



Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

- + *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.
- + *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.
- + *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.
- + *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

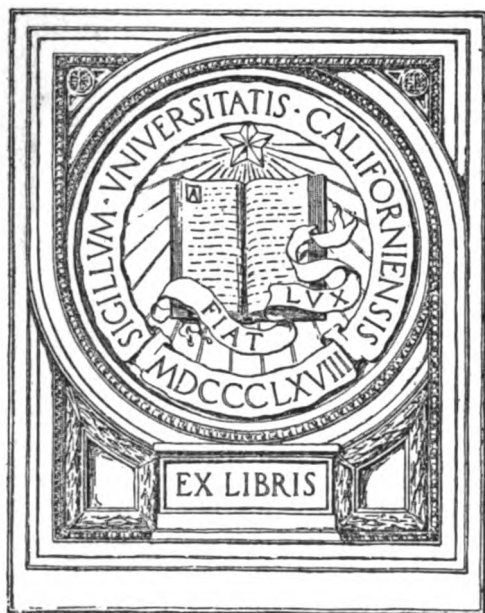
Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter <http://books.google.com> durchsuchen.

UC-NRLF



B 2 901 946



EX LIBRIS

PUBLIC
HEALTH
LIBRARY

ARCHIV FÜR HYGIENE.

UNIV. OF
CALIFORNIA

(BEGRÜNDET VON **MAX v. PETTENKOFER.**)

UNTER MITWIRKUNG

VON

Prof. Dr. O. BOLLINGER, München; Prof. Dr. BONHOFF, Marburg a. L.; Prof. Dr. R. EMMERICH, München;
Prof. Dr. F. ERISMANN, Zürich; Prof. Dr. HEIM, Erlangen; Prof. Dr. A. HILGER, München; Prof. Dr.
F. HUEPPE, Prag; Prof. Dr. KABRHEL, Prag; Prof. Dr. F. KRATSCHEMER, Wien; Prof. Dr. K. LEHMANN,
Würzburg; Prof. Dr. LÖDE, Innsbruck; Prof. Dr. L. PFEIFFER, Rostock; Generalarzt Dr. J. PORT,
Würzburg; Prof. Dr. W. PRAUSNITZ, Graz; Prof. Dr. F. RENK, Dresden; Prof. Dr. SCHOTTELIUS,
Freiburg i. B.; Generaloberarzt Dr. A. SCHUSTER, München; Prof. Dr. WERNICKE, Posen.

HERAUSGEGEBEN

VON

J. FORSTER, M. GRUBER, FR. HOFMANN, M. RUBNER,

O. O. PROFESSOREN DER HYGIENE UND DIRECTOREN DER HYGIENISCHEN INSTITUTE AN DEN UNIVERSITÄTEN ZU

STRASSBURG

WIEN

LEIPZIG

BERLIN.

ZWEIUNDVIERZIGSTER BAND.

MÜNCHEN UND BERLIN.

DRUCK UND VERLAG VON R. OLDENBOURG.

1902.

70 3441
A15
v. 42

RA421
A15
v. 42
~~BIOLOGY~~
~~LIBRARY~~
PUBLIC
HEALTH
LIBRARY

Inhalt.

	Seite
Über das Vorkommen gemischter Fettsäure-Glyceride im tierischen Fette. Von Willy Hansen aus Rostock. (Aus dem hygienischen Institut der Universität zu Rostock)	1
Beiträge zur Kenntnis der quantitativen Zersetzung des Milchzuckers durch den Bacillus acidi lactici. Von Dr. Paul Haacke aus Schwerin (Meckl). (Aus dem hygienischen Institut der Universität Rostock)	16
Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. II. Von Dr. Max Schottelius, Professor der Hygiene. (Aus dem hygienischen Institut der Universität Freiburg i. B.)	48
Über die Konstanz der Sporenkeimung bei den Bacillen und ihre Verwendung als Merkmal zur Artunterscheidung. Von Dr. Georg Caspari, Zahnarzt aus Rummelsburg in Pommern. (Aus dem hygienischen Institut in Würzburg.) (Mit Tafel I)	71
Studien über die Absterbebedingungen der Sporen einiger Aspergillusarten. Von Professor A. Lode. (Aus dem hygienischen Institute der k. k. Universität in Innsbruck)	107
Über die Verunreinigung des städtischen Hafens und des Flusses Akerselven durch die Abwässer der Stadt Christiania. Von Dr. Axel Holst, o. ö. Professor, Dr. Magnus Geirsvold, Assistent am hygienischen Institute und Sigvol Schmidt-Nielsen, Chem.-Ingenieur. (Aus dem hygienischen Institute der Universität Christiania). (Mit Tafel II—IV)	153
Über Buttersäuregärung. (II. Abhandlung.) Von Dr. R. Grafsberger und Dr. A. Schattenfroh. A. Zur Morphologie des beweglichen Buttersäurebacillus. Von Dr. R. Grafsberger, Assistent am Institute. (Aus dem hygienischen Institute der Universität Wien.) (Mit Tafel V—VIII)	219
B. Biologisches Verhalten und Verbreitung des beweglichen Buttersäurebacillus. Von Dr. A. Schattenfroh, Assistent am Institute	251

	Seite
Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen. Von Oberarzt Dr. Jürgens. (Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin)	265
Theoretische Betrachtungen über Ansteckung und Disposition. Von Otto Ammon	289
Versuche über Typhusagglutinine und Präcipitine. Von Privatdozent Dr. Oskar Bail, Assistenten des Institutes. (Aus dem hygieni- schen Institute der deutschen Universität in Prag Vorstand: Prof. F. Hueppe)	307

Über das Vorkommen gemischter Fettsäure-Glyceride im tierischen Fette.

Von

Willy Hansen

aus Rostock.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität zu Rostock.)

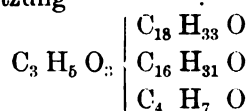
I.

Seit der Untersuchung von Chevreul über die tierischen Fette betrachtet man ganz allgemein dieselben als Mischungen der Triglyceride derjenigen Fettsäuren, welche bisher im Körper der Tiere, bezw. in der von den letzteren abgesonderten Milch gefunden wurden, im wesentlichen: Butter-, Capron-, Capryl-, Caprin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure.

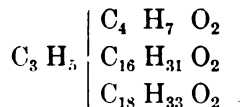
In allen Lehrbüchern, aber auch in den ausführlichsten Handbüchern der reinen und angewandten Chemie wird demzufolge angegeben, daß die tierischen Fette aus den Triglyceriden der genannten Fettsäuren, hauptsächlich aber aus Tripalmitin, Tristearin und Triolein in wechselnden Mischungsverhältnissen bestehen. In den festen Fetten (Talgen) sollen hauptsächlich das Tristearin und Tripalmitin, in den weicheren (Schmalzen, Butter) das Tripalmitin und Triolein vorherrschen.

Ob jemals angenommen wurde, daß die Fettsäuren auch als gemischte Glyceride oder doch wenigstens solche neben den einfachen Glyceriden im tierischen Fette vorhanden seien, habe ich nicht in Erfahrung bringen können. Angaben über das Vorkommen gemischter Fettsäure-Glyceride im Tierfette und über die Darstellung solcher aus demselben habe ich in der Litteratur

nicht finden können, ausser der einzigen in »Benedict, Analyse der Fette und Wachsarten¹⁾«, welcher Autor schrieb²⁾: »Doch scheint es auch Fette zu geben, in welchen sich gemischte Ester des Glycerins vorfinden, wie dies Bell namentlich für die Butter wahrscheinlich gemacht hat, in welcher er ein Oleopalmitobutyrat von der Zusammensetzung



annimmt, und weiter³⁾: »Nach Bell enthält die Butter wahrscheinlich gemischte Ester des Glycerins, was schon deshalb wahrscheinlich ist, weil Triacetin⁴⁾ in Wasser löslich ist. Extrahiert man Butterfett mit heißem Alkohol, so geht ein Fett (2—3 % vom Gewicht der Butter) in Lösung, welches bei 15,5° C. schmilzt und 13—14 % lösliche neben 79—80 % unlöslichen Fettsäuren enthält. Mischt man der Butter hingegen Tributyrin zu, so läßt sich dasselbe vollständig mit Alkohol extrahieren. Der niedrige Schmelzpunkt des extrahierten Fettes rührt nicht von einem höheren Ölsäuregehalt her, indem die Fettsäuren desselben höher als die Butterfettsäuren schmelzen. Daher ist wahrscheinlich ein Oleopalmitobutyrat vorhanden. In Übereinstimmung damit haben Blyth und Robertson⁵⁾ aus der Butter ein krystallinisches Glycerid von der Formel



abgeschieden.«

Rein spekulativ hätte man vielleicht darauf kommen müssen, daß wahrscheinlich alle Fette mehr oder weniger aus gemischten Glyceriden bestehen. Denn man kann doch kaum annehmen, daß bei der Bildung von Neutralfetten, sei es aus Eiweiß, sei es aus Kohlehydraten, immer nur gerade soviel der einzelnen

1) III. Auflage, herausgegeben von Ferd. Ulzer. Berlin, 1897. Springer.

