodukt des Chitins, mit Jod und verdünnter Schwefelsäure zeigt, hat man mit einer Zellulosereaktion verwechselt ²⁾.

Reaktionen mit Haematoxylin, Methylenblau und anderen Farbstoffen, hat man als Zellulosereaktionen beschrieben, während es sich später zeigte, dasz die Farben, welche die

¹⁾ C. VAN WISSELINGH, Sur la paroi des cellules subéreuses, Arch. Néerl. T. XXII, Sep. Abdruck p. 8. — La lamelle subéreuse et la subérine I. c. T. XXVI, p. 340.

²⁾ C. VAN WISSELINGH, Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. XXXI (1898), p. 657.

Zellwände erhielten, die Folge der Anwesenheit von Pektinstoffen waren ¹⁾).

Carotin hat man verwechselt mit Chlorophyllan, einem Zeretzungsprodukt des Chlorophylls ²⁾. Gerbstoffniederschläge sind als Eiweisz Niederschläge gedeutet worden ³⁾.

Manchmal hat man Körper, die zwar zu derselben Gruppe gehören, aber chemisch doch verschieden sind, für identisch erklärt. Man glaubte mit eben demselben Körper zu tun zu haben. So hat man z. B. gemeint, dass in allen Korkzellwänden und kutikularisierten Wänden als wesentlicher Bestandteil ein bestimmter chemischer Körper, Korkstoff oder Suberin, vorkam, während es sich später gezeigt hat, dass diese Zellwände verschiedene Stoffe enthalten, welchen sie ihre eigentümliche Eigenschaften verdanken, und dass sie sich chemisch oft bedeutend von einander unterscheiden ⁴⁾.

Auch hat man gemeint, dass alle carotinähnliche Farbstoffe oder Carotinoide, wie Carotin, Lycopin, die verschiedenen Xanthophylle usw. ein und derselbe Körper, Carotin, wären, während spätere sorgfältige chemische Untersuchungen festgestellt haben, dass einige dieser Körper Sauerstoff enthalten und andere nicht und sie deshalb unter einander sehr verschieden sind ⁵⁾.

Oft fühlt man bei der phytomikrochemischen Untersuchung sehr den Mangel an zuverlässigen Reaktionen. Zwar klaget man bisweilen darüber mit Unrecht, aber es ist gewiss, dass in vielen Fällen die bekannten makrochemischen Reaktionen für die mikrochemische Untersuchung untauglich sind, weil sie zu wenig empfindlich sind oder wegen anderer Ursachen. Der Botaniker hat in solchen Fällen oft zu Farbstoffen Zuflucht genommen. Hiermit kann man wohl sehr schöne Praeparate

¹⁾ L. MANGIN, Sur les composés pectiques. Journal de botanique, T. VI. (1892) p. 238.

²⁾ C. VAN WISSELINGH, On the demonstration of carotinoids in plants. Koninkl. Akad. van Wetensch. at Amsterdam, Proceedings 1912, p. 9.

³⁾ C. VAN WISSELINGH, On intravital precipitates. Koninkl. Akad. van Wetensch. at Amsterdam, Proceedings 1913, p. 1329, Recueil des Travaux bot. Néerl. vol. XI. Livr. I, 1914 p. 14

⁴⁾ C. VAN WISSELINGH, Sur la paroi des cell. suber. l. c. p. 43. Sur la lamelle subéreuse et la subérine, l. c. p. 344.

⁵⁾ Siehe besonders R. WILSTÄTTER und A. STOLL. Untersuchungen über Chlorophyll usw. p. 231.

erzielen, aber weil oft sehr verschiedene chemische Körper dieselben Farbstoffe speichern und festhalten können, kann man auf Grund der erhaltenen Resultate gewöhnlich keine sichere Schlüsse ziehen. Farbstoffe sind denn auch mehr geeignet, um bei Erhaltung negativer Resultate die Abwesenheit von Körpern, die leicht Farbstoff speichern, festzustellen, als um beim positiven Befund damit die Anwesenheit bestimmter Körper zu beweisen 1).

Da ich oft bei phytomikrochemischen Untersuchungen Mangel an zuverlässigen Reaktionen empfunden habe, so habe ich mir jetzt die Frage gestellt, ob man diesem Mangel durch Anwendung der in der organischen Chemie gebräuchlichen Reaktionen abhelfen könnte.

Wenn man berücksichtigt, wie die Botaniker im allgemeinen zu ihren mikrochemischen Reaktionen gekommen sind, so muß man gestehen, dasz man sie zufälligerweise entdeckt hat oder dasz man sie erst bei makrochemischer Untersuchung gefunden und später bei der mikrochemischen Untersuchung angewendet hat. Von einer systematischen Forschung nach mikrochemischen Reaktionen, die sich gründet auf der chemischen Struktur der Körper und den Umsetzungen, welche man im Zusammenhang mit der Anwesenheit bestimmter Atomgruppen erwarten kann, habe ich in der botanischen Literatur nichts entdecken können. In den beiden vor kurzem erschienenen, vorzüglichen Lehrbüchern über Pflanzenmikrochemie von TUNMANN und MOLISCH habe ich vergebens nach einer Behandlung dieses Gegenstandes gesucht.

Die vorliegende Arbeit muß man als einen Versuch betrachten, um in der angegebenen Richtung etwas zu leisten. Der Körper, von dem ich dabei ausgegangen bin, ist das Chitin, welches im Tierreich bei Arthropoden, Vermes und Mollusken, im Pflanzenreich bei Fungi vorkommt. Für den mikrochemischen Nachweis dieses Körpers habe ich früher schon eine Methode, welche sich auf die Umsetzung des Chitins in Chitosan und die sehr empfindliche Reaktion des letzteren mit Jod und verdünnter Schwefelsäure gründet, in Einzelheiten beschrieben 2). Auf

1) C. VAN WISSELINGH, Mikrochem. Unters. über die Zellwände der Fungi, l. c. p. 644.

2) C. VAN WISSELINGH, Mikrochem. Unters. über die Zellwände der Fungi, l. c. p. 637.

Grund dieser Tatsache würde man behaupten können, dass es nicht nötig sei, neue mikrochemische Reaktionen für das Chitin zu finden. Ich bemerke dazu, dass für die Prüfung einer neuen Arbeitsmethode es erwünscht ist, die erhaltenen Resultate mit Hilfe einer schon bewährten Methode kontrollieren zu können.

Weiter bemerke ich, dass einige Forscher, zwar noch ohne hinreichende Gründe, von mehreren chitinartigen Körpern reden ¹⁾. Es ist deshalb erwünscht, dass man bei der Untersuchung mit neuen Reagenzien der Möglichkeit Rechnung trägt, dass Chitin verschiedener Herkunft verschieden sei. Zuletzt mache ich noch darauf aufmerksam, dass die Botaniker, was das Vorkommen des Chitins betrifft, noch uneinig sind. Einige behaupten nämlich, dass die Wand der Bakterien Chitin enthält, während andere in derselben diesen Körper nicht entdecken konnten ²⁾.

Im Zusammenhang mit dem Obenerwähnten glaube ich, dass einige neue Methoden zum mikrochemischen Nachweis des Chitins den Forschern, die darüber Untersuchungen angestellt haben oder anzustellen wünschen, willkommen sein werden. Der Hauptzweck der vorliegenden Arbeit ist aber die Aufmerksamkeit auf die Tatsache zu richten, dass man bei phytomikrochemischen Untersuchungen von den in der organischen Chemie gebräuchlichen Reaktionen mit Erfolg mehr Gebrauch machen kann, als bis jetzt der Fall gewesen ist.

Über die Chemie des Chitins.

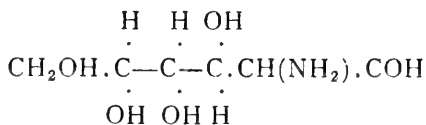
Das Chitin ist, wie man von einem Zellwandstoff wohl erwarten kann, ein in Wasser unlöslicher Körper. Auch ist es unlöslich in anderen einfachen Lösungsmitteln. Konzentrierte Säuren und starke Alkalilaugen zersetzen es beim Erwärmen. Im allgemeinen wird es aber durch Reagenzien nicht oder nur wenig angegriffen. Auch widersteht es ziemlich hoher Temperatur.

¹⁾ N. P. KRAWKOW, Ueber verschiedenartige Chitine. Zeitschr. f. Biologie, XXIX, Bd. 1892, p. 177. — E. ZANDER, Vergl. und krit. Untersuchungen zum Verständnisse der Jodreaktion des Chitins. Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Tiere. 66. Bd. 1897, p. 545.

²⁾ Siehe F. CZAPEK, Biochemie der Pflanzen. I. Bd. 1913, p. 630.

Wie Zellulose, kann man es bis auf 300° C in Glycerin erwärmen ohne, dass es sich zersetzt ¹⁾. Die Methoden, welche man zur Reindarstellung des Chitins anwendet, gründen sich auf seiner Widerstandsfähigkeit Reagenzien gegenüber.

In konzentrierter Salzsäure (37 %), Salpetersäure (25 und 50 %) und in einigermassen verdünnter Schwefelsäure (66 %) scheint Chitin, ohne sich dabei ganz zu zersetzen, löslich zu sein. Am besten gelingt solche Auflösung unter Abkühlung. Wenn man nicht zu lange wartet, kann man durch Verdünnen mit Wasser das Chitin teils noch unverändert niederschlagen. Man bekommt es dann wieder im amorphen Zustand ²⁾. Wenn konzentrierte Säuren längere Zeit oder unter Erwärmung einwirken, wird das Chitin zersetzt. LEDDERHOSE ³⁾ erhielt durch Chitin mit konzentrierter Salzsäure zu kochen, am besten unter Hinzufügung von Zinn, einen schönen kristallinen, in Wasser löslichen Körper, das salzsaure Glycosamin, C₆ H₁₃ NO₅. HCl. Die Base, das d-Glucosamin, haben E. FISCHER und LEUCHS ⁴⁾ synthetisch bereitet und besonders durch ihre Untersuchungen ist die Frage nach seiner Struktur und Konfiguration in den wesentlichen Punkten gelöst. Man hat es zu betrachten als ein Derivat des Traubenzuckers oder der d-Mannose, in welcher das in der α-Stellung befindliche Hydroxyl durch Amid ersetzt ist. FISCHER und LEUCHS geben ihm die folgende Konfigurationsformel:



¹⁾ C. VAN WISSELINGH, Mikrochem. Unters. über die Zellwände der Fungi, l. c. p. 643.

²⁾ D. H. WESTER, Studien über das Chitin, Inaugural-Dissertation (1909), p. 28.

³⁾ G. LEDDERHOSE, Über salzsaures Glykosamin. Ber. d. D. chem. Ges. zu Berlin. 9. Jahrg. (1876), p. 1200. — Über Chitin und seine Spaltungsprodukten. Zeitschr. f. physiol. Chem. 2. Bd. (1878), p. 213. — Über Glykosamin. Ebenda 4. Bd. (1880), p. 139.

⁴⁾ EMIL FISCHER und HERMANN LEUCHS, Synthese des Serins, der l-Glucosaminsäure und anderer Oxyaminosäuren. Ber. d. D. chem. Ges. 35. Jahrg. (1902), p. 3787. — Synthese des d-Glucosamins, Ber. d. D. Chem. Ges. 36. Jahrg. (1903), p. 24.

Sie bemerken dabei, dass nur die sterische Anordnung der Aminogruppe an dem α -Kohlenstoff noch unbestimmt ist und dass für die Annahme der Aldehydgruppe der gleiche Vorbehalt wie bei den Zuckern gilt. Bei der viel grösseren Verbreitung des Traubenzuckers in der Natur wird man selbstverständlich der Annahme, dass das Glucosamin sich von ihm ableite, die grössere Wahrscheinlichkeit zumessen, aber der direkte Beweis dafür fehlt augenblicklich noch.

Der Name Glucosamin ist von einigen Autoren in Chitosamin abgeändert worden. FISCHER und LEUCHS sagen aber, dass der alte von LEDDERHOSE gewählte Name Glucosamin in jeder Beziehung verdient rehabilitiert zu werden.

SUNDWIK ¹⁾ und von FÜRTH und SCHOLL ²⁾ erhielten durch Behandlung mit rauchender Salpetersäure salpetersaure Aether, sogenannte Nitrochitine und FRÄNKEL und KELLY ³⁾ durch Behandlung mit Schwefelsäure von 70 bis 72 % Monoacetylchitosamin und Acetyldichitosamin.

Wenn man Chitin bis auf 180° mit Kalilauge erhitzt, wird es unter Abspaltung von Essigsäure in Chitosan ⁴⁾ (Mykolin GILSON) verwandelt. Dieses Spaltungsprodukt ist, wie das Chitin, unlöslich in Wasser und in gewöhnlichen Lösungsmitteln. Es besitzt basische Eigenschaften und bildet mit Säuren meist in Wasser lösliche Salze. Demzufolge löst es sich in vielen verdünnten Säuren, z. B. in 2 %iger Essigsäure und 2 1/2 %iger Salzsäure. In konzentrierter Salzsäure ist es bei der gewöhnlichen Temperatur unlöslich. Verdünnte Schwefelsäure löst Chitosan auch nicht und schlägt es aus Lösungen anderer verdünnter Säuren als Chitosansulfat nieder.

Nach LÖWY ⁵⁾ präzipitieren auch Phosphowolframsäure,

¹⁾ E. E. SUNDWIK, Zur Constitution des Chitins, Zeitschr. f. physiol. Chem. 5. Bd. (1881), p. 387.

²⁾ O. VON FÜRTH und EMIL SCHOLL, Über Nitrochitine. Beitr. zur chem. Physiologie und Pathologie, X. Bd. (1907), p. 188.

³⁾ S. FRÄNKEL und A. KELLY, Beiträge zur Constitution des Chitins. Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wiss. CX. Bd. 1901, Abt. II b, p. 1147.

⁴⁾ F. HOPPE-SEYLER, Über Chitin und Cellulose. Ber. d. D. chem. Ges. 27. Jahrg. 1894, p. 3329. — E. GILSON, Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons, l. c. p. 11.

⁵⁾ E. LÖWY, Über krystallinisches Chitosansulfat, Bioch. Zeitschr. 23. Bd. 1910, p. 47.

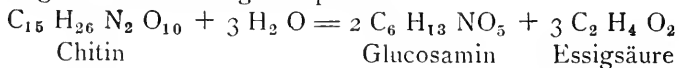
Phosphomolybdänsäure, Jodquecksilberkalium, Jodwismutkalium, Pikrinsäure und Tannin das Chitosan und man erhält beim Schütteln mit Benzoyl-, Benzosulfo- und Naphtalinsulfochlorid sehr schwer lösliche Additionsprodukte. Jodjodkaliumlösung färbt Chitosan einigermassen schmutzig braunviolett, aber sehr verdünnte Schwefelsäure genügt um diese Farbe in einem sehr schönen, dunkelen, rotvioletten umzuwandeln. Chlorzinkjod färbt Chitosan blau ¹⁾ und Brom scharlachrot ²⁾.

HOPPE-SEYLER ³⁾ und CH. FISCHER haben Chitosan durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid in einen Körper umgewandelt, der Chitin sehr ähnlich war. Als die genannten Forscher diesen Körper näher untersuchten, zeigte es sich aber, dass derselbe doch kein Chitin war. Nach CH. FISCHER erhielt er nämlich drei Acetylgruppen, gegen das Chitin zwei. Mit Propionsäureanhydrid und Benzoesäureanhydrid bereiteten HOPPE-SEYLER und CH. FISCHER ähnliche Chitosanderivate.

ARAKI ⁴⁾, LÖWY ⁵⁾ und andere haben nachgewiesen, dass durch Kochen mit Salzsäure Chitosan, wie Chitin, in Glucosamin umgewandelt wird. Nebst salzsaurem Glucosamin entstehen dabei Essigsäure und Ameisensäure.

Während die Struktur und Konfiguration des Glucosamins der Hauptsache nach bekannt sind, sind diese von dem Chitin und dem interessanten Spaltungsprodukt, dem Chitosan, noch lange nicht aufgeklärt.

Nach LEDDERHOSE ⁶⁾ ist die Formel des Chitins wahrscheinlich $C_{15} H_{26} N_2 O_{10}$ und die Spaltung in Glucosamin und Essigsäure, welche sie durch Kochen mit Salzsäure erfährt, sollte der folgenden Gleichung entsprechen:



¹⁾ C. VAN WISSELINGH, Mikrochem. Unters. über die Zellwände der Fungi, l. c. p. 642.

²⁾ O. VON FURTH und M. RUSSO, Über kristallinische Chitosanverbindungen aus Sepienschulpen. Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 8. Bd. (1906), p. 163.

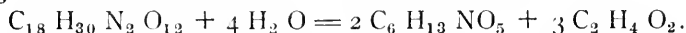
³⁾ F. HOPPE-SEYLER, Ueber Chitin und Cellulose, l. c. — Ueber Umwandlungen des Chitins. Ber. d. D. chem. Ges. 28. Jahrg. (1895), p. 82.

⁴⁾ F. ARAKI, Über das Chitosan, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 20. Bd. (1895), p. 498.

⁵⁾ l. c.

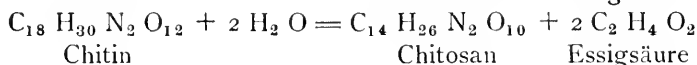
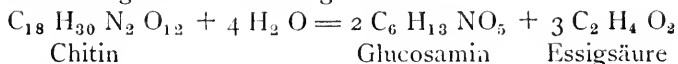
⁶⁾ G. LEDDERHOSE, Über Chitin und seine Spaltungsprodukte, l. c.

SCHMIEDEBERG ¹⁾ bemerkt, dass diese Gleichung nicht richtig sein kann, dass wahrscheinlich ein Druckfehler oder Irrtum sich eingeschlichen hat und dass sie vielmehr lauten muss:

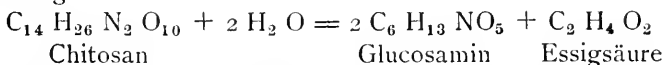


SUNDWIK ²⁾ betrachtet das Chitin als ein reines Aminderivat eines Kohlenhydrats der allgemeinen Formel $n(C_{12} H_{20} O_{10})$ und findet es sehr wahrscheinlich, dass seine Formel $C_{60} H_{108} N_8 O_{88}$, $n H_2O$ ist.

ARAKI ³⁾ gibt dem Chitin die Formel $C_{18} H_{30} N_2 O_{12}$ und dem Chitosan die Formel $C_{14} H_{26} N_2 O_{10}$. Für die Umwandlungen, welche das Chitin durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure und durch Erhitzen mit Kalilauge erfährt, stellt er die beiden folgenden Gleichungen auf:



Für die Zersetzung, welche Chitosan durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure erfährt, gelangt er zu der folgenden Gleichung:



FRÄNKEL und KELLY ⁴⁾ kommen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Resultat, dass die Grundlage des Chitins Acetyl-n-Chitosamin ist und dass das Chitin und das Chitosan keineswegs die angenommene einfache Zusammensetzung besitzen, sondern vielmehr höher zusammengesetzte stickstoffhaltige am Stickstoff acetylierte, respektive mit Acetylacetessigsäure verbundene Polysaccharide sind.

Nach OFFER ⁵⁾ ist das Chitin als ein polymeres Monoacetyldi-glucosamin aufzufassen. Die Acetylgruppe ist am Stickstoff gebunden und die Bindung der beiden Glucosaminreste beruht einerseits auf der Reaktion zwischen Aldehyd und Amin, andererseits ist der zweite Glucosaminrest in äthylenoxydartiger Bindung vorhanden.

¹⁾ O. SCHMIEDEBERG, Über die chemische Zusammensetzung des Knorpels. Arch. f. exp. Pathol. und Pharmak. 28. Bd. (1891), p. 355.

²⁾ l. c. ³⁾ l. c. ⁴⁾ l. c.

⁵⁾ TH. R. OFFER, Über Chitin, Biochem. Zeitschr. 7. Bd. (1908), s. 117.

IRVINE ¹⁾ glaubt, dass das Chitinmolekül $C_{30} H_{50} N_4 O_{19}$ ist und aus einem Molekül Aminoglucose und drei Molekülen Acetylaminoglucose zusammengesetzt ist, welche unter Elimination von vier Molekülen Wasser kondensiert sind.

ROTHERA ²⁾ behauptet, dass seine Resultate betreffs der Stickstoffbindung im Chitin nicht ohne weiteres mit der Ansicht in Einklang zu bringen sind, dass das Chitin nur ein acetyliertes Glycosamin darstellt.

HUGO BRACH ³⁾ ist zu dem Resultate gelangt, dass aus Monoacetylglucosaminen bestehende Viererkomplexe die kleinsten Bausteine des Chitins sind. Auf je ein Stickstoffatom kommt im Chitin ein Essigsäurerest und ein Glucosamin vor. Der Abbau des Chitins zu Monoacetylkomplexen resp. Glucosamin und Essigsäure vollzieht sich nach BRACH nach der Gleichung:

$(C_{32} H_{54} N_4 O_{21}) x + 3 (H_2O) x = 4 (C_8 H_{15} NO_6) x$ bzw.
 $(C_{32} H_{54} N_4 O_{21}) x + 7 (H_2O) x = 4 (C_6 H_{13} NO_5) x + 4 (CH_3 COOH) x$ und der Übergang des Chitins in Chitosan bei der Kalischmelze erfolgt unter Abspaltung der Hälfte der in Chitin vorhandenen Essigsäuregruppen nach der Gleichung:

$(C_{32} H_{54} N_4 O_{21}) x + 2 (H_2O) x = (C_{28} H_{30} N_4 O_{19}) x + 2 (CH_3 COOH) x$. Nach BRACH kann von einer Bindung der Essigsäure im Chitin in Form von Acetessigsäure nicht gesprochen werden, hingegen ist anzunehmen, dass die Essigsäure in säureamidartiger Form am Stickstoff gebunden ist und zwar an je einem Stickstoffe eine Essigsäure. Die Gesamtmenge des im Chitin vorhandenen Stickstoffes ist bei geeigneter Hydrolyse in Form von Glycosamin nachweisbar und daneben treten keine anderen reduzierenden Kohlehydrate auf. Durch die Einwirkung der salpetrigen Säure wird der Stickstoff aus dem Chitosansulfat quantitativ abgespalten, wie auch WESTER ⁴⁾ gefunden hat. Nach BRACH spricht dieses Verhalten aber nicht gegen die Bindung von Acetylkomplexen an primären Aminogruppen im

¹⁾ J. C. IRVINE, A Polarimetric Method of Identifying Chitin. Journ. of the Chemical Society (1909) XCV, I. p. 564.

²⁾ C. H. ROTHERA, Zur Kenntnis der Stickstoffbindung im Eiweisz. Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. 5. Bd. (1904), p. 442.

³⁾ HUGO BRACH, Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Chitins, Biochem. Zeitschr. 38. Bd. (1912), p. 468.

⁴⁾ l. c. p. 27.

Chitosan, bzw. Chitinmolekül. Dagegen spricht diese Tatsache gegen die Möglichkeit, dass etwa Stickstoffe untereinander oder mit anderen Teilen des Moleküls durch intramolekulare Bindung verkettet sind. Daraus, sowie aus dem Umstande, dass im Chitinmolekül keine von Stickstoff und Acetyl freien Kohlehydrate vorhanden sind, ergibt sich, dass die von OFFER für das Chitin aufgestellte Formel und die Annahme einer Amin-Aldehyd-Verkettung der substituierten Zucker den Tatsachen nicht entspricht. Größere Wahrscheinlichkeit besitzt die Annahme von Monocarbonylbindungen nach Art der von EMIL FISCHER z. B. für Maltose aufgestellten Hypothese.

Betreffs des Chitosans erhielten VON FÜRTH und RUSSO ¹⁾ die folgenden Resultate: In Abweichung der von ARAKI aufgestellten Chitosanformel fanden sie, dass das Chitosan, je zwei N-Atomen entsprechend, etwa 13 C-Atomen, 26 H-Atome und 14 O-Atome enthalten dürfte und dass das Molekül mindestens zweimal, vielleicht aber um ein Vielfaches größer ist, als der Größenordnung der ARAKI-schen Formel entspricht. Nach VON FÜRTH und RUSSO entspricht einem N-Atom annähernd 1 Molekül Essigsäure und $\frac{3}{4}$ Molekül Glykosamin. Das Chitosan vermag je einem N-Atom entsprechend ein Molekül HCl zu binden. Sein Stickstoff trägt den Charakter eines secundären Amins. Bei Benzoylierungsversuchen nimmt es, je einem N-Atom entsprechend, nur eine Benzoylgruppe auf. Alle im Chitosanmolekül vorhandenen Glykosaminkomplexe scheinen acetyliert zu sein. Daneben dürfte aber noch eine kohlenstoffärmere acetylierte Stickstoffverbindung im Molekül vorkommen. Ein erheblicher Teil seines Sauerstoffs dürfte im Molekül in anderer als in Hydroxylform enthalten sein. Es enthält keine Aldehyd- und Carbonylgruppen. VON FÜRTH und RUSSO bemerken, dass das freie Chitosan sich leicht unter Sauerstoffabgabe verändert.

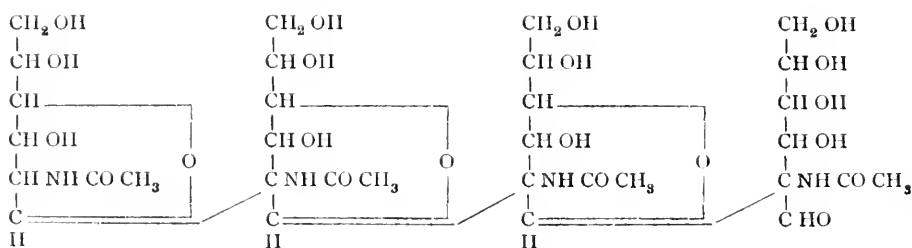
Nach LÖWY ²⁾ ist das Chitosan tatsächlich als ein polymeres Monoacetyldiglycosamin anzusehen. Für die Molekulargröße besitzt man vorläufig keine Anhaltspunkte, doch ergibt sich aus dem Schwefelsäurebindungsvermögen $[2 C_{14} H_{26} N_2 O_{10} + 3 H_2SO_4 = C_{28} H_{50} N_4 O_{19} (H_2SO_4)_3 + H_2O]$, dass mindestens zwei Monoacetyldiglycosamine im Chitosan verbunden

¹⁾ l. c.

²⁾ l. c.

sein müssen. Die Zusammensetzung des Chitosans entspricht also der Formel $(C_{28} H_{50} N_4 O_{19}) x$ und die hydrolytische Spaltung in Glucosamin und Essigsäure erfolgt nach der Gleichung: $(C_{28} H_{50} N_4 O_{19}) x + 5 x H_2 O = 4 x (C_6 H_{13} NO_5) + 2 x (CH_3COOH)$. Das Chitosan vermag je einem Monoacetyldi-glucosaminkomplex entsprechend je ein Jod- oder Bromatom aufzunehmen.

KOTAKE und SERA ¹⁾ kommen im Zusammenhang mit Untersuchungen über neue Glucosaminverbindungen (α - und β -Lykoperdin) zu der Meinung dasz im Chitin vier Glucosaminmoleküle, von welchen jedes an einer Aminogruppe acetyliert ist, mit einander verbunden sind und zwar auf die folgende Weise:



Aus dem Obenerwähnten geht hervor, dasz die Ansichten der Chemiker, was die Zusammensetzung des Chitins und des Chitosans betrifft, noch lange nicht übereinstimmen. Sowohl für das Chitin wie für das Chitosan sind die aufgestellten Formeln verschieden. Die Ansichten über die Zahl der Acetylgruppen im Chitin gehen auseinander. Während LEDDERHOSE, SCHMIEDEBERG und ARAKI im Chitin auf zwei N drei Acetylen, IRVINE auf vier N drei Acetylen, OFFER auf zwei N ein Acetyl annehmen, glaubt BRACH, dass im Chitin auf vier N vier Acetylen vorkommen. Die Ansichten über die Bindung der Stickstoffe und der Acetyl- und Glucosamingruppen im Chitin und Chitosan sind sehr verschieden. Auch die Frage, warum beim Erwärmen des Chitins in konzentrierter Kalilauge bis auf

¹⁾ YASHIRO KOTAKE und YOSHITA SERA, Über eine neue Glucosaminverbindung, zugleich ein Beitrag zur Konstitutionsfrage des Chitins. Zeitschr. für physiol. Chemie, 88. Bd. (1913), p. 56.

180° nur ein Teil der Acetylgruppe abgespalten wird, ist noch ungelöst.

Die mikrochemische Untersuchung.

Obschon es noch viele Lücken in unserer chemischen Kenntnis des Chitins gibt, hat die makrochemische Untersuchung doch schon viel geleistet, das für die mikrochemische Untersuchung Bedeutung hat. Schon verfügen wir über eine sehr empfindliche mikrochemische Methode zum Nachweis des Chitosans, des unlöslichen Zersetzungsprodukts des Chitins, aber wie es sich unten zeigen wird, brauchen wir uns nicht auf diese Methode zu beschränken. Neue mikrochemische Methoden sind unten beschrieben.

Die mikrochemische Untersuchung fand bei den folgenden Objekten statt, nämlich bei 10 pflanzlichen Objekten (Fungi):

Agaricus campestris L.

Polyporus versicolor L.

Aspergillus giganteus Wehmer.

Plasmodiophora Brassicae Woron.

Peltigera canina Hoffm.

Sphaerotheca Mors Uvae (Schw.) Berk. et Curt.

Acidium nymphoides DC.

Roestelia cancellata Rebentisch [*Gymnosporangium Sabinae* (Dicks) Winter].

Telephora terrestris Ehrh.

Scolecotrichum (auf Gurke)

und bei zwei tierischen Objekten:

Crangon vulgaris.

Sepia officinalis (Sepia-Schale).

Besonders habe ich von den pflanzlichen Objekten die fünf erstgenannten benutzt. Wie die tierischen Objekte, waren diese wegen des beträchtlichen Chitingehalts für das Studium der neuen mikrochemischen Methoden sehr geeignet.

Bei phytomikrochemischen Untersuchungen musz man, im Gegensatz zu dem, was bei makrochemischen Untersuchungen stattfindet, einer Auflösung vorbeugen. Dementsprechend richten wir bei der mikrochemischen Nachweisung des Chitins unsere Aufmerksamkeit auf das Chitosan, sein unlösliches Zersetzungs-

produkt, das im Gegensatz zu Chitin mit vielen Stoffen reagiert.

Reaction zum Nachweis des Chitosans mit Jod und Säuren. (Fig. 1.) In 1898 habe ich ¹⁾ die Forscher auf die schöne Violettfärbung, welche das Chitosan mit Jod und verdünnter Schwefelsäure zeigt, aufmerksam gemacht. Diese Reaktion hatte GILSON ²⁾ bei der makrochemischen Untersuchung pflanzlicher Objekte beobachtet. Ich habe sie für die mikrochemische Untersuchung anwendbar gemacht. Die angewandte Methode ist von mir und später von anderen beschrieben worden. Im Zusammenhang hiermit erlaube ich mir einige Bemerkungen: Wie schon früher erwähnt, werden die Präparate in zugeschmolzenen Glasröhrchen bis auf 160° C (unkorr.) in konzentrierter oder 50%iger Kalilauge erhitzt, darauf mit absolutem oder 95%igem Alkohol ausgewaschen und in destilliertes Wasser gebracht und schliesslich mit Jodjodkaliumlösung und sehr verdünnter Schwefelsäure behandelt. Die Erwärmung der Röhrchen kann natürlich auf verschiedene Weise stattfinden, z. B. in einem Ölbad, in einem Trockenschrank oder in einem Schränkchen von Asbestpappe. Bei Anwendung eines Ölbades hing ich die Röhrchen in Hüllen von Metalltuch möglichst nahe beim Reservoir des Thermometers. Überflüssig und unpraktisch ist ein Deckel mit Löchern auf dem Ölbad, wie einige Autoren abgebildet haben. Wenn man die Röhrchen aus dem Ölbad herausnimmt, hindert ein derartiger Deckel nur.

Die Anwendung zugeschmolzener Röhrchen und besonders das Auswaschen mit Alkohol dient dazu die Präparate intakt zu erhalten. Nach Umwandlung des Chitins in Chitosan haben die Präparate viel von ihrer Festigkeit eingebüsst und die direkte Übertragung aus der konzentrierten Kalilauge ins Wasser können sie nicht mehr ertragen. Die Anwendung des Alkohols leistet ausgezeichnete Dienste, aber bei der Übertragung aus dem Alkohol ins Wasser zeigt es sich noch manchmal, dass die Präparate weniger fest sind als vorher. Die Behandlung

¹⁾ C. VAN WISSELINGH, Mikrochem. Unters. über die Zellwände der Fungi, l. c. p. 639.

²⁾ E. GILSON, Recherches chimiques sur la membr. cell. des champignons, l. c. p. 11.

mit verschiedenen Reagenzien, unter anderen mit Jodjodkaliumlösung oder mit verdünnter Schwefelsäure, macht sie wieder fester.

Anstatt erst Jodjodkaliumlösung und nachher verdünnte Schwefelsäure kann man auch erst verdünnte Schwefelsäure und dann Jodjodkaliumlösung hinzufügen. Statt verdünnter Schwefelsäure kann man auch andere verdünnte Säuren oder ein saures Salz anwenden, z. B. verdünnte Phosphorsäure, verdünnte Selensäure oder Kaliumbisulfat. Bei vielen Säuren ist es nicht einerlei, ob man erst die Jodjodkaliumlösung und nachher die Säure zufließen lässt oder umgekehrt. Dieses ist nämlich der Fall mit verdünnter Salzsäure ($2\frac{1}{2}$ %), verdünnter Essigsäure (2 %), Weinsteinsäure, Zitronensäure und Benzoesäure. In den verdünnten Lösungen dieser Säuren löst sich das Chitosan. Bringt man die Präparate auf den Objektträger in ein kleines Quantum der Lösung einer dieser Säuren, so findet Lösung des Chitosans statt. Fügt man darauf Jodjodkaliumlösung hinzu, so bildet sich ein körniges, rotviolettes Präzipitat. Behandelt man die Präparate erst mit Jodjodkaliumlösung und nachher mit der verdünnten Lösung einer der genannten Säuren, so bleiben die Präparate intakt und zeigen nur die schöne Violettfärbung.

Die Farbe, welche Jod in Kombination mit sauer reagierenden Stoffen hervorbringt, ist meist rotviolett (Kl. et V. 556, bei Plasmodiophora Brassicae mit Jod und Schwefelsäure). Verschiedene Ursachen scheinen die Nuance mehr oder weniger modifizieren zu können. Jodjodkaliumlösung und Kaliumbisulfatlösung rief sogar eine blauviolette Färbung hervor.

Wenn man die Chitosanpräparate mit Jodjodkaliumlösung und sehr verdünnter Schwefelsäure, z. B. 1 %iger, violett gefärbt hat und darauf 66 $\frac{1}{2}$ - oder 76 %ige Schwefelsäure hinzufügt, so verschwindet die Violettfärbung. Falls die Präparate zellulosehaltige Membrane enthalten, so tritt dann bei diesen Blaufärbung auf (Fig. 2).

Wie oben erwähnt, zeigt Chitosan einen basischen Charakter und enthält gewisse Atomgruppen; es geht demzufolge mit vielen Stoffen Verbindungen ein. Einige dieser Verbindungen sind in Wasser löslich, andere dagegen nicht. Aus den wässrigen Lösungen der löslichen Chitosansalzen kann das Chitosan durch viele Stoffe präzipitiert werden. Zu diesen Stoffen gehören auch

die, welche für die Präzipitation der Alkaloide benutzt werden. Ich bereitete mit 2%iger Essigsäure eine 1%ige Lösung von Chitosan, das aus Chitin von *Crangon vulgaris* dargestellt war und das durch Präzipitation gereinigt war. Diese Lösung gab mit den folgenden Lösungen Präzipitate: verdünnte Schwefelsäure (Präzipitat, das aus losen Körnern besteht), Jodjodkaliumlösung (Jod 5, Jodkalium 10, Wasser bis 100, violettes Präzipitat), Pikrinsäure (1 : 100, häutiges Präzipitat), Picrolonsäure (gesättigte Lösung), Trinitrokresol, Kaliumquecksilberjodidlösung (Mayer's Reagens, HgCl_2 1, KJ 4, Wasser 95), Quecksilberchloridlösung (1 : 20), Goldchloridlösung (1 : 20), Platinchloridlösung (1 : 10), Palladiumchlorürlösung (1 : 100), Kaliumwismutjodidlösung, Kaliumcadmiumjodidlösung, Phosphomolybdänsäurelösung (häutiges Präzipitat), Phosphowolframlösung (häutiges Präzipitat), Ferrocyankaliumlösung (1 : 10, häutiges Präzipitat), Ferricyankaliumlösung (1 : 10, häutiges Präzipitat), Kaliumbichromatlösung, Kaliumchromatlösung, sehr verdünnte Chromsäurelösung und Lösung von 1, 2-naphtochinon-4-sulfosaurem Natrium (häutiges, orangefarbenes Präzipitat). Mit 10 %iger Tanninlösung erhielt ich kein Präzipitat. Als ich aber eine konzentriertere Chitosanlösung benutzte, entstand mit 10 %iger Tanninlösung ein häutiges Präzipitat im Überflus.

Wenn man anstatt Chitosanlösungen tierische und pflanzliche Präparate benutzt, in welchen auf die angegebene Weise das Chitin in Chitosan umgewandelt ist, so entstehen durch Behandlung mit Präzipitiermitteln dieselbe Verbindungen, welche sich sonst bei der Präzipitation bilden. Man kann dabei konstatieren, dass die Chitosanpräparate, die weniger fest sind als die ursprüngliche Chitinpräparate, wieder fester werden.

Falls die Chitosanverbindungen eine intensive Farbe besitzen, kann man nach Behandlung mit Reagenzien die Skeletteile der Tiere und die Zellwände der Fungi, die ursprünglich aus Chitin bestanden oder chitinhaltig waren, an der erhaltenen Farbe erkennen. Falls die gebildete Chitosanverbindung farblos ist, so kann man versuchen, den Stoff, der durch das Chitosan festgelegt ist, in eine gefärbte Verbindung umzuwandeln. Wenn solches gelingt, so kann man die ursprünglich chitinhaltigen Skeletteile und Zellwände an der hervorgerufenen Farbe unterscheiden.