2) a. a. O., S. 43.

3) a. a. O., S. 544 u. 545.

4) Soll wohl heißen: Tributyrin.

5) Vergl. Chemiker-Zeitung, 1889, 13, S. 128.

Fettsäuren und des Glycerins entsteht, als notwendig ist, normale einfache Glyceride zu bilden.

Wenn trotzdem immer als bewiesen angesehen wurde, daß nur einfache Triglyceride in den tierischen Fetten¹⁾ vorkommen, so liegt der Grund hierfür hauptsächlich wohl darin, daß durch die Untersuchungen Berthelots²⁾ über die Fette dargethan worden war, daß einfache Triglyceride synthetisch darstellbar sind, und daß dieselben Eigenschaften besitzen, welche mit denjenigen der aus tierischen und pflanzlichen Fetten isolierten Triglyceride, bezw. der Körper, welche man für einfache Triglyceride ansah, übereinstimmen.

Allerdings gab es Beobachtungen, die den Verdacht erwecken konnten, daß bezüglich des Vorkommens nur von einfachen Triglyceriden in Neutralfetten unser Wissen noch lückenhaft sei. Zunächst die Beobachtung von Heintz, daß reines Tristearin aus tierischen Fetten nicht zu gewinnen war.

Heintz³⁾ schrieb wörtlich: »Als ich meine Arbeiten über die tierischen Fette begann, hatte ich gehofft, durch Umkrystallisieren derselben aus der ätherischen Lösung endlich chemisch reine Fette abzuschneiden, wie man nach Lecanu aus dem Hammelfett nach dieser Methode reines Stearin erhalten sollte. Allein diese Hoffnung mußte ich bald aufgeben, ich mußte mich sogar überzeugen, daß das nach Lecanus Methode gewonnene Stearin immer noch nicht rein ist. Denn wenn es verseift wird, so liefert es nach Zersetzung der entstandenen Seife durch Kochen mit verdünnter Salzsäure eine Säure, deren Schmelzpunkt weit unter dem der Stearinsäure liegt. Später hat auch Patric Duffy nachgewiesen, daß das nach Lecanus Methode gewonnene Stearin, dessen Schmelzpunkt um 62° liegt, durch sehr oft wiederholtes Umkrystallisieren aus sehr viel Äther in einen Stoff von viel höherem Schmelzpunkt übergeführt werden kann. Das bei 62° C. schmelzende Stearin liefert bei der Verseifung

1) In einigen Pflanzenfetten hat man bekanntlich auch Diglyceride nachgewiesen.

2) Journal de Pharmac. T. XXIV.

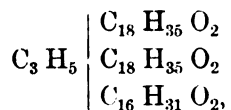
3) Heintz, Über die Fette. Journal f. prakt. Chemie, 1855, Bd III, S. 49.

4 Über d. Vorkommen gemischter Fettsäure-Glyceride im tierischen Fette.

eine Säure, deren Schmelzpunkt bei 64° liegt. Ebenso wenig gelang es mir, aus dem Menschenfett ein reines Fett zu erhalten.«

Der von Heintz genannte Patric Duffy¹⁾ hat das Stearin genau untersucht. Erhalten hat er es, wie schon erwähnt, durch wiederholtes Umkrystallisieren von Hammeltalg aus Äther in der Weise, daß bei den ersten 5—6 Krystallisationen das 10—15fache, bei den folgenden das hundertfache Quantum des Äthers angewandt wurde. Nach fünfmaligem Umkrystallisieren zeigte das Produkt den Schmelzpunkt 61,3°, nach 17maligem den von 63°, nach 32maligem denjenigen von 64°. Die Ausbeute betrug schliesslich pro Kilogramm Hammeltalg 2 g Stearin (Tristearin).

Bei seinen Versuchen über die Resorption verschiedener Fette aus dem Darmkanale hat L. Arnschink²⁾ sich eines Tristearins bedient, das durch Umkrystallisieren aus Hammeltalg erhalten war und dessen Schmelzpunkt er zu 59,7° C. gefunden hatte. Dasselbe bestand zu 94,96% aus Fettsäuren und 5,04% aus Glycerin (vergl. die Fußnote a. a. O. S. 437). Nun ergibt aber die einfache Rechnung, daß Tristearin 95,73% Stearinsäure enthält. Eine Verbindung von der Formel



Distearopalmitin, würde immer noch 95,59% Fettsäuren enthalten. Daher ist ohne weiteres klar, daß Arnschink kein reines Tristearin unter den Händen gehabt hat; sein Tristearin war entweder ein gemischtes Triglycerid oder ein Gemisch von Tristearin und Tripalmitin. Also auch ihm ist es nicht geglückt, durch Umkrystallisieren tierischen Fettes reines Tristearin zu gewinnen.

Eine weitere, höchst auffällige Erscheinung ist die, daß viele Beobachter den Schmelzpunkt des anscheinend reinen Tristearins aus Tierfett verschieden angegeben haben. Arnschink hat denselben zu 59,7° angegeben und bemerkt in der Fußnote³⁾:

- 1) Quart. Journ. of the Chem. Soc. Vol. V, p. 197.
- 2) Zeitschrift f. Biologie, 1890, Bd. 26, S. 437.
- 3) a. a. O., S. 437.

»Gewöhnlich wird als Schmelzpunkt des Stearins 63° angegeben.« Patric Duffy gab ihn zu 64° an.¹⁾ Aber ganz besonders auffällig ist die von Heintz²⁾ bestätigte Angabe Patric Duffys, daß das Tristearin zwei Schmelzpunkte besitzt, nämlich bei 55° C. und 71° C. Über diese höchst merkwürdige Beobachtung äußerte sich Heintz folgendermaßen:

»Bei der Untersuchung des bei 62° C. schmelzenden Stearins beobachtete ich eine Erscheinung, die bis dahin nicht bekannt war. Wenn man es nämlich in ein Kapillarrohr einschließt, so wird es schon bei 51° bis 52° vollkommen durchsichtig, trübt sich aber wieder bei Steigung der Temperatur und wird endlich nochmals durchsichtig. Ich glaubte damals, das erste Durchsichtigwerden sei mit keinem wahren Schmelzen verbunden, weil, wenn man ein dünnes Blättchen des Stearins in Wasser taucht, dessen Temperatur einige und 50° C. beträgt, zwar ein Durchsichtigwerden beobachtet wird, aber die Masse nicht in einen Tropfen zusammenfließt. Später hat Patric Duffy diese Erscheinung ebenfalls beobachtet und zugleich behauptet, daß bei der Temperatur von einigen 50 Graden doch eine wahre Schmelzung des Stearins stattfindet. Ich habe mich neuerdings davon überzeugt, daß dieses in der That richtig ist, und daß ein Stearinblättchen, wenn es nur hinreichend dünn ist, wirklich in Wasser von 52° C. flüssig wird. P. Duffy erklärt diese Erscheinung für die Folge der Bildung verschiedener isomerer Modifikationen des Stearins. Allein, da man bis dahin noch nicht chemisch reines Stearin dargestellt hatte, so konnte sie auch eben durch die Gemischtheit veranlaßt sein, und es entsteht daher gerecht die Frage, ob auch chemisch reines Stearin diese Erscheinung zeigt.

Da man aus tierischen Fetten das Stearin nicht in reinem Zustande gewinnen kann, so benutzte ich die Methode von Berthelot, es aus der reinen Stearinsäure und Glycerin wieder zusammensetzen. Ich erhielt in der That ein Stearin, das bei seiner Verseifung in Glycerin und vollkommen reine Stearinsäure zerfiel, und es gelang mir nun nachzuweisen, daß auch dieses

1) a. a. O.

2) a. a. O., S. 50.

chemisch reine Stearin zwei Schmelzpunkte besitzt, wovon der eine bei 55° C., der andere bei $71,6^{\circ}$ C. liegt. Es ist daher auch die Ansicht von P. Duffy als richtig zu betrachten, daß nämlich das Stearin durch eine bestimmte Temperatur in eine andere isomere Modifikation übergehe, die sich durch einen höheren Schmelzpunkt ($71,6^{\circ}$) auszeichnet und die entsteht, wenn das Stearin längere Zeit, bis etwa 60° C., erhitzt wird. Diese Modifikation geht aber durch Erhitzung über $71,6^{\circ}$ C. in die bei 55° C. schmelzende über.*

Welche Modifikationen mit so verschiedenen Schmelzpunkten entstehen sollten, ist jedoch nicht dargelegt, ist auch schwer zu erklären, da das Tristearin ein normaler Ester ist und bei der Verseifung in Glycerin und dieselbe Stearinsäure zerfällt, welche zur Darstellung desselben gedient hat.