Pikrinsäure (Fig. 4), *Picrolonsäure*, *Trinitronaphtol*, *Trini-*

trokresol. Wie ein wollener oder seidener Faden durch eine Pikrinsäurelösung bleibend gelb gefärbt wird, im Gegensatz zu einem baumwollenen, welche durch Auswaschen mit Wasser die gelbe Farbe bald verliert, so werden auch tierische und pflanzliche Chitosanpräparate bleibend gelb gefärbt, während zellulosehaltige Zellwände den gelben Farbstoff nicht festhalten. Anstatt einer Pikrinsäurelösung kann man auch Lösungen von Picrolonsäure, Trinitronaphtol und Trinitrokresol benutzen. Die Farbe ist intensiver je nachdem der Chitosan- oder der ursprüngliche Chitingehalt grösser ist. Die untersuchten tierischen Präparate färbten sich intensiv gelb und von den pflanzlichen Objekten zeigten die folgenden intensive Gelbfärbung: *Agaricus campestris*, *Polyporus versicolor*, *Peltigera canina*, *Aspergillus giganteus* und *Plasmodiophora Brassicae*. Bei dem letzten Objekt bilden die gelb gefärbten Sporen einen Kontrast mit den farblos bleibenden Zellulosewänden von *Brassica*. Die gelbe Farbe, welche ich bei *Agaricus campestris* mit Pikrinsäure, Picrolonsäure, Trinitrokresol und Trinitronaphtol erhielt, stimmte resp. mit Nr. 226, 201, 211 und 176 der Code des Couleurs von *Klincksieck et Valette* überein. Wenn man Chitosanpräparate durch einen der vier obengenannten Stoffe gelb färbt und nachher mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure behandelt, so wird die gelbe Farbe durch die bekannte violette ersetzt. Chitin wird durch die vier obengenannten Stoffe nicht gelb gefärbt.

Ferrocyanwasserstoffsäure. (Fig. 3). Ferrocyanwasserstoffsäure bildet mit Chitosan eine unlösliche Verbindung. Auch wenn man Chitosanpräparate in eine Lösung von Ferrocyankalium, der man etwas verdünnte Schwefelsäure zugefügt hat, oder erst in verdünnte Schwefelsäure und später in 1%ige Ferrocyankaliumlösung bringt, entsteht die Verbindung. Man kann die Präparate mit Wasser auswaschen und auskochen, ohne dass sie zersetzt wird. Wenn man, nachdem man auf diese Weise das Ferrocyankalium und die nicht gebundene Ferrocyanwasserstoffsäure sorgfältig entfernt hat, die Präparate mit einer Lösung eines Ferrisalzes, z. B. des Ammoniumferri-sulfats, behandelt, so wird Berlinerblau gebildet. Diese unlösliche Verbindung entsteht in äusserst feiner Verteilung in den Skeletteilen oder Zellwänden, so dass diese sehr gleichmässig blau gefärbt werden (Kl. et V. 401, 402 und 406). Die blaue

Farbe ist stärker, je nachdem der Chitosan- resp. Chitingehalt gröszer ist. Die untersuchten tierischen Chitosanpräparate werden dunkelblau gefärbt und das ist auch mit den Chitosanpräparaten von *Agaricus campestris*, *Polyporus versicolor*, *Peltigera canina*, *Aspergillus giganteus* und *Plasmodiophora Brassicae* der Fall. Bei dem letzten Objekt beobachtet man die blaugefärbten Sporen inmitten des farblos gebliebenen Parenchyms.

Die Verbindung der Ferrocyanwasserstoffsäure mit dem Chitosan wird durch Jodjodkaliumlösung und verdünnte Schwefelsäure nicht zersetzt. Die mit Ferrocyanwasserstoffsäure behandelten Chitosanpräparate werden dadurch nicht violett gefärbt. Wenn man Chitinpräparate auf die obenbeschriebene Weise mit Ferrocyanwasserstoffsäure und einem Ferrisalz behandelt, tritt keine Blaufärbung auf.

Ferricyanwasserstoffsäure. (Fig. 3). Anstatt sukzessiver Behandlung mit Ferrocyanwasserstoffsäure und einem Ferrisalz kann man auch sukzessive Behandlung mit Ferricyanwasserstoffsäure und einem Ferrosalz anwenden. Man verfährt, wie oben angegeben ist, aber benutzt statt Ferrocyankalium Ferricyanalkalium und statt Ammoniumferrisulfat ein Ferrosalz, z. B. Ammoniumferrosulfat. Anstatt Berlinerblau entsteht Turnbull's Blau. Die Methode führt zu ähnlichen Resultaten wie die vorige und die Empfindlichkeit beider ist auch ungefähr dieselbe. Zellulose und Chitin werden nicht gefärbt.

Phosphomolybdänsäure. (Fig. 3). Mit Phosphomolybdänsäure bildet Chitosan eine unlösliche Verbindung, die auch entsteht, wenn man Chitosanpräparate in eine 1%ige Lösung von Phosphomolybdänsäure bringt. Wenn man die Präparate später mit Wasser auswäscht oder auskocht, um nicht gebundene Phosphomolybdänsäure zu entfernen, und darauf in sehr verdünnte Zinnchlorürlösung bringt, so färben alle Skeletteile oder Zellwände, die aus Chitosan bestehen oder chitosanhaltig sind, sich blau (Kl. et V. 401, 402, 403, 406, 432, 437). Die blaue Farbe ist dunkler, je nachdem der Chitosangehalt, resp. der Chitingehalt, gröszer ist. Dunkel ist die Farbe bei den untersuchten tierischen Produkten und bei *Agaricus campestris*, *Polyporus versicolor*, *Peltigera canina*, *Aspergillus giganteus* und *Plasmodiophora Brassicae*. Die Zellulosewände bleiben vollkommen farblos. Wenn diese sich neben chitosanhaltigen

befinden, wie bei der Untersuchung von Plasmodiophora Brassicae der Fall ist, so kann man beide sehr deutlich von einander unterscheiden. Chitin wird nicht blau gefärbt.

Anstatt der Phosphomolybdänsäurelösung kann man auch eine Natriumphosphomolybdänatlösung und verdünnte Schwefelsäure anwenden. Man legt die Präparate erst in verdünnte Schwefelsäure und behandelt sie darauf mit 1%iger Natriumphosphomolybdänatlösung.

Anstatt der Zinnchlorürlösung kann man auch andere reduzierende Stoffe benutzen, um Blaufärbung hervorzurufen, z. B. Ferrosulfat oder Wasserstoff in statu nascenti. Zinnchlorürlösung verdient aber den Vorzug. Ihre Anwendung ist bequem und führt schnell zum Ziel.

Phosphowolframsäure. Mit Phosphowolframsäure kann man bei Chitosanpräparaten eine ähnliche Reaktion hervorrufen, wie mit Phosphomolybdänsäure. Nach Behandlung mit einer 1%igen Phosphowolframsäurelösung, nach Auswaschen mit Wasser und nach langem Erwärmen mit verdünnter Zinnchlorürlösung bekommt man Blaufärbung (Kl. et V. 437). Diese Reaktion ist weniger empfehlungswert als die mit Phosphomolybdänsäure, mittels welcher man die Färbung schnell und ohne Erwärmen erzielt.

Goldchlorid, $\text{H Au Cl}_4, 4 \text{ H}_2 \text{ O} (3 \text{ H}_2 \text{ O})$. Mit Goldchlorid geht Chitosan eine unlösliche Verbindung ein, die auch entsteht, wenn man tierische oder pflanzliche Chitosanpräparate in Goldchloridlösung bringt. Wie bekannt, erzeugt Oxalsäure beim Erwärmen in stark verdünnter Goldchloridlösung zunächst eine blaue Färbung, welche allmählich in einen rotbraunen Niederschlag von metallischem Gold übergeht. Eine gleiche Reaktion bewirkt Eisenvitriol- oder Eisenchlorürlösung schon in der Kälte. Zinnchlorürlösung verursacht in sehr verdünnter Goldchloridlösung eine purpurrote bis rotbraune Färbung. In konzentrierteren Goldchloridlösungen bewirkt dieses Reagens einen dunkelpurperroten, bisweilen rotbraunen Niederschlag eines Gemisches, welches als *Cassiusscher Goldpurpur* oder als Mineralpurpur bezeichnet wird. Dasselbe besteht nach ZSIGMONDY aus zinnoxydhaltigem, fein verteiltem, kolloidalem Gold, bzw. aus einem Gemenge von kolloidaler Zinnsäure mit kolloidalem Gold.

Wenn man Chitosanpräparate mit Goldchlorid behandelt und mit Wasser sorgfältig auswäscht oder auskocht, um das nicht

gebundene Goldchlorid zu entfernen, und nachher mit Oxalsäure-, Ferrosulfat- oder Zinnchlorürlösung behandelt, so kann man bei denselben ähnliche Färbungen wahrnehmen, wie obenerwähnt, nämlich nach schwachem Erwärmen mit Oxalsäure blaviolett oder rotviolett (Kl. et V. 487—587), mit Ferrosulfat meist blau (407) und mit verdünnter Zinnchlorürlösung violett (502), rotviolett, orangerot oder orange (127—128). Die Färbungen, die Goldchlorid in Kombination mit reduzierenden Stoffen bei Chitosanpräparaten hervorruft, sind im allgemeinen sehr dunkel. Ich bemerke, dass oft auch bei dem Zellinhalt Färbung eintritt, was die Untersuchung erschwert. Verholzte Zellwände werden durch Goldchlorid violett gefärbt. Chitin und Zellulose werden nicht gefärbt.

Tannin. Tannin geht mit Chitosan eine Verbindung ein. Demzufolge bemerkt man, dass Chitosanpräparate in 1%iger Tanninlösung ein ganz anderes Aussehen bekommen. Wenn man die mit Tanninlösung behandelten Präparate wiederholt sorgfältig mit Wasser auswäscht und später mit Ferriacetatlösung behandelt, färben sie sich schwärzlichblau, während man mit Kaliumbichromat- und Uranacetatlösungen braune Färbungen erhält.

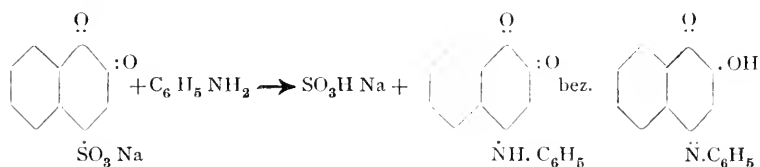
Für den Nachweis des Chitosans, resp. des Chitins, kann ich aus verschiedenen Ursachen Tannin nicht empfehlen. Die Färbungen, welche Tannin in Kombination mit Gerbstoffreagenzien den Chitosanpräparaten erteilt, sind verhältnismäßig schwach. Aus den nicht chitosanhaltigen Zellwänden kann man das Tannin nicht leicht entfernen, so dass manchmal auch diese mit Ferriacetatlösung eine schwärzlichblaue Farbe zeigen. Wenn man die Präparate mit Wasser auskocht, wird die Tanninreaktion bei den chitosanhaltigen Wänden schwächer. Das Tannin wird dem Chitosan entzogen. Das Chitosan scheint also mit dem Tannin nur eine lose Verbindung einzugehen. Chitosanpräparate, die man mit Tanninlösung behandelt hat, färben sich mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure violett. Das Eintreten dieser Reaktion wird deshalb durch das Tannin nicht verhindert.

Salpetrige Säure. BRACH ¹⁾ hat betont, dass obschon man

¹⁾ l. c.

annehmen musz, das im Chitosanmolekül Acetylgruppen an primären Aminogruppen gebunden sind, der Stickstoff durch die Einwirkung der salpetrigen Säure doch quantitativ abgespalten wird. In Übereinstimmung hiermit findet, wenn man ein Chitosanpräparat in Kaliumnitritlösung legt und verdünnte Schwefelsäure zufügt, Gasentwicklung und Lösung des Präparates statt. Diese Lösung ist vollständig, wenn das Präparat ganz aus Chitosan besteht, während, wenn solches nicht der Fall ist, ein unlöslicher Rest zurückbleiben kann. Chitin zeigt in Kaliumnitritlösung und verdünnter Schwefelsäure keine Änderung.

1,2 - Naphthochinon - 4 - sulfosaures Natrium ¹⁾. (Fig 5). Wie bekannt, ist 1,2 - naphthochinon - 4 - sulfosaures Natrium zur Identifizierung von Aminoverbindungen empfohlen worden. Eine schwach saure Lösung von Anilin in Essigsäure z. B. gibt mit einer Lösung von 1,2 - naphthochinon - 4 - sulfosaurem Natrium ein orangerotes kristallinisches Präzipitat.



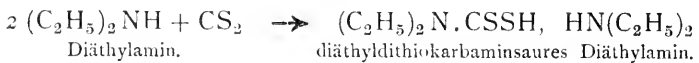
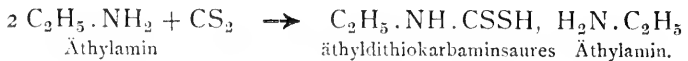
Obschon die meisten Chemiker annehmen, dasz der Stickstoff im Chitosan secundair gebunden ist, habe ich doch untersucht, ob genanntes Reagens für den mikrochemischen Nachweis des Chitosans dienen konnte. Eine schwach saure Lösung von Chitosan in Essigsäure gibt mit einer Lösung von 1,2 - naphthochinon - 4 - sulfosaurem Natrium ein zimtfarbenes Präzipitat. Wenn man tierische oder pflanzliche Chitosanpräparate in eine derartige Lösung bringt, so nehmen sie allmählich eine zimtbraune Farbe an (Kl. et V. orange 102, 103, 106, 107, 126), die intensiver ist, je nachdem die Objekte, mehr Chitosan enthalten. Zu den Objekten, bei welchen die Farbe sehr intensiv wird, gehören die beiden tierischen Objekte und von den pflanzlichen Objekten *Agaricus campestris*, *Polyporus versicolor*, *Peltigera canina*, *Aspergillus giganteus* und *Plasmodiophora Brassicae*. Schwaches Erwärmen beschleunigt die

¹⁾ TH. WEYL, Die Methoden der Organischen Chemie, 2. Bd. (Bes. Teil), 2. Abt. (1911), p. 1305.

Reaktion. Bei der Untersuchung von Plasmodiophora Brassicae fallen die orangefarbenen Sporen inmitten des farblosen Parenchyms sehr auf. Die gewöhnlichen Zellulosewände färben sich nicht. Auch bleibt Chitin in einer Lösung von 1,2-naphtochinon-4-sulfosaurem Natrium farblos.

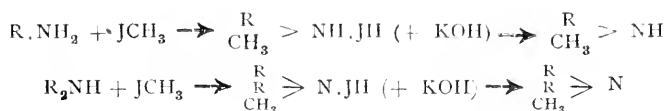
Wenn man die orange gefärbten Präparate mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure behandelt, so wird die Farbe wenig modifiziert. Bringt man sie aber in verdünnte Kalilauge oder Salmiakgeist, so wird die Orangefarbe in Olivengrün umgewandelt (Kl. et V. gelb 202, 203, 207). Durch Jodjodkaliumlösung und verdünnte Schwefelsäure werden die orangefarbenen Präparate nicht violett gefärbt.

Schwefelkohlenstoff. Schwefelkohlenstoff reagiert mit primären und sekundären Aminen. Mit primären und sekundären Aminen der aliphatischen Reihe bildet er alkylierte resp. dialkylierte Dithiokarbaminsäure:

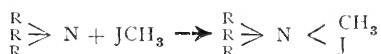


Es lag deshalb auf der Hand zu untersuchen, ob Schwefelkohlenstoff auch mit Chitosan reagiert. Es zeigte sich, dass das der Fall war. Weil das Reaktionsprodukt unlöslich ist, behalten die Präparate vollkommen ihre Struktur. Wenn man Chitosanpräparate aus absolutem Alkohol in Schwefelkohlenstoff überträgt und lange hiermit in einem Wasserbade erwärmt, so zeigt es sich, dass das Verhalten Reagenzien gegenüber sich ganz geändert hat. Mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure bekommt man keine Violett färbung mehr; die Präparate färben sich gelb bis braun; in verdünnter Essigsäure, verdünnter Salzsäure und in salpetriger Säure (Kaliumnitrit mit verdünnter Schwefelsäure) findet keine Auflösung mehr statt.

Alkylierung. Jodmethyl lagert sich in der Mehrzahl der Fällen an primäre, sekundäre und tertiäre Basen an. Primäre und sekundäre Basen liefern Jodhydrate der methylierten Basen, aus welchen Verbindungen durch Alkali die freien methylierten Amine ausgeschieden werden:



Tertiäre Basen liefern durch Alkali nicht zerlegbaren substituierten Ammoniumjodide :



Nimmt man bei der Methylierung eines primären Amins den entstehenden Jodwasserstoff durch Alkali fort, so gelangt man durch weitere Einwirkung von Jodmethyl und Alkali stufenweise bis zum Jodid der quaternären Base.

Es lag auf der Hand zu untersuchen, welche Änderungen das Chitosan erfährt, wenn man es abwechselungsweise einige Male mit Jodmethyl und mit Alkali behandelt. Die Chitosanpräparate wurden aus absolutem Alkohol in das Jodmethyl übertragen und lange mit diesem und darauf mit alkoholischer Kalilauge erwärmt. Dreimal wurde solches wiederholt. Das Resultat dieser Versuche war, dass in allen Fällen sowohl bei tierischen als pflanzlichen Objekten das Chitosan in ein Produkt umgewandelt wurde, das auch unlöslich war, so dass die Präparate bei zweckmäßiger Behandlung intakt blieben, aber das Reagenzien gegenüber sich auf ganz andere Weise als Chitosan verhielt. Jodjodkaliumlösung und verdünnte Schwefelsäure rief keine Violettfärbung mehr hervor; die Präparate färbten sich orange.

Weil das Übertragen ins Wasser den Präparaten manchmal schadet, ist es erwünscht sie mit Alkohol und Wasser auszuwaschen und darauf mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure zu behandeln.

Acylierung. Wie schon erwähnt, kommt im Chitosan primär oder secundär gebundener Stickstoff vor. Auch ist es möglich, dass wie im Glucosamin auch im Chitosan Hydroxylgruppen anwesend sind. Man kann deshalb erwarten, dass Chitosan mit Säurechloriden und Säureanhydriden neue Verbindungen bilden wird, nämlich zusammengesetzten Äther oder Aminosäuren. Einige Chemiker haben schon durch Acylierung mit Essigsäureanhydrid und Propionsäureanhydrid Derivate von Chitosan erhalten. Es lag deshalb auf der Hand auch den Wert der

Acylierung für die mikrochemische Untersuchung zu studieren.

Mit verschiedenen Stoffen habe ich Acylierungsversuche angestellt, nämlich mit Chloriden von Säureradikalen: Acetylchlorid und Benzoylchlorid und mit Anhydriden von Säuren: Essigsäure-, Bernsteinsäure-, Benzoesäure- und Phtalsäureanhydrid. Die Chloride der Säureradikale liess ich bei der gewöhnlichen Temperatur auf die Chitosanpräparate einwirken und die Säureanhydride unter Erwärmen im Wasserbade. Die Säurechloride liess ich als solche einwirken. Das flüssige Essigsäureanhydrid benutzte ich auch meist als solches, aber auch in alkoholischer Lösung. Die festen Säureanhydride wendete ich in Lösung an. Für Lösungsmittel dienten absoluter Alkohol, Benzol und Toluol. Die Lösungen enthielten gewöhnlich 5 % Anhydrid. Freilich bilden sich beim Gebrauch vom absoluten Alkohol als Lösungsmittel allmählich zusammengesetzte Äther und deshalb scheint seine Anwendung weniger rationell. Die Acylierung wird aber durch den Alkohol nicht verhindert.

Bei den obenerwähnten Versuchen musz man darauf achtgeben, dasz die Flüssigkeit aus welcher man ein Präparat nimmt, mischbar ist mit der, in welche man es überträgt. Man musz z. B. kein Präparat direkt aus Wasser in Benzol oder Toluol bringen, sondern man musz es erst mit absolutem Alkohol auswaschen.

Die Acylierung führte im allgemeinen zum Resultate, dasz das Chitosan in eine in Wasser unlösliche Verbindung umgewandelt wurde, während die Zellwände vollkommen intakt blieben. Die neuen Körper, welche man bei den Acylierungsversuchen erhält, verhalten sich Reagenzien gegenüber anders als das Chitosan, während sie untereinander auch verschieden sind, was mit den eingeführten Säureresten zusammenhängt. Deshalb werde ich erst die Resultate, welche das *Acetylieren* lieferte, erwähnen.

Nach dem Acetylieren verhalten sich die Präparate verschiedenen Reagenzien gegenüber, als ob sie aus Chitin beständen oder chitinhaltig wären. Hierbei musz ich aber bemerken, dasz man doch nicht annehmen darf, dasz man Chitin wiederbekommen hätte.

Wenn man die acetylierten Präparate mit Jodjodkaliumlösung behandelt, so färben sie sich gelb oder orange; nach Hinzufügung von verdünnter Schwefelsäure geht die Farbe aber nicht in violett über. Wie Chitin, widerstehen die Präparate eine

Erwärmung bis auf 300°C in Glycerin, während Chitosanpräparate dadurch zersetzt und gelöst werden. Verschiedene Reaktionen, welche Chitosan zeigt, kann man bei den Präparaten nicht mehr hervorrufen. Wenn man sie z. B. hintereinander mit Ferrocyanwasserstoffsäure (Ferrocyankaliumlösung und verdünnte Schwefelsäure) und mit einer Lösung eines Ferrisalzes oder mit Phosphomolybdänsäure und sehr verdünnter Zinnchlorürlösung behandelt, so färben sie sich nicht mehr blau. In salpetriger Säure (Kaliumnitritlösung und verdünnte Schwefelsäure) lösen sich die Präparate nicht mehr. Auch in verdünnter Essigsäure und verdünnter Salzsäure sind sie unlöslich geworden.

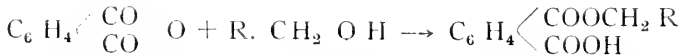
Wenn man die Präparate wieder mit konzentrierter oder 50%iger Kalilauge erwärmt, entsteht wieder Chitosan. Wenn man sie darauf mit absolutem Alkohol auswäscht und mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure behandelt, so zeigen sie wieder die schöne Violettfärbung der Chitosans. Auch die anderen Reaktionen, welche dem Chitosan zukommen, wie die Blaufärbung mit Ferrocyanwasserstoffsäure und einem Ferrisalz und mit Phosphomolybdänsäure und Zinnchlorür, kann man wieder bei den Präparaten hervorrufen. Verdünnte Essigsäure und verdünnte Salzsäure lösen die Präparate wieder ganz oder teilweise auf.

Das *Benzoylieren* führt zu ähnlichen Resultaten wie das Acetylieren. Nach dem Benzoylieren ist das Chitosan in eine Verbindung umgewandelt, die sich mit Jodjodkaliumlösung gelb oder braun färbt, welche Farbe durch Hinzufügung verdünnter Schwefelsäure nicht in violett übergeht. Die benzoylierten Präparate werden durch Ferrocyanwasserstoffsäure und ein Ferrisalz, durch Ferricyanwasserstoffsäure und ein Ferrosalz und durch Phosphomolybdänsäure und Zinnchlorür nicht blau gefärbt. In verdünnter Essigsäure und verdünnter Salzsäure sind sie unlöslich. Wenn man sie mit konzentrierter Kalilauge erwärmt hat, so verhalten sie sich wieder wie Chitosanpräparate; Jodjodkaliumlösung und verdünnte Schwefelsäure z. B. rufen wieder Violettfärbung hervor.

Die mit 1,2-naphtochinon-4-sulfosaurem Natrium behandelten Chitosanpräparate lösen sich unter Gasentwicklung in salpetriger Säure. Wenn man sie durch Erwärmen mit Essigsäureanhydrid oder mit einer alkoholischen Benzoesäureanhydridlösung acety-

liert oder benzyliert, so zeigen sie keine Änderung; nach der Acylierung haben sie auch ihre Orangefarbe behalten, aber sie widerstehen dann der Einwirkung der salpetrigen Säure.

Mit Dikarbonsäureanhydriden erhielt ich zum Teil andere Resultate als mit Monokarbonsäureanhydriden. Phtalsäureanhydrid reagiert mit Aminen und mit Alkoholen. Es bildet z. B. mit Anilin Phtalanilsäure $\text{COOH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ und mit primären und sekundären Alkoholen in Sodalösung lösliche Ester:



Beim Acylieren von Chitosanpräparaten mit Phtalsäureanhydrid erhielt ich die folgenden Resultate: Nach Erwärmen mit einer Lösung von Phtalsäureanhydrid färben die Präparate sich mit Jodjodkaliumlösung gelb oder orange, welche Farbe durch verdünnte Schwefelsäure nicht in violett übergeht. Durch Ferrocyanwasserstoffsäure und ein Ferrisalz, durch Ferricyanwasserstoffsäure und ein Ferrosalz und durch Phosphomolybdänsäure und Zinnchlorür werden sie nicht blau gefärbt. In verdünnter Essigsäure (2 %) und in verdünnter Salzsäure sind die Präparate unlöslich. Auch in salpetriger Säure lösen sie sich nicht. Sie sind aber löslich in verdünnter Kalilauge ($4 \times \text{N}$) und in Sodalösung. Die Auflösung ist vollständig oder ein unlöslicher Rest bleibt zurück (*Plasmodiophora Brassicae*). Die Löslichkeit in verdünnten Alkalien und kohlensauen Alkalien bildet einen Unterschied mit den Resultaten der Acetylierung und Benzylierung.

Beim Erwärmen der Chitosanpräparate mit einer Lösung von *Bernsteinsäureanhydrid* bekommt man ähnliche Resultate wie mit Phtalsäureanhydrid. Nach der Behandlung werden die Präparate durch Jodjodkaliumlösung gelb oder orange gefärbt und diese Farbe geht durch Hinzufügung von verdünnter Schwefelsäure nicht in violett über. In verdünnter Essigsäure und verdünnter Salzsäure findet keine Lösung statt, aber wohl ist das Reaktionsprodukt löslich in verdünnter Kalilauge und Sodalösung.

Die folgende Methode kann man zur Kontrolle der obenbeschriebenen Versuche anwenden. Man behandelt die Chito-

sanpräparate mit einem Lösungsmittel, z. B. mit verdünnter Essigsäure und fügt darauf die Reagenzien hinzu. Man legt die Chitosanpräparate auf den Objektträger in ein Tröpfchen 2 %iger Essigsäure. Hierin löst sich das Chitosan. Darauf lässt man unter dem Deckglase ein der Reagenzien zufließen, nämlich Ferrocyanwasserstoffsäure, Ferricyanwasserstoffsäure, Phosphomolybdänsäure, naphthochinonsulfosaures Natrium, Pikrinsäure oder Picrolonsäure. Genannte Reagenzien verursachen häutige oder körnige Niederschläge. Die, welche Ferrocyanwasserstoffsäure, Ferricyanwasserstoffsäure und Phosphomolybdänsäure hervorrufen, färben sich resp. mit Ferrisalz, Ferrosalz und Zinnchlorür blau.

In einer früheren Abhandlung über die Mikrochemie der Pilzzellwände habe ich ¹⁾ erwähnt, dass man chitinhaltige Zellwände bis auf 300° C in Glyzerin erhitzen kann, ohne dass das Chitin sich dabei zersetzt und ohne dass das Gewebe destruiert wird, während viele andere Zellwandstoffe zersetzt und aufgelöst werden. Die chitinhaltigen Wände erfahren gleichsam eine Reinigung. Diese Methode kann man mit allen obenerwähnten Methoden kombinieren. Erst erhitzt man die Präparate bis auf 300° in Glyzerin, durch Erwärmen in konzentrierter Kalilauge verwandelt man das Chitin in Chitosan und darauf wendet man die verschiedenen Reaktionen an, welche Färbung und Auflösung hervorbringen. Die vorhergehende Erwärmung in Glyzerin dient zur Kontrolle und zur Verschärfung der Methode.

Ohne Erhitzen in Glyzerin gelingt es z. B. nicht in den Sporenschläuchen von *Peltigera canina* Chitin nachzuweisen. Die Hyphen und Paraphysen zeigen nach Erwärmen bis auf 160° C in konzentrierter Kalilauge sehr deutlich die Violettfärbung mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure. Bei den Sporenschläuchen wird diese Reaktion durch das Lichenin (nach *Berg* ²⁾ Isolichenin) maskiert, das in beträchtlicher Quantität anwesend ist und mit Jodreagenzien sich intensiv blau färbt. Mit anderen Reagenzien kann man bei den Hyphen und Paraphysen auch leicht Chitosan nachweisen, aber bei den Sporenschläuchen ist die Quantität dafür zu gering. Durch

¹⁾ l. c. p. 643.

²⁾ *Berg*, Jahresber. f. Chemie (1873), p. 849.

Erhitzen bis auf 300° in Glyzerin wird das Lichenin (Isolichenin) aus der Zellwand entfernt und danach findet mit Jod keine Blaufärbung mehr statt. Wenn man nach dem Erhitzen in Glyzerin die Präparate bis auf 160° in konzentrierter Kalilauge erwärmt und mit absolutem Alkohol auswäscht, so färben auch die Sporenschläuche sich mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure violett. Die Farbe ist deutlich aber hell. Der Rest der Sporenschläuche ist zum Teil löslich in verdünnter Essigsäure; er besteht deshalb nicht ganz aus Chitosan. Neben Lichenin (Isolichenin) und verschiedenen anderen Stoffen enthalten die Sporenschläuche offenbar auch etwas Chitin.

Zusammenfassung.

Chitin und Chitosan verhalten sich Reagenzien gegenüber sehr verschieden. Chitin ist ein verhältnismäßig indifferenten Körper. Es wird nur durch kräftige Reagenzien, wie starke Mineralsäuren, Ätzkalien und kräftige Oxydationsmittel angegriffen. Chitosan dagegen reagiert mit einer Menge verschiedener Stoffe. Was wir von der chemischen Struktur dieser beiden Körper wissen, reicht noch lange nicht aus, um das verschiedene Verhalten Reagenzien gegenüber zu erklären. Unsere Kenntnis von der chemischen Struktur des Chitins ist noch sehr unvollständig und ungewiss. Die chemische Struktur des Chitosans ist zwar auch noch nicht vollständig bekannt, aber durch die Untersuchungen der Chemiker ist doch soviel ans Licht gekommen, dass ich mit Erfolg nach neuen mikrochemischen Methoden suchen konnte zum Nachweis dieses Zersetzungsproduktes des Chitins.

Aus dieser Publikation geht hervor, dass man Chitosan nicht nur mittels Jod und einer Säure (verdünnte Schwefelsäure), sondern noch auf verschiedene andere Weisen mikrochemisch in den Zellwänden und Geweben nachweisen kann. Von den neuen Methoden erwähne ich zunächst einige, wobei die Zellwand gefärbt wird, als die Nachweisung des Chitosans mittels Ferrocyanwasserstoffsäure (Ferrocyankalium und verdünnte Schwefelsäure) und eines Ferrisalzes (Ammoniumferrisulfat), mittels Ferricyanwasserstoffsäure (Ferricyankalium und verdünnte Schwefelsäure) und eines Ferrosalzes (Ammoniumferrosulfat),

mittels Phosphomolybdänsäure und sehr verdünnter Zinnchlorürlösung, mittels 1,2-naphtochinon-4-sulfosaures Natriums, Pikrinsäure u. s. w. Bei Anwendung der drei ersten Methoden färben sich die Zellwände und Gewebe, die ursprünglich Chitin enthielten, blau, mit naphtochinonsulfosaurem Natrium orange und mit Pikrinsäure gelb. Die Präparate bleiben bei zweckmäßiger und sorgfältiger Behandlung vollkommen intakt.

Die genannten neuen Methoden zum mikrochemischen Nachweis des Chitins sind im allgemeinen sehr empfindlich und stehen der ausserordentlich empfindlichen Reaktion mit Jodjodkaliumlösung und verdünnter Schwefelsäure nur wenig nach. Im Fall die Präparate viel Chitosan enthalten, ist die Färbung sehr intensiv.

Ausser den genannten Methoden kann man noch andere anwenden, als Acylieren mit Essigsäureanhydrid, Phtalsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid u. s. w. und Methylieren. Auch können verschiedene Methoden kombiniert werden.

Zur näheren Kontrolle kann man noch die folgende Methode anwenden. Man legt die Chitosanpräparate auf den Objektträger in ein Tröpfchen verdünnter Essigsäure, in welcher das Chitosan sich löst; darauf lässt man unter dem Deckglase Reagenzien zufließen, die das Chitosan präzipitieren. Man erhält dann körnige oder häutige, manchmal gefärbte Präparate.

Alle Methoden können durch vorhergehendes Erwärmen bis auf 300° in Glycerin empfindlicher gemacht werden. Hierdurch werden viele Zellstoffe zersetzt und aus der Wand entfernt, z. B. das Lichenin (Isolichenin), das durch Jod intensiv blau gefärbt wird und demzufolge die Chitosanreaktion mit Jod und verdünnter Schwefelsäure maskiert. Chitin wird durch die Erhitzung nicht angegriffen.

Da sich in der Natur verschiedene Zellwandstoffe finden, die durch Jod blau oder violett gefärbt werden und auch Zellulose nach Behandlung mit konzentrierter Kalilauge Blau- oder Violett-färbung mit Jod zeigen kann, sind wiederholt Verwechslungen vom Chitin mit anderen Stoffen vorgekommen. Die neuen Methoden können jetzt zur Kontrolle angewendet werden.

Bei allen 10 untersuchten Fungi und bei den beiden untersuchten tierischen Objekten habe ich nach Erwärmung in konzentrierter Kalilauge bis auf 160° sowohl mit Jod und verdünnter

Schwefelsäure als mittels der neuen Methoden Chitosan resp. Chitin nachgewiesen.

Schliesslich bemerke ich, dass meine Beobachtungen nicht zu Resultaten geführt haben, auf deren Grund man annehmen könnte, dass in der Natur nicht ein einziges Chitin, sondern mehrere chemisch verschiedene chitinartige Körper vorkämen.

FIGURENERKLÄRUNG.

Die fünf Figuren stellen Präparate von Plasmodiophora Brassicae vor. Durch Erhitzen mit 50%iger Kalilauge bis auf 160° in zugschmolzenen gläsernen Röhrchen ist das Chitin in Chitosan umgewandelt. Darauf sind die Präparate mit absolutem oder 95%igem Alkohol ausgewaschen, in Wasser übertragen und, wie unten angegeben ist, mit verschiedenen Reagenzien behandelt worden.

Fig. 1. Mit verdünnter Jodjodkaliumlösung und 1%iger Schwefelsäure, wodurch Violettfärbung der chitosanhaltigen Membranen eintritt.

Fig. 2. Nach der Behandlung mit Jodjodkaliumlösung und 1%iger Schwefelsäure hat Einwirkung 66 $\frac{1}{2}$ - oder 76%iger Schwefelsäure stattgefunden, wodurch die Violettfärbung der chitosanhaltigen Membranen verschwindet und die zellulosehaltigen sich blau färben.

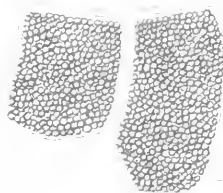
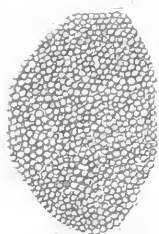
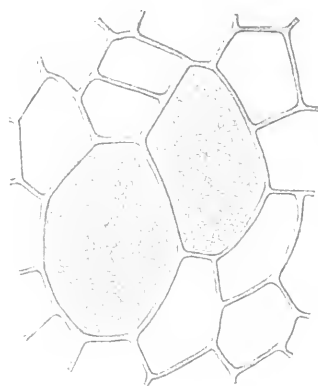
Fig. 3. Nach Behandlung mit Ferrocyanwasserstoffsäure (Ferrocyankalium und verdünnte Schwefelsäure), sorgfältigem Auswaschen oder Auskochen mit Wasser und Hinzufügung einer Ferrisalzlösung (Ammoniumferrisulfat), wodurch die chitosanhaltigen Membranen infolge der Bildung von Berlinerblau sich blau färben.

Wenn man anstatt Ferrocyankalium Ferricyanalkalium und anstatt eines Ferrisalzes ein Ferrosalz (Ammoniumferrosulfat) anwendet, färben sich die chitosanhaltigen Membranen infolge der Bildung von Turnbull's Blau auf ähnliche Weise.

Blaufärbung der chitosanhaltigen Membranen bekommt man auch, wenn man auf ähnliche Weise wie die oben genannten Reagenzien Phosphomolybdänsäurelösung und sehr verdünnte Zinnchlorürlösung anwendet.

Fig. 4. Die chitosanhaltigen Membranen sind durch Pikrinsäurelösung gelb gefärbt.

Fig. 5. Die chitosanhaltigen Membranen sind durch eine Lösung von 1,2-naphthochinon-4-sulfosaurem Natrium orange gefärbt.



THE BACTERIOLOGICAL DIAGNOSIS OF DIPHTHERIA ¹⁾

BY

Dr. C. W. BROERS.

Director of the Central Laboratory of Public Health at Utrecht.

Since more and more attention is being paid to the rôle, played by bacilli-carriers in the epidemiology of diphtheria, the importance of the bacteriological diagnosis of diphtheria has increased, but at the same time, the difficulties attached to it, have become better known. This is the chief reason why the bacteriology of diphtheria has enjoyed universal attention, specially of late. It therefore seemed to me a good idea, to make this subject a point of discussion in the Microbiological Society.

The first question, that presents itself, of course is, what is a diphtheria bacillus? The answer may be very short, namely, that it is a coryne-bacterium which may cause diphtheria in man.

The first part of this definition refers to a characteristic namely the appearance of club-shaped, rounded ends, which is typical for a large group of bacteria, to which the diphtheria bacillus also belongs. The second part is not open to experimental research. So in making a diagnosis the abovementioned definition does not hold good.

The diphtheria bacillus has met with the same fate as so many other pathogenic microorganisms; at first it was thought that the shape only would be enough to classify the microorganism, but very soon it got known, that the same morphological characters belonged to many other, also non-pathogenic

¹⁾ Introductory to the discussion of this subject at the meeting of the Microbiological Society held on 15th of January 1915 (translated by JEANNE SMIT).

bacteria and from that moment onward, other differentiating characters have been looked for.

It would be no use to sum up everything, that has become known of late years to characterize the diphtheria bacillus. I should - only like to mention the most important. Beside shape and non motility, it is in the first place its reaction on different stains, namely the irregular staining of the protoplasm by anilin dyes. The well-known staining method of NEISSER, which makes the metachromatic bodies of BABES-ERNST clearly visible, is based on this characteristic of the diphtheria bacillus.