Die Merkwürdigkeit, daß ein scheinbar chemisch reiner Körper, wie das Tristearin, zwei Schmelzpunkte besitzt, war mit der Annahme der Bildung verschiedener Modifikationen ganz sicher auch nicht erklärt; aber man konnte sie nunmehr wenigstens ganz beruhigt im Buche der Wissenschaft buchen.

Herr Professor Dr. Pfeiffer hat mir gesprächsweise seine Bedenken hinsichtlich der Berechtigung dieser Annahme von Duffy-Heintz mitgeteilt und gemeint, daß die Erscheinung eines doppelten Schmelzpunktes des Tristearins — und auch des Tripalmitins¹⁾ — sich wohl noch anders deuten lasse als durch die Hypothese von der Bildung verschiedener Modifikationen, nämlich durch die Umbildung gemischter Triglyceride in Mischungen einfacher normaler Glyceride. Er hat mich dadurch veranlaßt, zu untersuchen, ob in den tierischen Fetten überhaupt einfache normale Glyceride oder gemischte vorkommen.

Das Ergebnis der Untersuchung, die unter Leitung des Herrn Professors Dr. Pfeiffer im Hygienischen Institut zu Rostock ausgeführt wurde, teile ich in nachstehendem mit. Es bestätigt die Richtigkeit der Bedenken und thut das Vorkommen von gemischten Triglyceriden im Tierfett, wenigstens für Hammel- und Rindertalg, dar.

1) Vergl. später S. 14.

II.

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung reinen Tristearins benutzte ich teils Hammel-, teils Rindertalg, welche zunächst durch Auspressen mit einer gewöhnlichen Fruchtpresse unter Beobachtung der von Soxhlet für die Herstellung von Fleischsaft angegebenen Regeln — dünne Prefskuchen, und Zwischenlagerung von Drahtnetzen zwischen die einzelnen Prefsportionen — von der Hauptmasse der bei gewöhnlicher Temperatur flüssigen Glyceride befreit wurden. Dieses Auspressen geht recht gut von statten, wenn man zuerst die Presse sehr langsam anzieht, andernfalls preßt man den Talg in feinen Schnüren durch die Poren der Prefstücher hindurch. Die ausgeprefsten flüssigen Glyceride erstarrten bei geringer Temperaturerniedrigung zu einer butterartigen Masse, der Prefsrückstand — fest und weiß — wurde in Form dünner, harter Scheiben erhalten, die bei 51° C. schmolzen, während der ursprüngliche Hammeltalg bei 48° C., der Rindertalg bei 42° C. schmolz.¹⁾

Der in Stücke zerbrochene Prefsrückstand wurde alsdann mit 95% Alkohol gekocht, die erkaltete alkoholische Lösung, aus der große Mengen Fett sich krystallinisch abgeschieden hatten, abfiltriert und der Destillation unterworfen. Ich erhielt aus derselben noch große Quantitäten leicht schmelzbaren Fettes. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Verfahrens blieben im erkalteten Alkohol nur noch geringe Portionen Fett gelöst. Der krystallinische Filtrerrückstand besaß einen Schmelzpunkt von $51,5^{\circ}$ C. Durch öfter wiederholtes Umkrystallisieren desselben aus siedendem Alkohol gelang es nicht, ein höher schmelzendes Fett zu isolieren. Leicht gelang das hingegen bei Verwendung

1) Die Schmelzpunktbestimmung wurde in einem möglichst engen Kapillarrohr vorgenommen, das an das Quecksilbergefaß des Thermometers angebunden wurde. Das Thermometer mit der Kapillare tauchte entweder in Wasser oder Schwefelsäure, die in einem weiten Reagenzglas verwahrt wurden. Letzteres tauchte in ein mit viel Wasser gefülltes Becherglas oder Rundkölbchen ein.

von Äther in größerer Menge als Lösungsmittel, namentlich wenn die auskrystallisierten Fette durch Absaugen auf einer Filterplatte rasch vom Äther befreit wurden. Bei der ersten Ätherkrystallisation erhielt ich eine schuppige Krystallmasse vom Schmelzpunkt 55° C. Das in Äther gelöst verbliebene und daraus durch Verdampfen des Äthers erhaltliche Fett war vom Schmelzpunkt 32° C. Das bei 55° schmelzende Fett, nach Leffmann-Bean verseift, lieferte nach Zerlegung der Seife mit verdünnter Salzsäure Fettsäuren, welche bei 54° C., nach Umkrystallisieren aus Alkohol bei $63,5^{\circ}$ C. schmolzen, also ein Gemisch verschiedener, jedenfalls mindestens zweier Fettsäuren waren. Wiederholtes Umkrystallisieren des bei 55° schmelzenden Fettes aus Äther brachte zunächst kein höher schmelzendes Produkt. Wurde das Fett aber aus viel Äther bei Zimmertemperatur umkrystallisiert, so resultierte anfangs ein Fett vom Schmelzpunkt $58,5^{\circ}$ C. (der Äther enthielt ein solches vom Schmelzpunkt 42°) und schliesslich ein solches vom Schmelzpunkt $62,5^{\circ}$ (Schmelzpunkt des in Äther gelösten Teiles 52°), das bei noch so häufigem Umkrystallisieren immer wieder diesen Schmelzpunkt $62,5^{\circ}$ C. zeigte. Nunmehr zeigte auch der in Äther gelöste Anteil konstant diesen Schmelzpunkt, offenbar lag ein einheitlicher Körper, nicht mehr ein Gemisch von Triglyceriden, vor. Eine Probe des in schönen glänzenden Blättchen krystallisierenden Fettkörpers besaß die Verseifungszahl (Köttstorfer) 195,65.¹⁾ Reines Tristearin hat als Verseifungszahl 188,8. Sonach kann mein bei $62,5^{\circ}$ C. schmelzender Fettkörper kein reines Tristearin gewesen sein. Nahm man an, daß er ein gemischter Glycerinester der Palmitin- und Stearinsäure war, so konnte er entweder 1 Molekül Palmitinsäure auf 2 Moleküle Stearinsäure oder 2 Moleküle Palmitinsäure auf 1 Molekül Stearinsäure enthalten, entweder ein Distearopalmitin oder ein Dipalmitostearin sein. Ersteres erfordert eine Verseifungszahl von 194,9, letzteres eine solche von 201,4.

1) 0,222 g verbrauchten bei der Verseifung 1,55 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 43,4 mg KOH; 0,4275 g 2,99 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 83,72 mg KOH. Die Verseifungszahl ist demnach 195,5 und 195,8, im Mittel 195,65.

Stellt man diese Zahlen in einer Reihe zusammen, so sieht man sofort, daß mein Fettkörper nur ein Distearopalmitin sein konnte. Denn es beträgt die Verseifungszahl für

Tristearin	Distearopalmitin	Dipalmitostearin
188,8	194,9	201,4

das von mir hergestellte Präparat

195,65.

Ölsäure enthielt das Präparat nicht, wie die (v. Hüblsche) Jodadditionsbestimmung ergab. Würde es ein Gemisch von Tristearin und Tripalmitin gewesen sein, so müßte sich beim Umkrystallisieren aus Äther das Mischungsverhältnis haben ändern lassen, was, wie oben mitgeteilt, aber nicht der Fall war.

Die aus dem Präparat isolierten Fettsäuren schmolzen bei 64°. Dieser Schmelzpunkt ist nach Heintz¹⁾ möglich für ein Gemisch von Palmitinsäure und Stearinsäure im Verhältnis von 70—80 Teilen letzterer und 20—30 Teilen ersterer. Distearopalmitin enthält die beiden Fettsäuren gemischt im Verhältnis von 67,7 Teilen Stearinsäure auf 32,3 Teile Palmitinsäure; also auch der Schmelzpunkt der Fettsäuren von 64° paßt gut auf ein Distearopalmitin.

Auch aus dem Rindstalg gelang es neben den noch zu beschreibenden Körpern dieses Distearopalmitin herzustellen, nicht aber Tristearin. Ich glaube daher, daß im Hammel- und Rindertalg, oder — um mich vorsichtiger auszudrücken — in den von mir untersuchten Proben Tristearin nicht vorhanden war.