In the second place its reaction on GRAM'S staining should be mentioned. Another character is found in the way in which it grows on different culture media, specially the rapidity and abundance of growth on LÖFFLER'S serum (ox or horse serum mixed to a proportion of 3:1 with glucose broth) and the nature of colonies formed on it.

As is the case with so many other bacteria, it has also been tried with the diphtheria bacillus, to find typical characteristics in its reaction on several carbohydrates; especially the production of acid in glucose containing media plays an important part as a diagnosticum and special attention is paid to the amount of acid produced.

Is it possible now to make out with the help of these details, which may be got in the way I suggested above and which belong all of them to morphological or cultural properties, if a pure culture we are working on is one of true diphtheria bacilli? In many cases, it is no doubt likely to be so, but we don't get certainty, we only approach the truth and the more we extend our investigation this way, the nearer we get to it.

Fortunately there are other characters which may help us somehow one way or the other. These are derived from the immuno-reactions and the experiments on animals. Analogical to what was taught by other pathogenic microorganisms, several serological reactions were tried for diphtheria too. In the first place I should like to mention the agglutination.

If we follow the working-method, used for example in typhoid, we don't get any satisfactory result. But other methods have been worked out, for instance about 5 years ago in the laboratory of Prof. SPRONCK in Utrecht, which gave very useful results.

Very good too seems to be the method, which Miss VAN RIEMSDIJK published some time ago in the »Centralblatt für Bakteriologie.«

With a strong agglutinable serum we certainly obtain again and again very marked differences between diphtheria bacilli und bacteria, which are more or less allied to them. It is my experience though and, as the bacteriological literature teaches, that of most experimentors, who have occupied themselves with diphtheria agglutination, that most unexpected surprises are obtained. Thus one culture possessing every possible character of a diphtheria bacillus, virulence included, is not agglutinated, as another strain which was thought to be one of pseudo-diphtheria agglutinates very well indeed. This must of course be due to the incomplete working-method and we may expect that the difficulties, that have presented themselves so far will disappear.

The precipitation reaction has not yet been able to find a place in the examination of diphtheria either. We tried to get something suitable out of the application of the thermo-precipitation, with which Ascoli had such splendid results with anthrax, but have failed so far. The complement fixation test does not give any result equal to the very complicated technical difficulties of this method.

It is much safer all round, to call in the assistance of the experiment on animals. The diphtheria bacillus is a toxin-producer and this toxin is not only harmful to man, but may also be very dangerous to a great many animals. In the guinea-pig we find an animal which specially suits our purposes. If a guinea-pig is injected subcutaneously with a sufficient dose of a toxincontaining medium, it will die in a few days and on obduction we will find the typical symptoms. If we bring only a small quantity of the toxin under the skin, in the way RÖMER suggested several years ago or after the method in which miss VAN RIEMSDIJK made some technical improvements, we get a very circumscript characteristic process on the skin.

Although we shall find in this way a very excellent method of identifying a culture of diphtheria, still more important are the results, that will be obtained by making use at the same time of the property of the toxin of being neutralised by its antitoxin.

If a second guinea-pig is injected with toxin and diphtheria antitoxin at the same time and if it is found that this guinea-pig remains without any symptoms, as another, being injected with taxin only, dies or gets some local reaction, it is proved with certainty, that the culture which produced the toxin is one of true diphtheria bacilli.

So we find in this a method to make out with certainty if a given culture consists of real diphtheria bacilli, but to my mind we must not conclude from the absence of a toxin harmful to guinea-pigs that the culture is not one of diphtheria.

I have now given you an outline of the principal methods which may be used by the examination of diphtheria; to wind up with I should like to mention the following: Give a culture to an experimenter trained in this part of bacteriology, put at his disposal a well-equipped laboratory and above all sufficient time, he will in most cases be able, though it may be after many weeks, to tell you with great probability if the culture you gave him was diphtheria or not.

But if we face the practical side of the question another problem crops up, as one of the provisions made, namely that of having plenty of time, fails here completely. A result obtained after weeks or months is hardly ever of any use to the answering of questions that face us in practice. What we want here is to know in the shortest time possible, if a person has diphtheria bacilli in his throat, nose or other part of his body.

In most cases the answer to this question cannot be given with absolute certainty in a short time, therefore we try to get as near to the truth as possible and all sorts of experiments are made to improve the working-methods.

In the Central Laboratory we have organised the diphtheria examination as follows: The medical man receives a wooden box containing two testtubes, in one of which there is a sterile swab of cottonwool; the other is a sloped tube of LOEFFLER'S serum. The practitioner rubs the mucous membrane of the patient with the swab and after that he rubs it over the serum. As soon as possible all this is sent to the Central Laboratory and on arriving there the swab is brushed over the surface of a Petri dish containing LOEFFLER'S serum. Both culture media, testtube and plate, are now incubated at 37° C.

After a certain time, varying from 18 to 24 hours, both media are examined. If there are separate colonies, which look very much like diphtheria colonies, microscopical preparations are made of them. If this is not the case and such colonies are not clearly visible we make a preparation of material taken from different parts of the plate. These films are stained by the new method of NEISSER with the modification of GINS. If trained assistants find bacilli which have the typical shape of diphtheria bacilli and contain the bodies of BABES-ERNST, then the diagnosis diphtheria is made.

By proceeding in this way we make use of the property of diphtheria bacilli to grow rapidly and abundantly on LOEFFLER's serum at body temperature in the shape of characteristic colonies and to exhibit within 24 hours by NEISSER'S stain very typically the metachromatic bodies.

May we be perfectly sure now by working in this way that our diagnosis is the right one and that no diphtheria bacillus escapes our attention? I should be the last to be positive as to that. As mentioned before we only get near the truth and I am convinced that in proceeding like this, a mistake is made occasionally in one direction or the other.

Being convinced of this it is easy to understand that people will try by all means to extend and improve upon the working methods. But at the same time the question arises whether the improvement achieved is proportional to the possibly longer duration of the examination. The solving of this problem will be the subject of the following lines.

In the first place let us pay attention to these modifications or extensions of the technical part which do not lead to prolong the examination. Over and over again it has been tried to find a culture medium able to stimulate the growth of diphtheria bacilli and to inhibit at the same time the growth of other microorganisms, specially those who are nearly related to diphtheria bacilli. Of the methods, which have been published recently, I should like to mention those of RANKIN and of CONRADI-TROCH. None of these culture media however came up to the expectation and up to the present the best results have been obtained with LOEFFLER's serum.

When the staining method of NEISSER is used it is considered

a drawback, that the shape of the bacteria is not always clearly visible; therefore a methyleneblue preparation was often made at the same time. But since GINS taught us how to avoid this difficulty, the double-stained preparation will do.

In some laboratories a second film is made and stained after GRAM, thus making use of the property of the diphtheria bacillus of being Gram-positive. Wanting to know if the addition of this manipulation, which would not delay the diagnosis but only cause a great extension of the routine work, would be a benefit, Miss SMIT has made pure cultures of a great many cases in which diphtheria bacilli were diagnosed by us and investigated their behaviour towards GRAM's stain. Only one of them was not immediately stained after GRAM. According to these investigations I cannot find sufficient reason for extending our working-method in this way.

So the shape and the relations to different stains not being able to procure any new information, let us now have a look at the other characteristics mentioned above. Before proceeding in this direction we must bear in mind that a pure culture of the microorganism we want to examine, is absolutely necessary and also that for investigating these characteristics we want some time, for the bacilli must grow in their new medium in order to show their characteristics.

In many a case and especially in those of a doubtful nature the diphtheria bacilli or what looks like them, are overgrown by other microorganisms to such an extent, that no distinct separate colonies are formed on the medium. If we want to get a pure culture it is necessary to make a new culture on an other plate of the most suspected places and we have got a separate colony then in at least 20 hours. But this may not always be possible, not seldom we have to repeat this operation and every one, who does this work regularly, knows by experience that the isolation often fails altogether.

It will be clear now, that there are some cases in which an almost pure culture, suitable for further investigations is obtained at once, but there are a great many cases in which we only succeed in 1 or 2 or more days. Now the question has to be raised as to whether a delay of 24 hours at least, but as a rule of two or more days, gives so much more certainty, that the

drawback of the delay is exceeded by the benefit of the greater correctness.

The characteristics which have to be considered, are those of the acid-production out of carbohydrates, the behaviour toward serological reactions and the power of producing toxin (virulence).

As long as there has been difference of opinion as regards the identity of the diphtheria bacillus the production of acid has played its part. Now ordinary broth was used, then again different carbohydrates were added, in most cases glucose-broth was employed. Some thought the acidproduction to be of differential-diagnostical value, others looked upon the amount of acid produced as a thing of great importance.

Of late little attention has been paid to the results obtained by this method, only recently Miss VAN RIEMSDIJK in the »Centrallblatt für Bakteriologie« brought the acidproduction out of glucose into prominence again. For this examination she made a good simplification of the culture-medium by using a pepton-solution and adding glucose and litmus. She looks upon this qualitative reaction as an important diagnosticum for the differentiating of diphtheria and pseudo-diphtheria.

It seemed very important to me, to investigate if by this method it would be easy to sort out our practical material. I expected that all diphtheria bacilli we diagnosed would produce acid in this medium. Miss SMIT was so kind as to examine one hundred pure cultures, isolated by her without making any choice whatever. Under these 100 strains only one did not produce acid and this was a bacillus, which looked suspicious by the the routine examination too.

For the working out of our practical material the acid-production does not give information of practical importance, so that I have not been able to find a reason why to extend our daily examination in this way. Against the drawback of the decision being delayed for one, or as a rule for more days, there is to my mind no sufficient advantage.

In the second place I mentioned the serological reactions, which might be useful to the extension of the working-methods. From what has been said above it may be concluded, that in my opinion none of these reactions give sufficiently reliable

information to be used in the daily routine work of a practical laboratory. It is probable however that the agglutination-test may prove to be of great value for the diphtheria diagnosis.

Much longer I should like to dwell on what was mentioned in the third place, namely the estimation of the virulence. For this purpose guinea-pigs are generally employed. A certain quantity of a toxin-containing medium is injected subcutaneously or a small portion of the culture is inoculated cutaneously. In the first case we try to give such a quantity of toxin that the animal is killed within a few days and on obduction the characteristic symptoms of diphtheria-death are looked for, namely subcutaneous oedema at the seat of the inoculation, a serous exudate in the pleural cavity and pericardium and enlargement with strong hyperaemia of the suprarenal glands. By the cutaneous inoculation we intend to get a local reaction, which presents itself at first as an infiltration, afterwards as a necrosis of the skin.

As I noticed before the simultaneous inoculation of a control guinea-pig, having received a dose of antitoxin, may greatly increase the importance of a positive result.

Let me now give an outline of the course which is followed by the method of such a virulence-estimation. Of a small portion of the mucous membrane of throat or nose a little of the secretion-product is taken, this is rubbed over the surface of a culture-medium, hoping that every bacterium present will form a separate colony and if necessary, culturing is repeated on a new medium till we reach our end. Thus we go out for our further investigations if possible from one or otherwise from a few bacilli. Of the descendants of this bacillus we want to make sure whether any toxin is formed or not.

It is known however, that the toxinproduction is dependent on various circumstances, e. g. the composition of the medium, the length of growth, the temperature etc. By the estimation of the pathogenicity, as far as the practical side is concerned, no attention can be paid to these matters without making the experiment too extensive. In all cases one fixed scheme has to be followed. This takes place either by inoculation directly from a serum-culture as soon as a pure culture is obtained, or by inoculating after the bacteria have grown for a certain time, fixed for all cases, in some liquid medium. Now we al-

ways inject the animal with the same quantity of material and read of the result after a certain time, fixed in advance.

If the virulence-estimation has a positive result we will probably not be far from the truth if we infer that the microorganism is a diphtheria bacillus, which may produce a toxin also harmful to man. The same cannot be said of a negative result.

As we have selected one or a few bacilli among millions and millions from one part of the mucous membrane of the throat, as we have cultivated it after a fixed schema and inoculated it on a guinea-pig, and as we now find that after a certain time the animal shows no signs of disease, we conclude, that in the throat of the person examined no diphtheria bacilli are to be found, which may produce by growth on a human mucous membrane a toxin, which may be harmful to man.

This conclusion rests after all on too weak a basis even for praxis. What if we had altered the scheme a little? If we had swabbed another part of the throat, or selected another bacterium for further cultivation or if we had given it another medium for the toxinproduction and prolonged the time of the growth a little or injected a larger quantity and observed the guinea-pig a little longer? Might not the result have been different? And above all we have to bear in mind, that a guinea-pig cannot be compared in every way to man. A bacillus, which may be quite harmless to a cavia, may surely be pathogenic to man; the following experience may illustrate this.

In October 1914 a few soldiers in the south of our country got angina with membrane-formation and a few days slight raise of temperature. The medical man thought it diphtheria and material was sent to us. We found bacteria in it, which were positively diagnosed by us as real diphtheria bacilli.

A small epidemic of angina arose among these soldiers; persons in the same lodgings, or who came in some other way in closer contact, infected each other and in all 15 had to be taken to the infirmary with throataffections. Some of them were scarcely ill, others had distinct membranes in their throat and with the great majority diphtheria bacilli could be diagnosed. Of a great many we isolated a pure culture and it was tried in every way to get a toxin harmful to guinea-pigs. We were not successful however, neither by subcutaneous nor by

cutaneous inoculation. Our cultures proved non-pathogenic for guinea-pigs.

Now we had to do here with a small epidemic of throataffections, which resemble diphtheria clinically; the infection passes from one person to another, but the virus is not very virulent to man. In most cases bacilli are isolated from the throat, behaving in every way like diphtheria bacilli, also as regards the acid-production, but non-virulent to guinea-pigs. Now what had we got here? I should like to say a diphtheria bacillus slightly pathogenic to man and non-pathogenic to guinea-pigs. To diagnose here that it were no diphtheria bacilli because the guinea-pigs remained healthy seems to me too theoretical.

It will be understood now, that the absence of virulence for guinea-pigs is not always easy to demonstrate and that a negative result does not always prove a valuable help to identify the bacteria found. And above all if we think, that we obtain these results only after several days, it will be clear that not too much attention should be paid to the estimation of the virulence for the practical diphtheria-diagnosis.

On reading all this one may get the impression, that the bacteriological diagnosis of diphtheria seems to be rather a desperate thing. But as a rule this is not the case, as may appear from the following lines.

We shall have to draw a sharp line as to what is intended at with the examination. There is namely a great difference whether we get material for examination from diseased persons, convalescents or healthy individuals.

If a person is attacked by an affection of some mucous membrane, which makes the general practitioner think of diphtheria and if the doctor sends material for examination, the diagnosis hardly ever affords many difficulties. If the method, used in this laboratory is applied and if within 24 hours bacilli are found, which are considered to be diphtheria bacilli and if on account of this state of affairs and of the clinical observations diphtheria is diagnosed, the chance of making a mistake is exceedingly small.

The same cannot be said of a negative result of the bacteriological examination; here we must bear in mind the possibility of the material not being taken from the right place or disin-

fectants being present in the throat or also of course the possibility of diphtheria bacilli being overlooked by the laboratorium-examination. A repetition of the examination is desirable in such cases and as a rule will make the continued clinical observation correspond with the bacteriological examination. The great difficulties of the bacteriological diphtheria diagnosis must not be looked for here.

Secondly the question is raised daily, if in the throat or nose of a person, who has suffered from diphtheria, diphtheria bacilli are still present. This may be the case a long time, but it would not be right to think that it is the rule. In the larger majority of cases the bacilli are not to be found any more soon after the clinical recovery.

Then we get rather a large group of individuals, with whom one or two weeks after the recovery diphtheria bacilli can still be demonstrated, and there only remains a small minority, with which after the time mentioned diphtheria bacilli can still be diagnosed.

If an individual had a clinically and bacteriologically diagnosed diphtheria and if a short time after his clinical recovery bacteria are still found, which according to our examination have to be identified as diphtheria bacilli, we may diagnose without making too great a mistake, that they are in reality diphtheria bacilli. Here also the diphtheria-examiner is not running too great a risk.

If the time during which the bacilli are still found, gets extraordinarily long and the difficulties caused by the measures which have to be taken, gets greater, the time has come to consider if the diagnosis of diphtheria is perhaps wrongly made and so we get here a material, exceedingly fit for elaboration in the smallest details of the methods of the bacteriological diphtheria diagnosis. In this case there is no reason for special hurry, because it does not matter very much, if the examination takes a few days longer.

We perform these continued examinations repeatedly, mostly at the request of an impatient doctor. We mostly find then that the bacilli present answered to the greatest demands, which we may put to a diphtheria bacillus and mostly they are also virulent to guinea-pigs. As so many others we have

been able to isolate from the throat of recovered diphtheria patients bacilli, which were very virulent to guinea-pigs even after many months.

So at the control-examination of convalescents the necessity of extension of the routine work is only felt as an exception.

Now I have come to the most difficult part of the diphtheria examination, namely the searching for diphtheria bacilli in nose or throat of healthy individuals.

In recent years a material extending over many thousand persons had to be examined in our laboratory in order to discover diphtheria-carriers. It is my experience that the presence of bacilli in throat or nose, which we must consider as diphtheria bacilli, does not occur to so alarming a degree as some wanted to make us believe. It is not exceptional that we find at a school-examination, extending over many a hundred of children, only a few diphtheria-carriers.

The search for diphtheria-carriers may often be very useful and very well practicable. For instance this was the case with an examination made last summer in a holiday-home («Vacantie-kolonie»). A case of clinically and bacteriologically true diphtheria occurred there, while some other children had slight affections of the throat. Now here the search for carriers seemed to be in the right place; it only concerned a small number — 40 à 50 — the isolation of those individuals by whom the result was positive, was easily practicable and the danger of spreading the infection was very great.

Now by this examination a number of slightly affected and perfectly normal bacilli-carriers were actually found, that is to say that they were diagnosed as positive by the quick method used by us for the discovery of diphtheria bacilli. Here also the examination had to be made quickly, a too scrupulous weighing again and again of the diagnosis would have rendered the useful result very problematic and therefore we used in this also case the ordinary investigation methods. In some cases arbitrary chosen we finished the examination to the end and by this was shown, that the isolated microorganisms were really typical diphtheria bacilli virulent to guinea-pigs.

Let us contrast to this example of a useful examination for diphtheria-carriers an unuseful one. In a village there is much

diphtheria and consequently also among the schoolchildren. The schools are closed and now by the reopening of the schools no children are admitted unless they are free from diphtheria bacilli; therefore all the schoolchildren have to be examined and if possible all 1000 together and if not then 250 daily. It is rightly observed, that if it is not finished at once, there may be a chance of the child being infected afterwards and therefore the examination would be of no use; but the impossibility of doing such a huge investigation with due accuracy is not thought of. There are too many sources of mistakes on the long way between the throat of the person examined and the microscope of the bacteriologist.

In the searching for diphtheria-carriers we miss the important help of the clinicus for making our diagnosis; only in these cases, where a close contact has existed between the persons examined and a diphtheria-patient we get an indication which may be of some use to us. In other cases we are referred to the bacteriological examination only. Moreover this examination has to be done as soon as possible, for only by quick decision some success of the measures taken may be expected. Therefore we are exposed at such examinations to far greater mistakes than at those of patients or convalescents.

Only under special circumstances we may get any results valuable for the practical hygiene. As such favourable circumstances may be mentioned: a small number of persons living in close contact with each other, provided that sufficient isolation of the individuals, diagnosed as carriers, is possible. Further it will be a great benefit to the result, if the regulation of the examination on the spot and the laboratory-work are in one hand or take place in mutual consultation.