Ich sage: »von mir untersuchten Proben Tristearin nicht vorhanden war,« denn es könnte recht wohl gelegentlich auch Tristearin im Hammeltalg gefunden werden, namentlich wenn andere Methoden der Darstellung des Tristearins, z. B. ein anderes Lösungsmittel statt Alkohol und Äther, zur Anwendung kommen würden oder aber der Talg vorher stark erwärmt würde. Ich habe nämlich folgende Beobachtung gemacht: Als das bei 62,5° C. schmelzende, nunmehr als Distearopalmitin bezeichnete Fett aus Äther ohne Veränderung nicht mehr umzukrystallisieren war, versuchte

1) Vergl. a. a. O., S. 12, Tabelle.

ich auf Rat von Prof. Pfeiffer nacheinander aus Chloroform, Benzol und schliesslich aus Amylalkohol, jeweils bei Siedehitze, umzukrystallisieren. Die Krystallisationen aus Benzol und Chloroform schmolzen wieder bei $62,5^{\circ}$ C., die aus Amylalkohol aber bei $66,8^{\circ}$. Dieser letztere Schmelzpunkt blieb nun konstant bei jeder wiederholten Krystallisation aus Amylalkohol. Von dem anhängenden Amylalkohol durch Waschen mit Alkohol und Äther befreit, bildete das so erhaltene Fett prachtvoll glänzende Schuppen, ähnlich denen der reinen Stearinsäure, die daraus durch Verseifung des Fettes und Zerlegung der Seife auch sofort in vollkommener Reinheit (Schmelzpunkt $69,2^{\circ}$) gewonnen wurde. Die Verseifungszahl des Fettes war $191,0^1$). Reines Tristearin erfordert die Verseifungszahl 188,8. Die Übereinstimmung beider Werte ist genügend groß und ich halte mich daher für berechtigt, das beschriebene Fett für wirklich reines Tristearin anzusprechen. Dieses Tristearin kann aber offenbar nur so entstanden gedacht werden, daß sich bei der Siedehitze des Amylalkohols (138°) das Distearopalmitin umgelagert hat in Tristearin und Tripalmitin. Selbstverständlich könnte eine solche Umlagerung auch vor sich gehen bei stärkerer Erhitzung des Distearopalmitins für sich ohne Lösungsmittel und damit würde die Beobachtung eines doppelten Schmelzpunktes von Duffy-Heintz eine sehr einfache Erklärung finden. Zuerst würde das Distearopalmitin (oder vielleicht ein Dipalmitostearin) als solches schmelzen, dann sich umlagern unter Bildung des schwerer schmelzbaren Tristearins, das bei dieser Temperatur (55°) noch auskrystallisieren könnte, um neuerdings bei höherer Temperatur ($71,6^{\circ}$) wieder zu schmelzen. Die höhere Schmelztemperatur von Duffy-Heintz kann sehr wohl die Endtemperatur des Schmelzens sein, die man bei Fettgemischen immer höher findet als die Anfangstemperatur.

Diese Erklärung involviert allerdings einen Zweifel an der Behauptung dieser Autoren, daß sie reines Tristearin in Händen gehabt haben.

1) 0,9589 g verbrauchten bei der Verseifung 6,53 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 182,84 mg KOH; 0,9588 g 6,56 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-KOH = 183,68 mg KOH. Die Verseifungszahl ist demnach 190,6 und 191,5, im Mittel 191,0.

Aber diesen Zweifel lassen auch die Analysenangaben von Heintz selbst zu. Er fand 100 Teile seines synthetischen Tristearins aus 95,50 Teilen Stearinsäure bestehend, während es nach der Berechnung aus 95,73 Teilen Stearinsäure bestehen sollte.¹⁾ Der Gehalt des Distearopalmitins mit 95,59 Teilen Stearinsäure in 100 Teilen kommt an den von Heintz für sein reines Tristearin ermittelten (95,50) jedenfalls noch näher heran als an den für das reine Tristearin berechneten.

An meinem reinen Tristearin konnte ich nie einen doppelten Schmelzpunkt beobachten. Versuche, solches auf anderem als dem von Berthelot empfohlenen Wege synthetisch darzustellen, mißlangen und leider war die Menge des gewonnenen Distearopalmitins schließlicly auch so zusammengeschmolzen, daß ich darauf verzichten mußte, die Frage der Richtigkeit des doppelten Schmelzpunktes des Tristearins endgültig zu lösen. Dieselbe wird jedoch nach Mitteilung des Herrn Professors Dr. Pfeiffer jetzt im Hygienischen Institut zu lösen versucht.

Nachdem mir gelungen war, ein erstes gemischtes Glycerid der Stearin- und Palmitinsäure darzustellen, wuchs natürlich meine Hoffnung, noch mehrere derselben zu gewinnen und in der That gelang es mir nach einander ein Dipalmitostearin, ein Dipalmitolein und ein Stearopalmitolein nebst reinem Tripalmitin zu isolieren. Verwendet wurden hierzu die Anteile des Hammeltalgs, welche bei der Reinigung des Distearopalmitins jeweils in Äther gelöst geblieben waren und welche, nunmehr wieder vereinigt, so lange wieder aus Äther umkrystallisiert wurden, bis Körper mit konstantem Schmelzpunkt resultierten, bei deren Umkrystallisation aus Äther der im Äther zurückbleibende Anteil den gleichen Schmelzpunkt wie die krystallinische Ausscheidung aufwies.

Das Dipalmitostearin, ebenfalls in seidenglänzenden Schüppchen krystallisierend, schmolz bei 55°. Es besaß die Verseifungszahl 200,2²⁾ und addierte zum Beweis der Abwesenheit von

1) Vergl. a. a. O., S. 51.

2) 0,2108 g verbrauchten zur Verseifung 1,51 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 42,28 mg KOH; 0,2872 g verbrauchten 2,05 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 57,40 mg KOH. Die Verseifungszahl ist hiernach 200,6 und 199,9, im Mittel 200,2 g.

Ölsäure kein Jod. Theoretisch berechnet sich die Verseifungszahl des Dipalmitostearins zu 201,4. Die Übereinstimmung des berechneten und gefundenen Wertes ist eine genügend gute.

Zur Darstellung der niedriger schmelzenden, ölsäurehaltigen gemischten Glyceride wurden, um zu verhüten, daß beim Ausschmelzen der tierischen Fettgewebe, hauptsächlich Rinderfett, Umlagerungen stattfänden, zuerst ätherische Extrakte der Fette aus dem lufttrockenen Fettgewebe dargestellt, aus denen dann nach Entfernung der schwerer schmelzenden Anteile durch Krystallisieren bei Zimmertemperatur die leichter löslichen und schmelzbaren ölsäurehaltigen Glyceride bei starker Abkühlung auskrystallisierten. Sie wurden sehr bald mit konstantem Schmelzpunkt erhalten. Es waren ihrer zwei, ein Dipalmitoolein und ein Stearopalmitoolein. Ersteres nicht mehr so schön krystallisierend zu erhalten wie das Distearopalmitin und Dipalmitostearin, schmolz bei 48°, besaß eine Verseifungszahl¹⁾ von 202,7 und addierte 30,18% Jod²⁾, entsprechend einem Ölsäure-Gehalt von 33,5%. Der Vergleich der gefundenen und für Dipalmitoolein berechneten Werte ergibt gute Übereinstimmung.

	berechnet	gefunden
Verseifungszahl . . .	201,9	202,7
Jodaddition in % . . .	30,53	30,18
Ölsäuregehalt in % . . .	33,89	33,50.

. Das fast talgartige Stearopalmitoolein schmolz bereits bei 42°, addierte 29,31% Jod³⁾ und zeigte eine Verseifungszahl von 195,0⁴⁾.

1) 0,1558 g verbrauchten zur Verseifung 1,13 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 31,64 mg KOH, 0,2228 g verbrauchten 1,61 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 45,08 mg KOH. Die Verseifungszahl ist demnach 203,1 und 202,3, im Mittel 202,7 g.

2) 0,5994 g addierten 182,4 mg Jod = 30,43%, 0,5203 g addierten 155,8 mg Jod = 29,94%. Mittel: 30,18%.

3) 0,5722 g und 0,5703 g addierten je 168,74 mg Jod = 29,14 und 29,59, im Mittel 29,31%.

4) 0,2545 g verbrauchten zur Verseifung 1,78 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 49,84 mg KOH; 0,2302 g verbrauchten 1,61 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 45,08 mg KOH. Die Verseifungszahl ist hiernach 194,3 und 195,8, im Mittel 195,0.

Nachstehend die Gegenüberstellung der gefundenen und für Stearopalmitoolein berechneten Werte:

	berechnet	gefunden
Verseifungszahl . . .	195,3	195,0
Jodaddition in % . . .	29,53	29,31
Ölsäuregehalt in % . .	32,78	32,53.

Interessant ist, daß das Dipalmitoolein einen höheren Schmelzpunkt (48°) besitzt als das Stearopalmitoolein (42°). Es erinnert dies an die von Heintz¹⁾ ermittelte Thatsache, daß Gemische von Fettsäuren stets niedrigere Schmelzpunkte besitzen als ihre Komponenten. Vermutlich gilt diese Eigentümlichkeit auch für Mischungen von Triglyceriden und für gemischte Triglyceride.

Ich wende mich schliesslich noch zur Beschreibung eines ebenfalls durch Umkrystallisieren aus Tierfett erhaltenen reinen Tripalmitins. Ich erhielt dasselbe zuerst aus Palmöl, später aber auch aus Hammeltalg und Rindertalg, bin mir aber nicht sicher, ob dasselbe nicht erst durch Umlagerung aus einem oder zwei gemischten Triglyceriden entstanden ist. Bei dem vielfachen Umkrystallisieren aus Alkohol und Äther mit wiederholter Verjagung des Überschusses des Lösungsmittels auf dem Wasserbade kann es sehr wohl erst entstanden sein. Es krystallisierte in rundlichen Körnchen (in letzterer Form namentlich das aus Palmöl gewonnene), schmolz bei 52° und besafs eine Verseifungszahl²⁾ von 207,6; Jod addierte es nicht. Für reines Tripalmitin berechnet sich die Verseifungszahl zu 208,4.

Bei der Verseifung und Zerlegung der gebildeten Seife lieferte das Tripalmitin eine Säure, die bei 62° schmolz und auch beim Umkrystallisieren aus Alkohol diesen Schmelzpunkt behielt. In den Lehrbüchern³⁾ wird dem Tripalmitin ebenfalls ein doppelter

1) Vergl. a. a. O., S. 7 u. ff.

2) 0,2517 g verbrauchten zur Verseifung 1,87 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 52,36 KOH; 0,3406 g verbrauchten 2,52 ccm $\frac{1}{2}$ Normal-Kalilauge = 70,56 mg KOH. Die Verseifungszahl ist somit 208,0 und 207,2, im Mittel 207,6.

3) Vergl. Benedict, S. 44.

Schmelzpunkt zugesprochen, nämlich $50,5^{\circ}$ C. und $66,5^{\circ}$ C. Bezüglich dieses doppelten Schmelzpunktes des Tripalmitins gilt natürlich das Gleiche, was ich bezüglich desjenigen des Tristearins gesagt habe.

III.

Fasse ich das Ergebnis der obigen Untersuchungen zusammen, so kann ich wohl behaupten, daß es mir gelungen ist, den Nachweis zu erbringen, daß in tierischen Fetten gemischte Triglyceride vorkommen, daß es hingegen nicht wahrscheinlich erscheint, daß reines Tristearin in der Regel in denselben vorhanden ist, daß letzteres vielmehr, wo es aus tierischen Fetten gewonnen wird, ein Kunstprodukt ist, entstanden durch Umlagerung gemischter Triglyceride. Hinsichtlich des Vorkommens von reinem Tripalmitin muß ich die Entscheidung noch offen lassen.

Daß die von mir erörterten gemischten Triglyceride auch wirklich solche sind, ist durch die von mir mitgeteilten Verseifungs- bzw. Jodadditionszahlen wohl über allen Zweifel gestellt. Wären die beschriebenen Körper nur Mischungen gewesen, so müßte durch das immer wiederholte Umkrystallisieren aus den verschiedensten Lösungsmitteln und mit den verschiedensten Mengen derselben sicher eine Entmischung derselben möglich gewesen sein und hätte dann ihr Schmelzpunkt auch nicht konstant bleiben können.

Man könnte darüber im Zweifel sein, ob meine gemischten Triglyceride nicht erst recht Kunstprodukte seien. Wären sie das aber, so wäre meine Arbeit erst recht nicht überflüssig, indem sie darzuthun vermöchte, wie leicht die Neutralfette Umbildungen fähig seien. Man müßte dann aber auch für den lebenden Körper diese Fähigkeit der Umbildung zugeben.

Schließlich möchte ich das Resultat obiger Untersuchungen noch in einer Übersichtstabelle wiedergeben:

Tabelle der im tierischen Fette möglichen, von mir darin gefundenen bezw. aus denselben dargestellten Triglyceride der Stearin-, Palmitin- und Ölsäure.

	Formel	Molekular- gewicht	Schmelz- punkt	Verseifungszahl		Ölsäuregehalt	
				be- rechnet	ge- funden	be- rechnet	ge- funden
Tristearin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{35}O_2 \end{matrix}$	890	66,8°	188,8	191	—	—
Distearo- palmitin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \end{matrix}$	862	62,5°	194,9	195,6	—	—
Dipalmito- stearin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \end{matrix}$	834	55°	201,4	200,2	—	—
Tripalmitin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \end{matrix}$	806	52°	208,4	207,6	—	—
Distearo- olein	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \end{matrix}$	838	unbekannt	189,2	unbekannt	31,76	unbekannt
Dipalmito- olein	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \end{matrix}$	832	48°	201,9	202,7	33,89	33,50
Dioleo- stearin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \end{matrix}$	886	unbekannt	189,6	unbekannt	63,66	unbekannt
Dioleo- palmitin	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{33}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \end{matrix}$	858	unbekannt	195,8	unbekannt	65,73	unbekannt
Stearo- palmito- olein	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{35}O_2 \\ C_{16}H_{31}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \end{matrix}$	860	42°	195,3	195,0	32,78	32,53
Triolein	$C_3H_5 \begin{matrix} C_{18}H_{33}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \\ C_{18}H_{33}O_2 \end{matrix}$	884	unbekannt	190,0	unbekannt	95,70	unbekannt

Beiträge zur Kenntnis der quantitativen Zersetzung des Milchzuckers durch den *Bacillus acidi lactici*.

Von

Dr. Paul Haacke

aus Schwerin (Meckl.)

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Rostock.)

Nachdem durch die Untersuchungen von Burchard¹⁾ über den Ablauf und die Größe der durch den *Micrococcus ureae liquefaciens* bewirkten Harnstoffzersetzung dargethan ist, welche außerordentlichen Stoffzersetzen in der Bakterienzelle stattfinden können, erschien es wünschenswert, zu erfahren, welcher Kraftwechsel diesen Stoffzersetzen entspricht.

Ich habe es auf Veranlassung des Herrn Professors Pfeiffer unternehmen wollen, Versuche nach dieser Richtung hin auszuführen. Der *Micrococcus ureae liquefaciens* erschien für diese Versuche nicht recht geeignet; denn, wenn auch durch die Untersuchungen von Rubner die Verbrennungs- und Lösungswärme des Harnstoffs genau bekannt ist, so schienen doch die Werte für das bei der Spaltung des Harnstoffs entstehende Ammoniumkarbonat nicht genau genug ermittelt zu sein. Sie genau zu ermitteln, war mir bei dem Mangel eines Kalorimeters nicht möglich, ganz abgesehen davon, daß es durchaus nicht sicher feststeht, ob überhaupt bei der Zersetzung des Harnstoffs nur Ammoniumkarbonat und nicht auch Karbamat gebildet wird.

Hingegen erschien es verhältnismäßig leicht, die Frage nach dem Kraftwechsel in den Bakterienzellen durch Untersuchungen

1) Burchard, Archiv f. Hygiene, 1899, Bd. 36, S. 264.

über die Zersetzung des Milchzuckers durch Milchsäurebakterien zu lösen, da die in Betracht kommenden kalorischen Werte des Milchzuckers und der Milchsäure genau bekannt sind und angenommen werden durfte, daß im wesentlichen aus einem Molekül Milchzucker vier Moleküle Milchsäure gebildet werden.

Leider hat sich jedoch im Verlauf der Untersuchungen herausgestellt, daß der von mir zu den Versuchen benutzte Milchsäurebildner lange nicht so viel Säure aus dem Milchzucker abspaltete, als erwartet werden konnte. Ja, es erschien mir sogar aus einigen Versuchsergebnissen hervorzugehen, daß der betreffenden Mikroorganismus die gebildete Milchsäure weiter zerstörte, und ich mußte mich deshalb entschließen, auf die Lösung der oben erwähnten Frage zu verzichten, um so mehr, als sich ergab, daß neben Milchsäure ganz erhebliche Mengen von Kohlensäure, Essigsäure und Alkohol gebildet wurden, und eine genaue quantitative Bestimmung dieser Stoffwechselprodukte zu große Schwierigkeiten verursachte.

Ich habe mich daher darauf beschränkt, nur die quantitative Zersetzung des Milchzuckers zu verfolgen, hoffe aber durch meine Untersuchungen einen weiteren Beitrag zur Kenntnis der quantitativen Stoffzersetzung in der Bakterienzelle zu geben.

Was die bisherigen Kenntnisse über die Zersetzung des Milchzuckers, bezw. der Zuckerarten überhaupt, durch Milchsäurebakterien anlangt, so beziehen sich dieselben wesentlich auf die qualitative Feststellung der Bildung von Milchsäure allgemein und der verschiedenen stereoisomeren Formen derselben im einzelnen.

Als Erster hat jedenfalls Pasteur¹⁾ die Beobachtung gemacht, daß die Milchsäuregärung der Milch durch Mikroorganismen hervorgerufen wird. Seitdem ist es der fortschreitenden Wissenschaft im Laufe der Jahre gelungen, eine große Anzahl von Bakterien aufzufinden, die aus Milchzucker, Traubenzucker

1) Pasteur, *Annal. de Chimie et de Physique*, (3), 52. — *Compt. rend. de l'Académie des sciences*, 52.

und anderen Zuckerarten Milchsäure bilden. Hueppe¹⁾ bezeichnete den von ihm nachgewiesenen und genauer studierten *Bacillus acidi lactici* als den speziellen bzw. Haupt-Erreger der Milchsäuregärung. Lange Zeit hat diese Ansicht Hueppes ohne Widerspruch bestanden, bis später Milchsäurebakterien aufgefunden wurden, welche dem Hueppeschen *Bacillus* den Rang streitig machten. Aber nicht nur bei solchen echten Milchsäurebakterien, sondern auch bei den verschiedensten anderen Spaltpilzen wurde später die Eigenschaft entdeckt, neben anderen Stoffwechselprodukten Milchsäure zu produzieren.