Under these favourable circumstances the examination of the children of one or two classes of a school may sometimes give useful results. The examination on a large scale of a whole school-population or of every schoolchild in a small town, is not practicable in such a way, that the results can serve as a foundation for practical hygienic measures. The trouble, which is caused and the work that has to be done, are certainly not in accordance to the results obtained.

BACTERIUM (PROTEUS) ANINDOLOGENES N. SP.

PAR

J. J. VAN LOGHEM, — *Amsterdam.*

En étudiant les urines d'un malade pneumaturique j'isolai 1) — il y a dix ans — un bacille qui montre une forte ressemblance avec le bacille de HAUSER (*Bacterium vulgare* Hauser): un bâtonnet mobile, liquéfiant rapidement la gélatine, faisant fermenter des sucres, etc., et donnant une coloration rouge-vineux dans les cultures peptonisées, aux quelles on a ajouté de l'acide sulfurique pur et de la nitrite de potassium (réaction de l'indol de SALKOWSKI).

STEENSMA 2) démontra que cette matière colorée n'était nullement identique au nitrosindol; alors qu'on peut distiller l'indol, la substance-mère de la matière rouge de notre bacille ne quitte pas le milieu peptonisé, soumis à la distillation.

Cette différence entre le bacterium (*Proteus*) vulgare et notre bacille s'est montré d'une constance absolue. Les cultures de ce dernier en solution de peptone WITTE donnent jusqu'aujourd'hui une réaction forte de SALKOWSKI, tandis que les autres réactions de l'indol restent négatives. Notre nouveau bacille-*Proteus* est alors incapable de séparer l'indol de la peptone, par conséquent j'ai proposé de le considérer comme une espèce nouvelle sous le nom *Bacterium (Proteus) anindologenes*.

Depuis on a rencontré plusieurs représentants de notre nouvelle espèce.

J'ai pu isoler une deuxième culture du *B. anindologenes* du pus d'un abcès de la paroi abdominale d'un malade, soigné en 1906 dans la clinique du Professeur RUITINGA; cet abcès provenait probablement de l'intestin.

Aucune différence n'a pu être constatée entre le bacille du pus et celui de l'urine du malade pneumaturique; ses cultures en milieu peptonisé donnaient la même *pseudoréaction de*

SALKOWSKI et, ce qui était important : un sérum de lapin immunisé contre le bacille de l'urine agglutinait aussi le bacille du pus.

Pendant notre séjour à Sumatra, ma femme et moi avons fait des recherches spéciales sur la fréquence du *bacterium anindologenes* 3). Sur 30 »bacilles-Proteus«, isolés du contenu de l'intestin humain, 27 donnaient les réactions de l'indol, et 3 la pseudoréaction de SALKOWSKI.

Ces trois derniers nous les avons examinés aussi au point de vue sérologique et comparés avec le bacille pneumaturique et des proteus indologènes. Nous avons immunisé des lapins contre nos bacilles »anindologènes«, et d'autres lapins contre les vrais Proteus Hauseri et nous avons examiné le pouvoir agglutinant des sérums de tous ces lapins vis-à-vis des différents bacilles.

Les résultats de ces expériences n'étaient pas douteux ; les »sérums anindologènes« agglutinaient tous les quatre représentants de notre nouvelle espèce sans aucune influence spécifique sur des bacilles indologènes, tandis que toute action spécifique des »sérums indologènes« vis-à-vis des bacilles anindologènes était absente (v. table I).

Récemment M. BAUDET 4) a publié un mémoire sur les réactions de l'indol dans lequel il annonce avoir isolé à Leyde de nouveau trois bacilles proteus anindologènes, donnant la pseudoréaction de SALKOWSKI.

Une des cultures provenait du pus d'un empyème, les deux autres furent isolés des urines. M. BAUDET a eu la bienveillance de mettre ces cultures à notre disposition.

Au point de vue morphologique et biochimique (v. table II) les trois cultures isolées à Leyde se montrent identiques aux bacilles isolés autrefois à Amsterdam et aux Indes Néerlandaises ; cependant, je n'ai pas réussi à démontrer directement leur identité mutuelle par les méthodes sérologiques.

Des sérums agglutinants, préparés avec un des bacilles de

M. BAUDET, *donnaient des réactions spécifiques* avec les deux autres, isolés par ce bactériologiste; leur identité mutuelle est donc hors de doute. Ces sérums n'ont en général pas d'action agglutinante sur le bacille isolé autrefois par moi dans le cas de pneumaturie (v. table III).

Pas contre, un sérum préparé avec le bacille »pneumatistique« est négatif vis à vis les trois bacilles de Leyde (v. table IV).

Seulement en certaines expériences avec des sérums de lapins qui ont été injectés plusieurs fois on peut constater de la coagglutination (v. table V).

Les mêmes expériences ont été répétées selon la méthode BORDET-GENGOU.

Un sérum, préparé vis à vis un des bacilles de Leyde, et laissé en contact avec des suspensions de ces bacilles, dévie le complément de cobaye, tandis que le complément n'est pas dévié si ce sérum est mélangé avec le bacille pneumatistique.

Le même résultat négatif était obtenu en mélangeant un sérum pneumatistique avec les bacilles de Leyde.

En résumant nous pouvons conclure que parmi les différentes espèces du groupe »Proteus« il y a au moins une espèce qui se distingue des autres par l'impuissance de produire de l'indol en milieu peptonisé. Dans le milieu peptonisé on constate la présence d'une matière qui donne une coloration rouge-vineux (un peu plus rouge que le nitrosindol) avec l'acide nitrique et la nitrite de potassium (STEENSMA).

Jusqu'ici des bacilles »anindologènes« ont été isolés huit fois :

- I. Urines d'un malade pneumatistique (Amsterdam).
- II. Pus d'un abcès de la paroi abdominale (Amsterdam).
- III.)
- IV.) Contenu de l'intestin humain (Sumatra).
- V.)
- VI.)
- VII.) Urines de deux malades (Leyde).
- VIII. Pus d'un empyème (Leyde).

I, II, III, IV et V se sont montrés identiques par la méthode de l'agglutination.

L'identité de VI, VII et VIII a été prouvée de la même manière et par la méthode BORDET-GENGOU.

La preuve sérologique de l'identité mutuelle de tous ces bacilles anindologènes n'est pas donnée; en certaines expériences seulement nous avons constaté de la coagglutination.

Il me semble que ces résultats plutôt négatifs ne justifient pas encore la séparation des deux groupes de bacilles, isolés à Amsterdam-Sumatra et à Leyde. Ils existent dans la microbiologie plusieurs faits qui prouvent que la sérologie n'est pas toujours capable de déterminer à quelle espèce un microbe quelconque appartient. Nous savons seulement que deux bacilles qui sont influencés de la même manière par le même sérum sont apparentés, souvent identiques; le résultat négatif de l'expérience sérologique ne justifie pas des conclusions si décisives.

Il est nécessaire que nous disposions d'un grand nombre de »*Proteus anindologenes*« avant de pouvoir formuler une opinion plus précise sur l'identité des bacilles décrits ci-dessus. Provisoirement je propose de les considérer tous comme des représentants de la même espèce: *Bacterium (Proteus) anindologenes*.

Tout récemment BERTHELOT ⁵⁾ a publié la première partie de ses recherches sur un grand nombre de bacilles-proteus, qui prouvent que des bacilles »non-indologènes« isolés par cet auteur sont capables de produire de l'indol dans un milieu contenant du tryptophane.

M. BERTHELOT n'a pas expérimenté avec les bacilles non indologènes isolés par nous, de sorte que nous ne savons pas si les bacilles examinés par lui sont identiques aux nôtres. C'est inutile alors de répondre en détail aux amples considérations de cet auteur qui l'amènent à la conclusion que »l'espèce *Proteus anindologenes* VAN LOGHEM n'a aucune raison d'être«.

Les recherches de M. BERTHELOT ne changent rien au fait que notre bacille diffère du vrai *Bacterium (Proteus) vulgare* par l'impuissance de produire de l'indol en milieu peptonisé et qu'il y forme une substance qui donne une coloration rouge avec de l'acide sulfurique et de la nitrite.

Cette double propriété est tellement caractéristique et constante qu'il est impossible de l'ignorer; il ne peut être question qu'il s'agit ici de la *variation* d'une propriété biochimique comme M. BERTHELOT le prétend.

Au point de vue biologique nous considérons l'impuissance constante de notre bacille anindologène de séparer de l'indol de cet »édifice moléculaire très complexe«: la peptone, comme beaucoup plus importante que le fait qu'on peut trouver de temps en temps de l'indol dans des cultures qui contenaient d'avance déjà le tryptophane ou d'autres substances peu complexes ¹⁾.

Mars 1915.

BIBLIOGRAPHIE.

1. J. J. VAN LOGHEM, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bnd. 38, 1905. S. 425.
 2. F. A. STEENSMA, Centralbl. f. Bakteriologie. Abt. I. Orig. Bnd. 41, 1906. S. 295.
 3. J. J. VAN LOGHEM und J. C. W. VAN LOGHEM-POUW, ibid. Bnd. 66., 1912. S. 19.
 4. E. A. R. F. BAUDET, Folia microbiologica. T. II, 1913 p. 261
 5. A. BERTHELOT, Annales de l'Institut Pasteur, 1914, sept.-octobre.
-

¹⁾ Ce dernier point sera examiné de plus près par M. STEENSMA; c'est donc à sa prochaine publication que je renvoie le lecteur.

TABLE I.
Pouvoir agglutinant d'un sérum anindologène vis à vis
des bacilles anindologènes et indologènes.

	Contrôle	Dilutions.			
		50	100	250	1000
B. proteus anindologenes V.C. 16	—	clar.	clar.	clar.	(clar.)
» » » V.C. 8	—	+++	+++	+++	++
» » » L.D. 2	—	clar.	clar.	clar.	+++
» » » Pneumaturie.	—	clar.	clar.	clar.	+++
B. proteus indologenes V.C. 2	—	—	—	—	—
» » » V.C. 4	—	+	+	—	—
» » » V.C. 6	—	—	—	—	—
» » » V.C. 12	—	—	—	—	—
» » » V.C. 13	—	—	—	—	—
» » » V.C. 14	—	—	—	—	—
» » » V.C. 23	—	—	—	—	—
» » » Pol.	—	—	—	—	—

—, réaction négative.

+, réaction très faible.

+++ , ++ réaction plus au moins forte, sans clarification complète.

clar. (clar.) clarification complète ou presque complète.

TABLE II.
Morphologie et biochimie du *Bacterium anindologenes*.

	Cas de pneumaturie	Absès paroi abdom.	Sumatra intestin humain.			Leyde (BAUDET).		
						urines I.	urines II.	empyème.
Bâtonnet.....	+	+	+	+	+	+	+	+
mobilité.....	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram.....	— ¹⁾	—	—	—	—	—	—	—
aérob. facult.....	+	+	+	+	+	+	+	+
liquéf. gélatine...	+	+	+	+	+	+	+	+
indol (distill.)....	—	—	—	—	—	—	—	—
pseudindol.....	+	+	+	+	+	+	+	+
(SALKOWSKI)								
glycose.....	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz
lactose.....	—	—	—	—	—	—	—	—
saccharose.....	—	—	—	—	—	—	—	—
mannite.....	—	—	—	—	—	—	—	—
Petruschky.....	+ ²⁾	—	—	—	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾
pomme de terre...	brunâtre	—	—	—	brunâtre	brunâtre	brunâtre	brunâtre
Hémolysines.....	+	—	+	+	+	+	+	+

¹⁾ Dans les cultures très jeunes on peut observer des bacilles qui prennent plus ou moins le Gram.

²⁾ D'abord rouge, après quelques jours bleu.

TABLE III.

Pouvoir agglutinant d'un sérum ¹⁾ anindologène (Leyde Urines I) vis à vis les trois bacilles anindologènes de Leyde, le bacille Pneumaturie et un Proteus Indologène.

	Con- trôle.	Dilutions.			
		50	100	500	1000
B. proteus anindologenes, Leyde Urines I.	—	(clar.)	(clar.)	+++	++
» » » » II.	—	+++++	+++++	+++++	++
» » » » Empyème.	—	+++++	+++	+++++	++
» » » Pneumaturie.	—	—	—	—	—
» » indologenes (HAUSER).	—	—	—	—	—

¹⁾ Le lapin a été injecté deux fois.

TABLE IV.

Pouvoir agglutinant d'un sérum ¹⁾ anindologène (Pneumaturie) vis à vis le bacille Pneumaturie, les trois b. anindologènes de Leyde et un Proteus indologène.

	Con- trôle.	Dilutions.		
		50	100	500
B. proteus anindologenes Pneumaturie.	—	+++++	+++++	+++
» » » Leyde Urines I.	—	—	—	—
» » » » II.	—	—	—	—
» » » » Empyème.	—	—	—	—
» » indologenes (HAUSER).	—	—	—	—

¹⁾ Le lapin a été injecté deux fois.

TABLE V.

Sérum du même lapin de l'expérience Table IV, après 4 injections.

	Con- trôle.	Dilutions.				
		50	100	500	1000	
B. proteus anindologenes Pneumaturie.	—	(clar.)	(clar.)	+++++	++	III
» » » Leyde Urines I.	—	—	—	—	—	
» » » » II.	—	+++	+++	+++	+	
» » » » Empyème.	—	—	—	—	—	
» » indologenes (HAUSER).	—	—	—	—	—	

TABLE VI.

Déviatiou du complément dans les mélanges d'un sérum anindologène Leyde (Urines II), d'un sérum anindologène pneumaturique et d'un sérum normal, avec le bacille *Proteus pneumaturique*, les bacilles anindologènes de Leyde et un *proteus indologène* (HAUSER).

$\frac{1}{4}$ c. c. sérum anindologène	Quantité du complément (sérum de cobaye 1 : 12).				
	O	$\frac{1}{2}$ c c	1 c c	2 c c	
(Leyde Urines II) avec 1 c c suspension pendant 1 heure à 37° C.	B. anindologenes Urines I.	—	D	D	+
	» » » II.	—	D	D	+
	» » Emyème.	—	D	D	(+)
	» » Pneumaturie.	—	+	+	+
	» indologenes (HAUSER).	—	+	+	+
$\frac{1}{4}$ c c sérum anindologène (Pneumaturie) avec 1 c c suspension pendant 1 heure à 37° C.	B. anindologenes Urines I.	—	+	+	+
	» » » II.	—	+	+	+
	» » Emyème.	—	+	+	+
	» » Pneumaturie.	—	D	(D)	+
	» indologenes (HAUSER).	—	+	+	+
$\frac{1}{4}$ c c sérum normal avec 1 c c suspension pendant 1 heure à 37° C.	B. anindologenes Urines I.	—	+	+	+
	» » » II.	—	+	+	+
	» » Emyème.	—	(+)	+	+
	» » Pneumaturie.	—	+	+	+
	» indologenes (HAUSER).	—	(+)	+	+

D = déviation du complément = pas d'hémolyse après avoir ajouté le système hémolytique (chèvre-lapin).

+ = pas de déviation (hémolyse). Il suffit de placer les tubes pendant une $\frac{1}{3}$ heure dans l'étuve, et *après dans la glacière*, pour éviter l'action hémolytique des bacilles.

[Aus dem pathologischen Institut der
Reichstierarzneischule zu Utrecht.
Direktor: DR. H. MARKUS].

BEITRAG ZUR WERTBESTIMMUNG DER TUBERKULINPROBE BEIM HUH NACH VAN ES UND SCHALK

VON

Dr. H. SCHORNAGEL,

Prosektor am Institut.

Die Vogeltuberkulose ist bekanntlich eine sehr verbreitete Krankheit, welche speziell unter den Hühnern grosse Verluste verursachen kann. Zur Bekämpfung dieser Krankheit ist es in erster Linie notwendig, dieselbe möglichst früh zu erkennen. Es ist eine ziemlich leichte Aufgabe das Vorkommen chronischer Tuberkulose in einem Hühnerbestand zu diagnostizieren. Wenn die Tiere nach längerem Siechtum, unter Abmagerung das Eine nach dem Anderen sterben, kann man mit grosser Gewissheit die Diagnose Tuberkulose stellen; besonders sei auch hingewiesen auf die Vergrösserung der Lymphknoten am kaudalen Ende des Halses, welche beim lebenden Tiere deutlich wahrnehmbar ist. Die Sektion der gestorbenen Tiere bestätigt die Diagnose. Auch kann man, bei der geringen Wert des Einzeltieres ein verdächtiges Huhn töten und obduzieren.

Ist die Tuberkulose also leicht zu erkennen bei schwerkranken und toten Tieren, unmöglich war dies bis vor kurzem bei Hühnern mit geringen Läsionen. Bei Versuchen zur Ausrottung der Krankheit kann man alle Tiere töten und Ställe und Hof desinfizieren, und dann wieder neue gesunde Tiere ankaufen, oder man tötet nur die kranken Tiere und lässt die übrigen, anscheinend gesunden Hühner in den desinfizierten Ställen. Sollen diese Massregeln Erfolg haben, so muss man ganz bestimmt sicher davon sein, dass unter den neuangekauften oder den am Leben gelassenen Tieren kein einziges, auch nur im

geringsten Grade, an Tuberkulose leidet; ist dies doch der Fall, so kann man nach kurzer Zeit wieder aufs Neue anfangen.

Es ist selbstverständlich, dass kurz nach der Einführung des Tuberkulins als Diagnostikum, ihre diagnostische Wert auch bei Vögeln geprüft worden ist. Mehrere Untersucher haben das Tuberkulin, bereitet von Tuberkelbazillenkulturen verschiedener Herkunft, auf den bekannten Weisen angewandt, subkutan, kutan und konjunktival, die Versuche schlugen alle fehl. Aus diesem Grunde schrieb KLIMMER 1) im Jahre 1911: »Ist Tuberculose in einen Geflügelbestand eingeschleppt, so bleibt zur sicheren Tilgung, da eine exakte Erkennung der bereits Erkrankten von den Gesunden nicht möglich und somit eine erfolgreiche Absonderung ausgeschlossen ist, nichts anderes übrig, als den ganzen verseuchten Bestand abzuschlachten und die Ställe, Gerätschaften, und den Geflügelhof zu reinigen und zu desinfizieren«.

Im April 1914 erschien ein »Bulletin of the North Dakota Agricultural Experiment Station« von L. VAN ES und A. F. SCHALK über »Vogeltuberkulose« 2). In dieser Arbeit beschreiben die Autoren ihre Versuche über die Anwendung von aus Vogeltuberkelbazillenkulturen bereitetes Tuberkulin bei Vögeln. Bekannt mit den Misserfolgen der obengenannten Methoden haben v. E. und S. die intrakutane Methode von MOUSSU und MANTOUX 3) angewandt, und mit sehr guten Resultaten. Als Injektionsstellen sind Kehllappen und Kamm gewählt, weil die Haut an diesen Stellen nicht so äusserst dünn ist, als die befiederte Haut.

Die Resultate von den Versuchen von v. E. und S. waren folgende:

Anzahl der Tuberkulinproben	601.
» der sezierten Hühner	227.
» der sezierten Hühner mit Tuberkulose	125.

Tuberkulöse Hühner mit positiver Reaktion	88 (97.77 %)
Gesunde Hühner » » »	2 (2.23 %)

Gesunde Hühner mit negativer Reaktion	120 (91.53 %)
Tuberkulöse Hühner » » »	10 (8.47 %)

Gesunde Hühner mit zweifelhafter Reaktion	30	(52.64 %)
Tuberkulöse Hühner »	»	» 27 (47.36 %)

Als im August 1914 eines der Versuchshühner dieses Institutes an spontaner Tuberkulose starb, war dies für mich Anlass die Methode von v. E. und S. bei den 10 übrigen, scheinbar gesunden Tieren anzuwenden. Von diesen Tieren zeigten die Nummer 5, 6 und 7 eine positive und No. 8 eine zweifelhafte Reaktion ¹⁾. Da diese Versuche gerade in den Ferien stattfanden habe ich die vier reagierenden Tiere nicht getötet, sondern isoliert und die Probe nach einigen Monaten wiederholt. Ich gebe hier die Beschreibung der zweiten Versuchsreihe; ich habe hierbei den Angaben von v. E. und S. gefolgt.

Beim ersten Versuch habe ich einige Tiere im Kehllappen, andere im Kamme injiziert, die letzte Stelle gefiel mir gar nicht; erstens ist die Ausführung technisch viel schwerer, zweitens ist die Beurteilung, besonders bei platten Kämmen mit ihrer unregelmässigen Form, nicht so leicht. Die Injektion an einen Kehllappen hat noch den Vorteil, dass man den Verlauf der Reaktion vergleichen kann mit dem anderen, nicht injizierten Lappen.

Statt 50 % Vogeltuberkulin benutzte ich Roh-Tuberkulin. Das Tuberkulin stammte, weil momentan kein im hiesigen Institute bereitetes Vogeltuberkulin vorhanden war, in beiden Versuchsreihen vom Reichsseruminstitut zu Rotterdam.

Zur Injektion benutze man eine kleine Rekordspritze und möglichst feine Hohnadeln. Die Epidermis der Vogelhaut ist durchwegs dünn, zart und schichtenarm; die Dicke der Oberhaut steht im umgekehrten Verhältniss zur Dichtigkeit der Befiederung. Man unterscheidet ein Stratum profundum und ein Stratum corneum. Ich fand das Stratum profundum der Brusthaut eines Huhnes nur 2—3 Zellschichten dick (kleine runde Zellen), das Stratum corneum war ungefähr zweimal so dick. Beim selben Huhn war das Str. profundum am Kamm und Kehllappen bis zu 9 Schichten dick, das Str. corneum dagegen nur sehr dünn. Es versteht sich das eine intrakutane Injektion in der nur 2—3 Zellschichten dicke Epidermis der befiederten Haut technisch unmöglich ist. Doch kostet es dem Anfänger auch viel Mühe die Nadel in der dickeren, aber doch noch sehr

¹⁾ Siehe die Tabelle.

dünne Oberhaut vom Kehllappen und Kamm so einzustecken, dass die Flüssigkeit gerade in die untersten Schichten der Epidermis gelangt; der Umstand dass die Oberhaut der Vögel sehr bröcklig ist, erschwert die Injektion erheblich. Man muss die dünne Nadel fast parallel an der Hautoberfläche einstecken; empfindet man nun bei der Injektion einen Widerstand und wird die Haut in der Umgebung blass, so ist der Einstich gelungen. Geht die Injektion leicht von Statten, so beweist dies, dass die Flüssigkeit ins Corium oder die Subkutis gelangt und ist der Versuch misslungen; dies ist ebenfalls der Fall wenn eine Blase entsteht, diese berstet und das Tuberkulin fließt ab. Es schadet nichts, die Injektion an eine naheliegende Stelle zu wiederholen, der grosse Kehllappen bietet dazu auch Raum genug.

Es scheint mir angemessen die Haut vorher mit Alkohol zu desinfizieren. Als Injektionsstelle wähle man die Mitte der äusseren Fläche des linken Kehllappens, weil dies für die Ausführung die bequemste Stelle ist. Die Menge der injizierten Flüssigkeit ist sehr gering, weniger als ein Tropfen.

Die Hühner werden am 2. November 1914, vormittags 11 Uhr injiziert.

Huhn No.	Tuberkulin- probe im August '14.	Tuberkulinprobe am 2. November 1914, vormittags 11 Uhr.						Sektionsbefund.
		5 St. nach Injekt.	24 St. nach Injekt.	48 St. nach Injekt.	72 St. nach Injekt.	96 St. nach Injekt.	120 St. nach Injekt.	
1	—	±	—	—	—	—	—	Tuberkulosefrei.
2	—	±	—	—	—	—	—	»
3	—	±	—	—	—	—	—	»
4	—	+	—	—	getötet	—	—	»
5	++	+	+++	+++	getötet	—	—	Tuberkulos.
6	++	+	+++	+++	getötet	—	—	»
7	++	+	++	+	±	±	—	»
8	±	+	++	+	±	±	—	»
					getötet			
9	—	—	—	—	—	—	—	Tuberkulosefrei.
10	—	—	—	—	—	—	—	Tuberkulos.

— Keine Anschwellung. ± Sehr geringe Anschwellung. + Mässige Anschwellung.
++ Starke Anschwellung. +++ Sehr starke Anschwellung.

5 Stunden nach der Injektion zeigen die Nummer 1, 2 und 3 eine geringe örtliche Anschwellung an der Impfstelle; die Nummer 4, 5, 6, 7 und 8 eine ödematöse Anschwellung des ganzen Kehllappens und die Nummer 9 und 10 gar keine Reaktion.

24 Stunden nach der Injektion ist die Anschwellung der Nummer 1, 2, 3 und 4 kaum merkbar mehr; die Nummer 5, 6, 7 und 8 zeigen eine sehr starke, ödematöse Anschwellung; der Kehllappen ist sehr viel dicker und länger als der Kontroll-Lappen, dabei ein wenig blässer, die Temperatur des Lappens ist nicht erhöht, das Ganze macht den Eindruck einer mit Flüssigkeit gefüllten Tasche. Die Nummer 9 und 10 zeigen keine Reaktion.

Nach 48 Stunden ist die Anschwellung der Nummer 5 und 6 noch eben so stark als am vorigen Tage; die Anschwellung der Nummer 7 und 8 ist geringer. Behufs mikroskopischer Untersuchung werden die Nummer 5 und 6 nach 48 Stunden getötet. No. 8 zeigt nach 72 Stunden eine kaum merkbare Anschwellung und wird dann getötet. Die Anschwellung der No. 7 ist nach 96 Stunden verschwunden; das Tier wird nach 9 Tagen getötet.

Die Nummer 1, 2, 3 und 4 welche nach 5 Stunden eine geringe, örtliche Anschwellung zeigten, aber nach 24 Stunden und später gar keine, werden resp. 30, 9, 17 und 3 Tage nach der Injektion getötet; sie sind alle völlig frei von Tuberkulose.

No. 9 und 10 haben gar keine Anschwellung gehabt, sie werden resp. nach 35 und 30 Tagen getötet. No. 9 ist tuberkulosefrei; No. 10 hat in der Leber zwei stecknadelkopfgrosse, hyaline Knötchen welche Tuberkelbazillen enthalten.

No. 5 positive Reaktion; getötet nach 48 Stunden. Sektionsbild: Zwei verkäste Herdchen in den Lungen, viel Tuberkelbazillen; ein hyalines Knötchen in der Leber, keine Tuberkelbazillen; Halslymphknoten speckig geschwollen, sehr viel Bazillen.

No. 6 positive Reaktion; getötet nach 48 Stunden. Sektionsbild: In der nicht vergrösserten Milz ein stecknadelkopfgrosses, verkästes Herdchen mit Tuberkelbazillen; Halslymphknoten nicht vergrössert, wenig Tuberkelbazillen. (Reaktion: siehe die Photo).

No. 7, positive Reaktion; getötet nach 9 Tagen. Sektionsbild: Sehr vermagert, chronische Tuberkulose von Milz, Leber und Halslymphknoten, zahlreiche Tuberkelbazillen.

No. 8 positive Reaktion; getötet nach 3 Tagen. Sektionsbild:

Ein wenig vermagert; chronische Tuberkulose von Milz, Leber und Halslymphknoten, sehr viel Bazillen.

Von allen Hühnern wurden die Organe auf genaueste untersucht, und wurden Deckglaspräparate angefertigt nicht nur von verdächtigen Knötchen, sondern auch von Leber, Milz und Nieren, Halslymphknoten und Darmschleim, auch von den gesunden Tieren.

Wenn man die sehr geringe Anschwellung einigen Stunden nach der Injektion nicht als eine Reaktion betrachtet, sondern nur die starke Vergrößerung des ganzen Kehllappens welche nach 24 Stunden und später anwesend war, dann haben wir folgende Resultate:

Untersuchte Hühner	10
Tuberkulöse Hühner mit positiver Reaktion	4
» » » negativer »	1
Tuberkulosefreie » » » »	5
» » » positiver »	0

Von den tuberkulösen, reagierenden Tieren war nur eines sichtbar krank (no. 7) die anderen waren klinisch vollkommen gesund.

Auf 10 Fällen haben wir also 1 Misserfolg. Das betreffende Tier, ein sehr kräftiger, wohlernährter Hahn, ist erst 30 Tage nach der Tuberkulinprobe getötet worden; die Tuberkulose war noch sehr jung und geringgradig, sodass die Möglichkeit, ja selbst eine grosse Wahrscheinlichkeit besteht, dass das Tier *nach* dem Versuch infiziert worden ist.

Aus obigen Versuchen geht hervor, dass die von VAN ES und SCHALK angegebene Methode ein vorzügliches Diagnostikum und ein kräftiges Hilfsmittel zur Tilgung der Hühnertuberkulose ist; besonders auch weil die Methode, nach einiger Übung, technisch nicht schwer ist, und die Beobachtung vom Verlauf der Reaktion leicht und schnell geschehen kann. Auch ist die Methode vorzüglich um Versuchshühner auf Tuberkulose zu prüfen; wo die Spontan tuberkulose bei dieser Tierart so häufig vorkommt, ist es natürlich vom grössten Wert ein Mittel zu besitzen die scheinbar gesunden Tieren auf dieser Krankheit untersuchen zu können. Zwar kommen Misserfolge vor, wenn aber von einer Sendung Hühner eines oder mehrere reagieren, sind alle anderen doch verdächtig und jedenfalls für Tuberkulose-

versuche nicht zu benutzen. — Auch scheint mir in Fällen wo ein oder mehrere Tiere reagieren eine Wiederholung des Versuches nach einiger Zeit sehr empfehlenswert, da die fehlerhafte, negative Reaktion auch durch technische Fehler verursacht sein kann.

Mikroskopisch zeigen die geschwollenen Kehllappen ein starkes Ödem, das Bindegewebe ist aufgelockert und zwischen den Fasern findet sich eine teils homogene, teils körnige Masse; weiter sieht man eine starke leukozytäre Infiltration, wobei besonders die eosinophilen Zellen in den Vordergrund treten. Die Blutgefäße zeigen keine Veränderungen; nur enthalten sie relativ mehr weisse Blutkörperchen als normal.

Im Februar 1915.

L I T E R A T U R.

1. Handbuch der Serumtherapie und Serumdiagnostik in der Veterinär-Medizin; herausgegeben von KLIMMER und WOLFF—EISNER, 1911. S. 169.
 2. L. VAN ES und A. F. SCHALK, Avian Tuberculosis. Bulletin no. 108 of the North Dakota Agricultural Experiment Station, April 1914. -- Ausgebretete Literatur-verzeichnis. — Eine kürzere Arbeit über denselben Gegenstand von VAN ES erschien in »Zeitschrift f. Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere, Bnd. XIV, 1913. S. 271«.
 3. Bulletin de la Soc. centrale de médecine vétérinaire, T. 85. 1908. pag. 500.
-

TAFEL XVII.

Folia Microbiologica III.
(Schornagel.)



Positive Reaktion; starke Anschwellung des
linken Kehllappens 48 Stunden nach der Injektion.
(Huhn n^o. 6).

[Aus dem Institut für Bakteriologie und
Hygiëne der Universität Groningen]

UEBER DIE KULTIVIERBARE BAKTERIENMENGE MENSCHLICHER FÄZES

VON

J. IDZERDA

Assistenten am Institut.

Die Anwendung der mikroskopischen Zählungsmethode von A. KLEIN ¹⁾ bei der bakteriologischen Untersuchung der Fäzes normaler, erwachsener Menschen mit gemischter Kost hat ergeben, dass in diesen Fäzes eine weit grössere Bakterienzahl vorhanden ist, als man auf Grund der bisher ausschliesslich benutzten Kulturmethode annehmen zu dürfen meinte. Andere Untersucher ²⁾, die gleichfalls die mikroskopische Zählungsmethode anwendeten, haben diese wichtige Tatsache vollends bestätigt. Auf Grund der angestellten Untersuchungen darf angenommen werden, dass die mittleren Bakterienzahlen, welche man mittels der Kulturmethode gefunden hat, zwischen 100.000 und 800.000, die, welche man mittels der mikroskopischen Zählungsmethode gefunden hat, zwischen 58 Millionen und 375 Millionen, per mg frische Fäzes schwanken ³⁾.

Dieser ungeheure Überschuss mikroskopisch zählbarer Bakterien kann auf verschiedene Weisen erklärt werden:

1^o Dieser Überschuss mikroskopisch zählbarer Bakterien besteht aus abgestorbenen Individuen;

2^o Diese Bakterien sind in lebendem Zustande in den Fäzes vorhanden, aber sie sind, wenigstens nach den für die

¹⁾ A. KLEIN, Zentralblatt f. Bakt. und Parasitenkunde, Abt. I, Bd. 27.

²⁾ Siehe u. a. MACNEAL, LATZER und KERR. The Journal of Infectious Diseases, Vol. 6.

³⁾ A. KLEIN und F. VISSER. Diese Folia, Bd. 2

kwantitative Bestimmung gebräuchlichen Methoden nicht kultivierbar.

Eine dritte Möglichkeit: diese Bakterien sind wohl lebend, und unter gewöhnlichen Umständen auch wohl auf unseren gebräuchlichen Nährböden kultivierbar, aber in den Fäzes in derartig geschwächtem Zustande vorhanden, dass sie sich nicht mehr vermehren können, auch wenn sie unter die allergünstigsten Lebensbedingungen gebracht werden, kann ausser Betracht bleiben. Bakterien, die sich nicht vermehren können und nur ein latentes Leben führen, können weder in den Fäzes, noch im Darmkanal irgend welche Rolle spielen; dergleichen geschwächte Bakterien sind praktisch den abgestorbenen Bakterien gleichzustellen.

Die Frage, ob alle oder ein grosser Teil der mikroskopisch zählbaren Bakterien in lebendem Zustande anwesend sind, ist von entscheidender Bedeutung für die Bestimmung des Sterilitätsindex der Fäzes, d. i. der Sterbezahl der in den Fäzes befindlichen Bakterienbevölkerung; diese Sterbezahl ist die Resultante der bakteriziden Prozesse, welche sich im Darmkanal abspielen.

Im voraus ist es schon schwer anzunehmen, dass dieser Überschuss mikroskopisch zählbarer Bakterien sich wohl in den menschlichen Fäzes, nicht aber in unseren künstlichen Nährböden vermehren könnten.

Ferner hat sich ergeben, dass durchschnittlich ungefähr 50 % der mikroskopisch zählbaren Bakterien, was die Form betrifft, zu der Koligruppe gehört; von diesen 50 % kommt nur eine äusserst kleine Fraktion auf den Platten zur Entwicklung. Die Bakterien von der Koligruppe sind auf den meisten unserer künstlichen Nährböden sehr leicht kultivierbar, und es liegt also kein einziger Grund vor, dass dieser grosse Überschuss mikroskopisch wahrnehmbarer koliforme Bakterien keine Kolonien auf unseren Nährböden erzeugen würden, wenn sie lebend wären.

Weiter deuten die sogenannten Kadaverformen ¹⁾ der Bakterien, welche zumal in grosser Zahl in den Kaninchenfäzes vorhanden sind (in den menschlichen Fäzes in kleinerer Anzahl)

¹⁾ A. KLEIN, Archiv für Hygiene, Bd. 45.

darauf hin, dass wenigstens ein Teil der mikroskopisch zählbaren Bakterien abgestorben ist. Eine vollständige Uebereinstimmung zwischen der Anzahl Kadaverformen und der Anzahl mikroskopisch zählbarer Bakterien, auch wenn diese grösstenteils abgestorben sind, kann nicht erwartet werden. Sogleich nach dem Tode der Bakterien wird das Bakterienprotoplasma noch schön gleichmässig tingiert. Erst längere Zeit nach dem Tode trennt sich die chromatische von der achromatischen Substanz des Bakterienprotoplasmas: erstere ist in der Form von einem oder mehreren Körnern angehäuft sichtbar, während dazwischen der Rest des Protoplasmas keinen oder nur wenig von dem Anilinfarbstoff aufnimmt. Noch später haben auch diese Körner das Vermögen verloren, den Farbstoff aufzunehmen, und ist die Bakterie nur noch als ein äusserst leicht gefärbter »Schatten« wahrnehmbar. Diese Kadaverformen sind so fragil, dass sie beim Färben der Präparate nach der KOCHSchen Methode (vorhergehende Trocknung der Präparate) grösstenteils auseinanderfallen und nicht mehr wahrgenommen werden; bei der Anwendung der mehr schonenden Färbungsmethode nach A. KLEIN ¹⁾ bleiben sie bestehen.

Und schliesslich hat A. KLEIN ²⁾ auf experimentellem Wege den Beweis geliefert, dass dieser Überschuss mikroskopisch zählbarer Fäzesbakterien auch in den Fäzes selber sich nicht mehr vermehren können. Zu diesem Zwecke wurden die menschlichen Fäzes mit physiologischer Salzlösung verdünnt, um eventuell vorhandene bakterizide Einflüsse zu verringern, respektive aufzuheben, und bei 37° C. aufgestellt; nach einigen Tagen stimmte die Zunahme der Anzahl mikroskopisch zählbarer Bakterien genau überein mit der während dieser Zeit erfolgten Zunahme der kultivierbaren Bakterien.

Auf der anderen Seite ist es wohl völlig ausgeschlossen, dass es möglich wäre derartigen Lebensbedingungen bei der Kultur auszuwählen, dass *alle* lebende Bakterien der Fäzes ausnahmslos auf den Platten zur Entwicklung kommen würden. Zahlreiche Bakterienarten sind uns bekannt, welche sich auf unseren gewöhnlichen Nährböden nur schwer oder gar nicht

¹⁾ A. KLEIN, Zentralblatt für Bakt. und Parasitenkunde, Abt. I, Bd. 25.