Hieraus ging dann zunächst auch eine Einteilung der Milchsäurebakterien in spezifische und fakultative hervor, bis Weigmann²⁾ im Jahre 1899 eine neue Einteilung derselben nach dem Wachstum auf künstlichen Nährböden und dem physiologischen Verhalten (Produktion von Gasen etc.) gab. Sein Schüler Mac Donnell³⁾ untersuchte, nachdem schon von verschiedenen Seiten die Vermutung aufgestellt war, daß die verschiedenen als Milchsäurebakterien beschriebenen Bakterien nur Varietäten einiger weniger Arten seien⁴⁾, eingehend möglichst viele Milchsäurebakterien auf ihre nähere Verwandtschaft. Er kam zu dem Resultate, daß man nur zwei Bakterienarten als Ausgangsformen für die übrigen anzunehmen brauche. Er fand bei seinen Versuchen, daß die Stäbchenbakterien je nach der Kultur auf verschiedenen Nährböden in ihrer äußeren Gestalt stark variierten. Er nahm deshalb keinen Anstand, ovale Coccen in die Klasse des Bakteriums zu stellen, da eine strenge Scheidung oft sehr schwer sei.⁵⁾ Außerdem teilte er die Varietäten (Rassen) nach dem Geschmack ein, den sie beim Wachstum in der Milch derselben erteilten, eine Einteilung, die offenbar mehr den spezifischen, Molkereinteressen als denen der Wissenschaft dient. Jedenfalls scheint

1) Hüp pe, Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 2.

2) Weigmann, Versuch einer Einteilung der Milchsäurebakterien des Molkereigewerbes. Centralbl. f. Bakter. u. Parasitenkunde, 1899, II. Abteil., Bd. V, S. 861 u. ff.

3) Mac Donnell, Über Milchsäurebakterien. Dissertation, Kiel, 1899.

4) Vgl. Esten, XII., *Bacillus acidi lact.*, *Stons agricultur. Exp. Station.*

5) Vgl. Weigmann, (a. a. O.), S. 860; Mac Donnell, S. 30.

mir damit nicht bewiesen zu sein, daß es nicht noch mehr Arten von Milchsäurebakterien gibt, zumal von verschiedenen Forschern festgestellt worden ist, daß verschiedene Bakterienarten verschiedene Milchsäure bilden. Man müßte nach Mac Donnell schon an eine Pleomorphie der Milchsäurebakterien denken, die Flügge¹⁾ ganz entschieden leugnet.

Auf die Untersuchung der Art der gebildeten Milchsäure, auf welche seit Schardingers Entdeckung in neueren Arbeiten stets Rücksicht genommen ist, scheint Mac Donnell nicht eingegangen zu sein. Purdie und Walter²⁾ folgern ja allerdings aus der Thatsache, daß inaktive Milchsäure ein Gemisch von Rechts- und Linksmilchsäure ist, daß eine sonst inaktive Säure produzierender Bacillus unter gewissen Bedingungen nur eine Art Säure (dann optisch aktive) produzieren könne. Es ist dies eine Ansicht, die Kozai³⁾ durch seine Versuche zu erhärten sucht, der aber Günther und Thierfelder⁴⁾ sich nicht anschließen können.

Auf die Frage über die Bildung verschiedener Milchsäuren einzugehen, hat für den vorliegenden Zweck keine Bedeutung.

Eine Feststellung der Quantität der von Milchsäurebakterien gebildeten Milchsäure ist nur von Wenigen versucht worden. Aderhold⁵⁾ gibt an, daß bei seinen Versuchen *Bacterium coli* 0,241—0,576% Säure, *Bacterium Güntheri* 0,546—1,287% (auf Milchsäure berechnet) gebildet habe. Conrad⁶⁾ fand, daß durch sein *Bacterium brassicae acidae* pro 100 ccm Kulturflüssigkeit eine 4 ccm $\frac{1}{1}$ N-Natronlauge entsprechende Menge Säure gebildet wurde (= 0,36% Milchsäure). Aus seinen Angaben hebe ich nachstehende tabellarische Zusammenstellung über die Milchsäureproduktion des von ihm geprüften Milchsäurebildners (*Bact. brass. acid.*) hervor.

1) Vgl. Flügge, Die Mikroorganismen, 1896, Bd. II, S. 80.

2) Purdie und Walter, Chem. Centralblatt, 1892, II, S. 352.

3) Kozai, Zeitschrift f. Hygiene, 1899, Bd. 31, S. 337.

4) Günther und Thierfelder, Hygien. Rundschau, X, Heft 16.

5) Aderhold, Über Einsäuern von Früchten etc., Centralbl. f. Bakt. etc., II, Bd. V, S. 511.

6) Conrad, Sauerkrautgärung. Archiv f. Hygiene, Bd. 29, S. 72.

Zeit	Milchsäure	
	aërob bei 22°	aërob bei 37°
Nach 12 Stunden	0,045 g	0,090 g
Am 1. Tage	0,099 ,	0,216 ,
, 3. ,	0,225 ,	0,477 ,
, 6. ,	0,405 ,	0,585 ,
, 9. ,	0,522 ,	0,621 ,
, 12. ,	0,576 ,	0,639 ,
, 17. ,	0,630 ,	0,639 ,
, 22. ,	0,648 ,	0,639 ,

Lehmann und Neumann¹⁾ führen an, daß *Bacillus acidilactici* Hueppe in 5 Tagen in 100 ccm 2% Traubenzuckerbouillon eine 4,6 ccm Normalalkali entsprechende Menge Säure erzeugt. (= 0,41% Milchsäure).

Diese Angaben beziehen sich meist auf die Menge Säure, die am Ende einer bestimmten Versuchsperiode festgestellt wurde; selten ist die Zunahme der Säure (Conrad), nie die Abnahme des säureliefernden Zuckers, sowie die Zahl der hieran beteiligten Bakterien berücksichtigt worden.

Soweit die Angaben aus der mir zugänglich gewesenen Litteratur über die früheren Versuche zur Ermittlung der Milchsäureproduktion der Milchsäurebildner.

Zur Beschreibung meiner eigenen Versuche übergehend, gebe ich zunächst eine Schilderung der zu den Versuchen verwendeten Bakterienart.

Dieselbe wurde aus Rostocker Marktmilch, in der sie sich regelmäsig und, wie es scheint, vorherrschend findet, mit Hilfe einer durch Lackmus gefärbten Peptonmolkengelatine isoliert. Das Bakterium stellte ein Kurzstäbchen mit abgerundeten Enden dar. Seine Länge war je nach dem Kulturmedium bis 3 μ , seine Dicke 0,3—0,5 μ , Eigenbewegung fehlte ihm.

Auf Gelatineplatten bildete es anfangs kleine runde glattrandige Kolonien ohne Zeichnung, die sich allmählich gleich-

1) Lehmann und Neumann, Kurzes Lehrbuch der Bakteriologie, 1900, Bd. II.

mäßig vergrößerten und nach dreiwöchigem Wachstum über 1 mm im Durchmesser haltende Kugeln darstellten. Die oberflächlichen Kolonien bildeten allmählich ziemlich hohe Kegel. Die Farbe der Kolonien war weiß bis schwach gelblich, ihre Oberfläche saftig glänzend. In Strichkulturen bildete der Bacillus schmale, wellige, schleimige Rasen. Im Gelatinestich fand reichliches Wachstum längs des ganzen Impfstiches statt, an der Oberfläche bildete sich ein Nagelkopf. In Traubenzuckergelatine erfolgte gleiches Wachstum, jedoch unter lebhafter Gasbildung. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde niemals beobachtet.

Auf gewöhnlichem Peptonagar war das Wachstum ähnlich und ebenfalls sehr lebhaft, namentlich an der Oberfläche, die vom Rasen oft ganz überzogen wurde. Auf Zuckeragar wuchs der Bacillus unter reichlicher Gasentwicklung.

Kartoffel erwies sich als ein ganz besonders gutes Nährsubstrat. Hier war schon nach 6 Stunden bei 17,5° C. deutlich Wachstum zu unterscheiden. Die anfangs fast weißse Auflage nahm nach einiger Zeit bräunliche Farbe an und zeigte ein schleimiges, feuchtes Aussehen. Die Oberfläche der Kultur war oft durch Gasblasen kraterförmig zerrissen.

In Traubenzuckerbouillon erfolgte ebenfalls rasches Wachstum. Schon nach 6 Stunden war eine leichte Trübung bemerkbar; nach weiteren 6 Stunden fand sich ein reichlicher Bodensatz. Beim Umschütteln entwichen zahlreiche kleine Gasblasen.

In Milch fand nach drei Tagen bei 37° C. regelmäßige Coagulation statt unter Säuerung, Gasbildung und Abscheidung eines trüben Serums. Die Gasbildung war am lebhaftesten vor der Coagulation. Der Geschmack der Milch war schwach sauer, die Säuremenge betrug 0,46 ‰, auf Milchsäure berechnet (= 5,09 ccm $\frac{1}{1}$ N-Natronlauge). Die etwa durch das Casein gebundene Säuremenge ist hierbei nicht mit in Rechnung gebracht¹⁾. Die Milchsäure war inaktive Milchsäure.

1) Timpe (Archiv f. Hygiene, 18, 1) und Kabrhel (Zeitschrift f. Hygiene u. Infekt.-Krankh., 19, 392) haben gefunden, daß in Milch stets mehr Milchsäure nachzuweisen ist als in anderen Zuckerlösungen, da ein Teil der Milchsäure durch Casein chemisch gebunden wird.

Als besondere Eigentümlichkeiten des Stoffwechsels meines Milchsäurebacillus habe ich noch zu erwähnen: die Schwefelwasserstoffbildung in Bouillonkulturen bei 37°, sowie die Bildung von Essigsäure, Alkohol und Kohlensäure neben der Milchsäure. Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden.

Die Färbung des Bacillus ging sehr leicht, auch nach Gram, vor sich.

Aus vorliegenden Angaben über das morphologische und biologische Verhalten meines Milchsäurebacillus erhellt, daß der Bacillus mit dem *Bacillus acidi lactici* Hueppe identisch ist.¹⁾ Er unterscheidet sich von jenem allerdings durch Häutchenbildung in Bouillon, Fehlen der Indolbildung, sowie den Mangel an Sporen. Doch sind die ersteren Abweichungen nicht von solcher Bedeutung, um aus ihnen auf eine neue Art Milchsäurebacillen schließen zu können, und was die letztere Eigenschaft betrifft, so sind die Angaben über das Sporenbildungsvermögen des Hueppeschen Bacillus in der Litteratur so widersprechend, daß es höchst zweifelhaft ist, ob der Sporenbefund Hueppes zu Recht besteht.

Versuchsordnung.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: ein 500 ccm fassender, mit doppelt durchbohrtem Stopfen verschlossener Erlenmeyer-Kolben wurde mit einem langen, schräg abwärts gebogenen Ausflußrohr und einem kurzen, geraden, weiten Einfüllrohr montiert. Beide Röhren wurden mit Wattepfropfen verschlossen, sodann wurde der Kolben mit 200 ccm 1proz. Peptonmolke beschickt und zweimal je eine Stunde im Dampftopf bei 100° sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde der Kolbeninhalt mit einer möglichst frischen Bouillonkultur des *Bacillus acidi lactici* geimpft, die mittels einer Kapillare durch das Einfüllrohr eingebracht wurde. Nach kräftigem Umschütteln wurde eine Probe der Flüssigkeit von etwa 25 ccm

1) Weigmann (a. a. O.) schreibt dem *Bacillus acid. lact.* Hueppe Rechtsmilchsäure zu.

ausgeblasen, die Ausflußröhre sofort wieder sterilisiert und verschlossen. Der Kolben wurde im Brutschrank bei 37° C. gehalten, und in Intervallen von je drei Tagen je eine Probe in gleicher Weise ausgeblasen.

Von der Probe wurden sofort Verdünnungen in der gleich zu beschreibenden Weise angefertigt, und mit kleinen Mengen letzterer Gelatineplatten beschickt. Meist wurden drei Verdünnungen hergestellt, die Höhe der Verdünnung schwankte zwischen 0,05 und 1,0 ccm der Originalprobe bzw. der ersten Verdünnung auf je 100 ccm sterilen Wassers. Nach jeder Verdünnung wurde gründlich durchgeschüttelt, mit steriler Pipette die Aussaatprobe entnommen (0,05—1,0 ccm) und direkt in die Petrische Schale übergeführt, in der dann durch Hin- und Herbewegen die Mischung mit der verflüssigten Traubenzucker-Gelatine bewerkstelligt wurde.

Die Schalen blieben bei Zimmertemperatur (18—20°) so lange stehen, bis auch die kleinsten Kolonien gut zu erkennen waren. Dann wurden sie in der üblichen Weise ausgezählt. Die Auszählung wurde an mehreren Tagen wiederholt, um Gewähr zu erhalten, daß kleinere Kolonien anfangs nicht doch übersehen worden waren.

Bei Berechnung der Resultate der Zählung wurde auf die Dichte der Platten Rücksicht genommen. War etwa Platte I nicht zählbar, so dienten Platte II und III zur Ermittlung der Keimzahl. Andererseits wäre es ein Fehler gewesen, Platte III zu verwenden, wenn die ersten beiden brauchbar waren. Als Beispiel möge eine Zählung aus Versuch IX dienen. Aussaat je 1 ccm.

Verdünnung:

1,0 ccm Originalkultur	+ 100 ccm Wasser	=	I. Verdünnung.
1,0 » der I. Verdünnung	+ 100 » »	=	II. »
1,0 » » II. »	+ 100 » »	=	III. »

Platte I, gezählt 992 Kolonien:

1,0 ccm der I. Verdünnung	enthielt	992 Keime
folglich 101,0 » » I. »		} 100 192 » .
oder 1,0 » » Originalkultur		

Platte II, gezählt 10 Kolonien:

1,0 ccm der II. Verdünnung	enthielt	10 Keime
also 101,0	» » II.	» » } 1010 »
oder 1,0	» » I.	» » } 102 010 »
folglich 101,0	» » I.	» » } 102 010 »
oder 1,0	» » Originalkultur	» » } 102 010 »

Platte III, gezählt 1 Kolonie:

1,0 ccm der III. Verdünnung enthielt somit 1 Keim.

Da sich nun Verdünnung I zu Verdünnung II etwa wie 1 : 100 verhält, so müßte 1,0 ccm der Verdünnung III 0,1 Keim enthalten, oder es entfiere erst auf die zehnte Platte ein Keim. Es ist also klar, daß Platte III bei der Zählung nicht berücksichtigt werden darf. Der Durchschnitt ist also nur aus Platte I und Platte II zu berechnen:

$$\begin{array}{r} \text{Platte I} = 100\ 192 \text{ Keime } 1 \text{ ccm Originalkultur} \\ \text{» II} = 102\ 010 \text{ » 1 » » } \end{array}$$

Mittel: 101 101 Keime für 1 ccm der Originalkultur.

Die Bestimmung des Milchzuckergehaltes der ausgeblasenen Probe wurde nach dem Soxhletschen Verfahren ausgeführt:

50 ccm Fehlingscher Lösung wurden mit 5 event. 10 ccm (je nach der Konzentration) der filtrierten Kulturflüssigkeit und mit etwa 100 ccm Wasser 6 Minuten im Sieden erhalten. Das ausgeschiedene Kupferoxydul wurde in der Allihnschen Röhre gesammelt, als Oxyd gewogen und nach den Weinschen Tabellen auf Milchzucker umgerechnet.

Die Säurebestimmung wurde in den Versuchen I und II so ausgeführt, daß 5 ccm der Kulturflüssigkeit direkt nach Zusatz von Lackmuskintur mit $\frac{1}{10}$ N-Natronlauge titriert wurden. Dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert, ausgeäthert und die ätherische Lösung auf dem Wasserbade abgedampft. Der mit Wasser aufgenommene Rückstand wurde abermals titriert und als Milchsäure in Rechnung gebracht.

Teilweise wurde bei den übrigen Versuchen auch folgendes Verfahren eingeschlagen: 5 ccm der gut umgeschüttelten Kulturflüssigkeit wurden mit verdünnter Schwefelsäure versetzt; der

gebildete Gips wurde abfiltriert, worauf ausgeäthert wurde. Der nach dem Verdunsten des Äthers bleibende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und titriert.

Eine andere Methode kam daneben zur Anwendung: 5 ccm der umgeschüttelten Kulturflüssigkeit wurden mit Ammoniumkarbonatlösung erhitzt, der kohlensaure Kalk wurde abfiltriert, das milchsaure Ammoniak mit Schwefelsäure zersetzt, die freie Milchsäure ausgeäthert, der Äther verdunstet und der Rückstand wie oben titriert.