²⁾ A. KLEIN, l. c.

züchten lassen. Es ist aber hier die Frage, ob die Zahl solcher zwar lebenden, aber nicht züchtbaren Bakterien, welche eventuell in den menschlichen Fäzes vorhanden sind, so gross sein kann, dass diese Anzahl eine mehr oder weniger wichtige Fraktion der mikroskopisch zählbaren Bakterien bildet und also auf die aus dem gegenseitigen Verhältnis zwischen kultivierbaren und mikroskopisch zählbaren Bakterien zu ziehenden Schlüsse von merkbarem Einfluss sein könnte. Zu einem derartigen Einfluss müsste bei dem ungeheuren Überschuss mikroskopisch zählbarer Bakterien, welche in den menschlichen Fäzes vorhanden sind, die Zahl solcher lebenden, aber nicht züchtbaren Bakterien wirklich noch sehr gross sein. Zahlreiche Untersucher haben die Kulturverhältnisse für die Bakterien der menschlichen Fäzes auf verschiedene Weisen variiert, um so eine möglichst grosse Anzahl lebende Bakterien hervortreten zu lassen. Es gelang eben nicht aus den Fäzes eine Anzahl Bakterien zu kultivieren, die mit der mikroskopischen Zahl auch nur einigermaßen zu vergleichen wäre. Wohl wurden Differenzen angetroffen; es waren aber im allgemeinen nur Differenzen, wie sie auch bei Kulturplatten gefunden werden, welche unter vollkommen denselben Verhältnissen gezüchtet werden. Nur zwei Untersucher bilden hiervon eine Ausnahme. MATSUSHITA ¹⁾ fand in der Regel eine weit grössere Anzahl kultivierbare Bakterien (in einem Falle sogar 18 Millionen per mgr Fäzes) wenn er einen besonderen Nährboden verwendete, welcher aus Leber oder Leber und Galle (Leber-Agar und Leber-Galle-Agar) angefertigt war, wenn er bei 37° C. züchtete, und wenn er unter anaeroben Verhältnissen kultivierte. COHENDY ²⁾ versuchte gleichfalls einen Nährboden herzustellen, welcher möglichst mit dem natürlichen Milieu, worin die Fäzesbakterien leben, übereinstimmte. Er machte eine Bouillon aus der Darmwand, Magenwand und angrenzenden Organen (Leber, Pankreas, u.s.w.) von Hunden, Schafen, Schweinen und Hühnern. Aus einer derartigen Bouillon machte er, nach Zusatz von 0,9 % Glykose, einen Nähragar für die bakteriologische Untersuchung der menschlichen Fäzes. Bei Verwendung dieses Agars bekam er

¹⁾ MATSUSHITA, Archiv für Hygiene, Bd. 41.

²⁾ COHENDY, C. r. de la Soc. de Biol., T. 60 et 63.

aus menschlichen Fäzes ungefähr 70 Mal mehr Bakterien als auf gewöhnlichem Agar; unter anaeroben Bedingungen fand er 58—77 % der Gesamtzahl kultivierbarer Bakterien.

Ich habe dieses Problem, der Kontroversen wegen, nochmals eingehend untersucht.

Für die Untersuchung wurden gebraucht die frischen Fäzes erwachsener Menschen mit gemischter Kost. Eine gewisse Menge dieser Fäzes (immer mindestens einige Gramme) wurde genau abgewogen und in einem sterilisierten Mörser unter allmählicher Hinzufügung der 20-fachen Menge sterilisierter, physiologischer Kochsalzlösung zu einer Emulsion verrieben. Von dieser Emulsion wurde mittels einer sterilisierten Pipette 10 ccm in einen sterilisierten Kolben mit sterilisierten Porzellan-kügelchen gebracht, und dieser Kolben, nach Hinzufügung von 90 ccm sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung, während längerer Zeit tüchtig geschüttelt. Von dieser letzteren Emulsion wurden mit einer Platinöse von bekannter Kapazität (3.37 mgr) die Platten gegossen. Für die Herstellung der Agarplatten wurde stets der Inhalt der Platinöse zuerst in ein sterilisiertes Reagenzröhrchen mit 1,5 ccm sterilisierter Salzlösung hinüber gebracht, die Flüssigkeiten gut gemischt, in das Röhrchen der flüssige Agar gegossen, gut geschüttelt, und schliesslich der Inhalt des Röhrchens zu einer Platte ausgegossen.

Kultiviert wurde:

1. Auf gewöhnlichem Nähragar	bei 37° C. unter aeroben Bedingungen
2. Auf gewöhnlicher Nährgelatine	bei 20° C. » » »
3. Auf 1 %-igem Glykoseagar	bei 37° C. » » »
4. Auf 1 %-igem »	bei 37° C. » anaeroben »
5. Auf 1 %-iger Glykosegelatine	bei 20° C. » » »
6. Auf Leber-Galle-Agar (nach MATSUSHITA)	bei 37° C. » aeroben »
7. Auf Leberagar (» »)	bei 37° C. » » »
8. Auf » (» »)	bei 37° C. » anaeroben »

Von den Fäzes wurde zugleich der Gehalt an festem Stoff bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Tabelle I. Die Zahlen beziehen sich stets auf die aus zwei Platten berechnete Durchschnittszahl.

Unter aeroben Bedingungen sind die Differenzen zwischen den auf den verwendeten Nährböden gefundenen Bakterienzahlen untereinander nicht grösser als die, welche man auf einem und demselben Nährboden zwischen mehreren von einer Rein-

TABELLE I.

Bakterienzahl durch Kultur gefunden und berechnet auf , mgr. frischen Fäzes.

Nr. der Untersuchung.	Prozentgehalt festen Stoffes der Fäzes.	Kultiviert aerob bei 37° C. auf				Kultiviert anaerob bei 37° C. auf		Kultiviert aerob bei 20° C. auf Gelatine.	Kultiviert anaerob bei 20° C. auf Glykosegelatine.
		Nähr-Agar.	Glykose-Agar.	Leber-Galle-Agar.	Leber-Agar.	Glykose-Agar.	Leber-Agar.		
I	25 %	3.813	4.216	3.906	—	4.619	—	—	2.294
II	29 %	4.154	5.363	2.251	—	588	—	—	620
III	31 %	2.542	6.541	2.852	—	2.418	—	2.604	0
IV	18 %	12.245	12.679	17.503	—	4.712	—	9.548	9.579
V	28 %	216.154	255.750	196.536	—	177.134	—	155.208	28.489
VI	34 %	23.498	11.346	20.770	—	26.412	—	22.894	3.007
VII	26 %	7.192	8.940	5.518	—	4.092	—	8.122	5.878
VIII	30 %	245.830	254.758	213.931	—	24.614	—	302.589	123.504
IX	27 %	159.216	179.118	166.208	—	102.455	—	184.078	153.225
X	35 %	3.565	4.185	2.988	—	62	—	2.729	1.147
XI	27 %	2.666	4.154	5.394	—	415	—	2.976	818
XII	28 %	18.592	17.233	18.011	—	7.533	—	39.494	13.206
XIII	34 %	99.956	125.887	108.438	—	85.560	—	115.413	64.558
XIV	24 %	30.791	31.620	30.318	33.728	—	—	28.210	28.334
XV	32 %	5.580	5.404	4.278	5.456	5.332	4.774	3.346	1.480
XVI	25 %	13.392	16.120	21.390	23.312	2.666	5.356	26.102	341
XVII	30 %	3.286	2.852	1.406	8.184	961	1.054	1.922	806
XVIII	27 %	16.430	16.430	11.136	14.260	559	2.853	15.292	1.985
XIX	28 %	42.222	39.680	30.814	34.131	28.489	24.025	31.682	30.020
XX	29 %	525.413	508.496	507.501	447.005	31.930	28.703	527.403	394.059
XXI	26 %	2.052	2.133	1.767	2.076	837	775	1.016	279

kultur von Bakterien hergestellter Platten, antreffen kann ¹⁾; die Nährmedien von MATSUSHITA bieten keinen einzigen Vorteil über den gewöhnlichen Nähragar und den Glykoseagar. Das Kultivieren bei 20° C. (Gelatine) weist ebensowenig einen bedeutenden Unterschied auf gegen das Züchten bei 37° C. Nur beim Kultivieren unter anaeroben Verhältnissen ist die Bakterienzahl in der Regel kleiner, in vielen Fällen sogar ganz erheblich kleiner, als beim Züchten unter aeroben Bedingungen; auch hier wies der Leberagar keinen einzigen Vorteil auf über den 1 %-igen Glykoseagar. Auf 1 %-iger Glykosegelatine bei 20° C. war die Anzahl unter anaeroben Verhältnissen kultivierter Bak-

¹⁾ HEHEWERTH, Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von A. KLEIN und einige Anwendungen derselben. Inaug. Diss. Amsterdam, 1900 und Archiv für Hygiene, Bd. 39.

terien bald grösser, bald kleiner als die, welche gezüchtet war unter anaeroben Bedingungen auf 1 %-igem Glykoseagar bei 37° C.; aber auch auf der Gelatine unter anaeroben Verhältnissen blieb die Zahl der Kolonien regelmässig zurück, oft sehr viel zurück, hinter der Kolonienzahl, welche unter aeroben Bedingungen erzielt war, sowohl bei 37° C. wie auf Gelatine bei 20° C.

Noch deutlicher treten diese Verhältnisse hervor, wenn man die Durchschnittszahlen von allen verrichteten Bestimmungen betrachtet.

TABELLE II.
Durchschnittszahlen berechnet aus Tabelle I.

Zahl der untersuchten Fäzes.	Nährböden.	Aerob bei 37° C.	Anaerob bei 37° C.	Aerob bei 20° C.	Anaerob bei 20° C.
21	Nähragar.....	68.599			
21	Glykoseagar.....	71.567			
20	Glykoseagar.....		25.568		
21	Leber-Galle-Agar....	65.415			
8	Leber-Agar.....	71.016			
7	Leber-Agar.....		9.649		
19	Gelatine.....			77.928	
20	Glykosegelatine.....				43.361

Die mittleren Bakterienzahlen, welche sowohl bei 37° C. als bei 20° C. auf den verschiedenen Nährböden gefunden sind, zeigen eine sehr schöne Übereinstimmung; nur die Kultur unter anaeroben Verhältnissen bietet weniger günstige Bedingungen für die Entwicklung der Fäzesbakterien.

Man hat nicht das Recht die Anzahlen unter aeroben und anaeroben Verhältnissen kultivierter Bakterien zusammenzufügen, und diese Zahl als die Gesamtzahl der aus den Fäzes gezüchteten Bakterien anzugeben, so lange nicht der Nachweis geführt ist, dass die unter anaeroben Bedingungen kultivierten Platten andere Bakterienarten gewähren als die unter aeroben Verhältnissen kultivierten. COHENDY ¹⁾ berechnet, dass durchschnittlich 58—76 % der aus den menschlichen Fäzes kultivierbaren Bakterien aus anaeroben Bakterien bestehen; der Rest wird von fakultativ

¹⁾ COHENDY, l. c. ²⁾ MATSUSHITA, l. c.

anaeroben Bakterien gebildet. Ganz willkürlich nimmt COHENDY hierbei an, dass die unter anaeroben Bedingungen kultivierten Bakterien auch obligat anaerobe Bakterien sind, welche auf den aeroben Platten nicht wachsen.

Die Sache verhält sich aber ganz anders. Auf den unter anaeroben Verhältnissen kultivierten Platten wachsen gleichfalls die fakultativ anaeroben Bakterien, welche auch auf den aeroben Platten mitgezählt werden. Um mich hiervon zu überzeugen, habe ich von einigen, unter anaeroben Bedingungen entwickelten Platten, eine grosse Anzahl verschiedene Kolonien abgeimpft, und untersucht zu welcher Gruppe von Bakterien sie gerechnet werden mussten. Ohne Ausnahme gediehen die isolierten Bakterienarten, obgleich sie von anaeroben Platten herstammten, weit besser unter aeroben Verhältnissen als unter anaeroben; bei näherer Untersuchung zeigte sich, dass alle isolierten Kolonien Koli- oder koliforme Bakterien waren. Die unter anaeroben Verhältnissen kultivierten Bakterien bestehen mithin zum weitaus grössten Teil aus fakultativ anaeroben Kolibakterien, welche also auch auf den aeroben Platten gefunden werden. In diesem Zusammenhang erklärt es sich auch, dass MATSUSHITA, obgleich er in der Regel auf seinen anaeroben Platten weit mehr Kolonien zählen konnte als auf seinen aeroben, unter den 44 verschiedenen Bakterienarten, welche er bei seinen Untersuchungen aus den menschlichen Fäzes isoliert hat, keine einzige obligat anaerobe Art erwähnt.

Hiermit ist aber durchaus nicht gesagt, dass in den Fäzes normaler, erwachsener Menschen mit gemischter Nahrung obligat anaerobe Bakterien gänzlich fehlen würden; im Gegenteil, durch bestimmtes Anreicherungsverfahren gelingt es regelmässig dieselben in den Fäzes nachzuweisen. Die Plattenkultur unter anaeroben Verhältnissen wird aber nur selten zu der Isolierung obligat anaerober Bakterien führen können, weil die Anzahl dieser Bakterien in den menschlichen Fäzes so ausserordentlich gering ist; die kleine Zahl dieser Bakterien kann der Anzahl unter aeroben Bedingungen kultivierter Bakterien gegenüber, völlig vernachlässigt werden.

Von den untersuchten Fäzes habe ich überdies noch die Anzahl unter anaeroben und aeroben Verhältnissen kultivierbare Dauerformen der Bakterien bestimmt. Zu diesem Zweck wurde

ein Teil der zweiten Fäzesverdünnung während 10 Min. bei 80° C. erwärmt und jedesmal mit 2 ccm dieser erwärmten Verdünnung Platten gegossen. Die Sporen wurden kultiviert auf:

- 1^o. 1 %-igem Glykoseagar bei 37° C. unter anaeroben Bedingungen.
 2^o. 1 %-iger Glykosegelatine » 20° C. » » »
 3^o. Gewöhnlichem Nähragar » 37° C. » aeroben »
 4^o. Gewöhnlicher Nährgelatine » 20° C. » » »

Die Resultate dieser Bestimmungen sind dargetan in Tabelle III; die Sporenzahlen sind angegeben per 1000 mgr frische Fäzes.

TABELLE III.

Zahl der kultivierten Bakteriensporen in 1000 mg frischen Fäzes.

Nr. der Untersuchung.	Kultiviert aerob auf		Kultiviert anaerob auf	
	Nähragar bei 37° C.	Gelatine bei 20° C.	Glykoseagar bei 37° C.	Glykosegela- tine bei 20° C.
I	—	—	—	—
II	10.200	3.200	0	0
III	600	100	1.700	100
IV	400	100	200	200
V	1.800	400	50	550
VI	600	400	15.050	77.000
VII	200	0	1.600	100
VIII	350	100	—	—
IX	400	—	1.800	850
X	600	400	700	150
XI	15.000	14.800	1.100	850
XII	600	—	3.100	—
XIII	6.900	150	9.500	—
XIV	1.400	900	3.600	350
XV	1.800	200	500	—
XVI	4.400	400	1.100	300
XVII	1.700	1.500	300	500
XVIII	1.000	600	2.300	300
XIX	6.200	600	5.900	300
XX	25.800	500	36.450	550
XXI	600	500	550	0

Die Zahl der kultivierbaren Dauerformen ergibt sich als äusserst gering und beträgt für beide Gruppen, sowohl aerobe wie anaerobe, durchschnittlich 4 Sporen per mg frische Fäzes. Die Anzahl unter anaeroben Verhältnissen kultivierbarer Sporen beträgt also nur 0.057 ‰, der Durchschnittszahl (± 70.000 per

mg frische Fäzes) der aus denselben Fäzes kultivierten, vegetativen Bakterienformen gegenüber.

Da weitaus die Mehrzahl der obligat anaeroben Bakterien zu den Sporenbildnern gehören, beweist auch dieses Ergebnis von neuem, welch eine geringe Anzahl obligat anaerober Bakterien in den Fäzes erwachsener Menschen anwesend sind.

Wenn ich voraussetze, dass die unter aeroben und anaeroben Verhältnissen kultivierten Sporen zu verschiedenen Bakterienarten gehören, finde ich im ganzen vorhanden 0.114 ‰ kultivierbare Sporen, gegenüber der Gesamtzahl der aus den Fäzes kultivierbaren Bakterien; dem ungeheuren Überschuss der in diesen Fäzes vorhandenen mikroskopisch zählbaren Bakterien gegenüber, wird diese pro-Mille-Zahl natürlich noch viel kleiner. Aus den Untersuchungen von A. KLEIN und F. VISSER ¹⁾ ist weiter hervorgegangen, dass die Anzahl mikroskopisch zählbarer Sporen in menschlichen Fäzes, als Durchschnittszahl aus einer grossen Reihe von Bestimmungen, $4\frac{1}{2}$ ‰ der Gesamtzahl vorhandener, mikroskopisch zählbarer Bakterien beträgt. Hieraus geht also hervor, dass in den Fäzes erwachsener Menschen, ebenso wie dies sich schon erwiesen hatte für die vegetativen Bakterienformen, nur eine äusserst kleine Fraktion der vorhandenen Sporen auf den Platten zur Entwicklung zu bringen ist; weitaus die Mehrzahl der mikroskopisch wahrnehmbaren Sporen in den menschlichen Fäzes ist wahrscheinlich abgestorben.

Zusammenfassung.

1. Weder auf besonderen Nährböden, noch auch unter anaeroben Bedingungen oder bei 37° C. lässt sich eine bedeutend grössere Bakterienmenge aus den Fäzes normaler, erwachsener Menschen kultivieren.
2. Die Zahl der obligat anaeroben Bakterien in den Fäzes Erwachsener ist sehr gering.
3. Der ungeheuere Überschuss mikroskopisch zählbarer Bakterien in den Fäzes Erwachsener ist als abgestorben zu betrachten.
4. Die Zahl der Dauerformen in den Fäzes Erwachsener ist sehr gering; die übergrosse Mehrheit dieser Dauerformen ist ebenfalls als abgestorben zu betrachten.

¹⁾ A. KLEIN und F. VISSER, l. c.

STÄNDIGE MITARBEITER DER FOLIA MICROBIOLOGICA:

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.

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica“ veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u. A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Artikel kostenfrei.

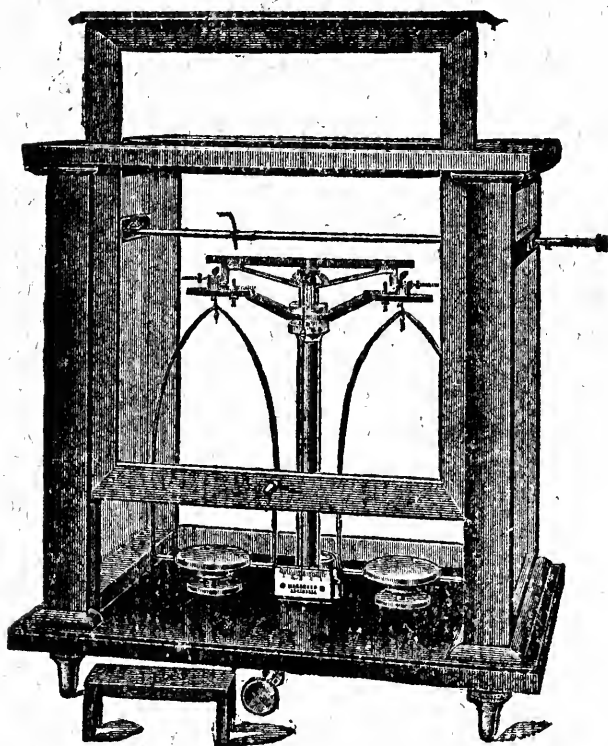
Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 3–4 Mal jährlich. Der Jahrgang von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie) fl. 12.—, 20 Mark, fr. 24.—, £ 1, § 5 (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica“ sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

BECKER'S SONS

BRUMMEN (GELDERLAND).

FILIAAL: VAN BRAKELSTRAAT 29a.



ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN- EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN
— VAN BESTUUR, ENZ. ENZ. —

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHIEDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY



NEW YORK BOTANICAL GARDEN LIBRARY

3 5185 00251 5292