Den chemischen Nachweis der Milchsäure habe ich zum Schluß des Versuchs in folgender Weise¹⁾ geführt:

Das in der Kulturflüssigkeit suspendierte Gemenge von kohlensaurem und schwer löslichem milchsauren Kalk wurde abfiltriert und mit Ammoniumkarbonat gekocht, um die Milchsäure als Ammoniumverbindung zu erhalten. Die Lösung derselben wurde mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt und mit Äther extrahiert. Dann wurde die ätherische Lösung verdampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, etwa vorhandene Schwefelsäure (stets nur ganz geringe Spuren) durch Bleiessig als schwefelsaures Blei entfernt, mit mehr Bleiessig versetzt und so lange alkoholisches Ammoniak hinzugefügt, als noch eine Fällung von basischem milchsauren Blei entstand. Das Salz wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, und die Lösung der Milchsäure polarisiert.

Obwohl Kruse²⁾ für den *Bacillus acidi lactici* Hueppe als Nebenprodukte des Stoffwechsels nur Kohlensäure und Alkohol angibt, so war es doch, wie schon erwähnt, kaum zweifelhaft, daß noch andere Körper als jene durch die Lebensthätigkeit des Bakteriums erzeugt würden, besonders da schon Luboldt³⁾ als Umsetzungsprodukte des Milchzuckers bei der Milchsäuregärung Milchsäure, Alkohol, Kohlensäure und Essigsäure angibt und Konrad bei dem *Bacterium brassic. acid.* verschiedene Gase und Säuren nachgewiesen hat.

1) Palm, Zeitschrift f. analyt. Chemie 22, S. 223; 26, S. 34.

2) Kruse bei Flügge, Die Mikroorganismen, Bd. II, S. 356.

3) Luboldt, Über die Gärung des Milchzuckers. Journal f. prakt. Chemie, 1859, Bd. 67, S. 282.

Ich habe den Nachweis etwaiger Nebenprodukte in den Kulturen meines Milchsäurebildners nach der bei Conrad angegebenen Methode¹⁾ ausgeführt:

Nach Abschluss der Milchsäuregärung wurde die Kulturflüssigkeit der Destillation unterworfen, und das Destillat auf flüchtige Stoffe untersucht. In Betracht konnten kommen: Alkohol, Aldehyd und Aceton.

Zur Prüfung auf Alkohol wurde im Destillat die Jodoformreaktion mit Erfolg angewandt.

Ein anderer Teil des Destillates wurde zum Nachweis von Aldehyd mit saurem schwefligsauren Natron behandelt: Aldehyd war nicht nachweisbar.

Zur Ermittlung von Aceton²⁾ wurde ein Teil des Destillates mit Sublimatlösung versetzt, der mit alkoholischer Kalilauge alkalische Reaktion erteilt war. Nach kräftigem Umschütteln wurde filtriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelammonium überschichtet, Schwarzfärbung blieb aus: Aceton war nicht vorhanden.

Der Rückstand der Kulturflüssigkeit wurde auf den dritten Teil eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf 6 bis 8 Stunden destilliert. Trotz der langen Dauer der Destillation gelang es nicht, die flüchtigen Säuren vollkommen überzutreiben (vgl. Conrad). Das Destillat wurde mit Barytwasser neutralisiert, die Lösung der Barytsalze fast bis zur Trockne verdampft und die Salzmasse mit konzentrierter Phosphorsäure versetzt. Die sich abscheidende wässrige Schicht hätte die Säuren der Ameisensäurereihe bis zur Buttersäure enthalten müssen.

Ameisensäure nachzuweisen, wurde mit Silbernitrat und Quecksilberchlorid vergeblich versucht.

Essigsäure wurde durch die Bildung von Essigsäureäthylester erkannt.

Der Destillationsrückstand wurde mit Äther ausgeschüttelt; er enthielt reine Milchsäure, die in das Zinksalz übergeführt wurde, dessen Lösung die Polarisationsebene nicht drehte.

1) Conrad, Archiv f. Hygiene, Bd. 29, S. 72 u. ff.

2) Hoppe-Seyler, Handbuch d. physiol. Chemie, 6. Aufl., 1893.

Als Stoffwechselprodukte wurden bei meinen Versuchen also Milchsäure, Essigsäure und Alkohol festgestellt. Die Natur der reichlich gebildeten Gase konnte mangels gasanalytischer Apparate im einzelnen nicht ermittelt werden. Jedoch wurde das Vorhandensein von viel Kohlensäure unter denselben konstatiert.

Berechnet wurden Milchzucker und Milchsäure auf 100 ccm Kulturflüssigkeit. Die Prozentzahlen dürfen den absoluten wohl gleich geachtet werden, da eine Verdunstung der Kulturflüssigkeit während des Versuches so gut wie ausgeschlossen erschien.

Obwohl mir die Thatsache bekannt ist, dafs freie Milchsäure das Wachstum der Milchsäure produzierenden Bakterien empfindlich schädigt und schliesslich gänzlich hemmt, eine Thatsache, der man in der Industrie durch Zusatz eines Neutralisierungsmittels zu den Kulturmedien Rechnung trägt, so erschien es doch nicht uninteressant, die Milchzuckerzersetzung auch für diese Fälle kennen zu lernen, in welchen die gebildete Milchsäure in der Kulturflüssigkeit frei verblieb. Die beiden ersten Versuche wurden deshalb ohne Zusatz einer säurebindenden Substanz zur Kulturflüssigkeit ausgeführt.

I. Versuch.

200 ccm 1 proz. Peptonmolke ohne Neutralisierungsmittel, mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur von *Bacillus acidi lactici* Hueppe beschickt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme d. Milchzuckers in %	Säure in %		Keime pro 1 ccm
			flüchtige (als Essigsäure berechnet)	nichtflücht. (als Milchsäure berechnet)	
Nach d. Beschickung	3,554	—	—	—	20 025
› 72 Stunden	3,238	0,270	0,072	0,061	46 918 452 913
› 144 „	3,284	—	0,100	0,074	51 346 295
› 216 „	3,134	0,150	0,067	0,038	10 110 100
› 288 „	3,120	0,014	0,037	0,148	10 010

II. Versuch.

wurde in derselben Weise wie Versuch I ausgeführt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme d. Milchzuckers in %	Säure in %		Keime pro 1 ccm
			flüchtige (als Essigsäure berechnet)	nichtflücht. (als Milchsäure berechnet)	
Nach d. Beschickung	3,538	—	—	—	—
„ 72 Stunden	3,180	0,358	0,06	0,061	209 963 755
„ 144 „	3,180	0	?	?	148 903 755
„ 216 „	3,150	0,030	0,073	0,112	10 020 010
„ 288 „	3,120	0,030	0,108	0,018	steril

Wie zu erwarten war, setzte die auftretende Säure der Vermehrung der Bakterien ein baldiges Ziel. Obwohl noch eine große Menge Milchzucker vorhanden war, vermochten die Bakterien nicht denselben aufzuzehren.

In beiden Versuchen fand die stärkste Vermehrung der Bakterien innerhalb dreier Tage statt. Die Zahl der Keime nahm dann wieder ab, bis nach 12 Tagen die Abnahme so bedeutend war, daß die Platten steril oder fast steril blieben.

Die Zersetzung des Milchzuckers erhellt aus folgender Tabelle:

Versuch	Milchzuckerzersetzung in %			
	nach 72h	144 h	216 h	288 h
I	8,9	7,6 (?)	11,8	12,2
II	10,1	10,1	10,9	11,8

Offenbar wurden die Bakterien in ihrer Lebensthätigkeit durch die von ihnen produzierte Säure geschädigt, ja vielleicht zum Teil sogar getötet. Ich schliesse auf letzteres daraus, daß die Platten zuletzt steril waren. Wären die Bakterien nur in ihrer Entwicklung gehemmt gewesen, so hätten sie sich auf dem frischen Nährboden rasch wieder vermehren müssen. Eine Rechtfertigung dieses Schlusses, daß sie getötet wurden, erblicke ich in den

Erfahrungen beim Versuch V, bei welchem die Säure durch im Überschufs vorhandenes Calciumkarbonat jeweils sofort gebunden wurde. Hier blieb die Kulturflüssigkeit, nachdem mit dem Verschwinden des Milchzuckers und der Abnahme der Keime der Versuch abgebrochen war, vom 10. August bis zum 30. Oktober stehen. Beim Anfertigen einer Platte mit 0,1 ccm der Kulturflüssigkeit zeigten sich sehr zahlreiche Kolonien. Die Bakterien hatten hier wegen Mangels an Nahrung einen gewissen Ruhezustand erreicht, um aber bei Darbietung eines guten Nährbodens sich sofort wieder rasch zu vermehren.

Es lag der Gedanke nicht fern, dafs bei den Bakterien während dieses Ruhestadiums Sporulation aufgetreten sei. Ich konnte jedoch keine Sporen nachweisen. Würde mein Bacillus solche bilden, so hätte er dies doch in den Fällen sicher thun müssen, wo er, wie z. B. bei Versuch XI, offenbar zuerst die günstigsten Lebensbedingungen hatte, aber allmählich die Erschöpfung des Nährmaterials drohte. Aber auch in diesem Falle fand ich nichts, was als Sporen hätte angesprochen werden können. Ebenso wenig aber auch, als ich die Versuche Hueppes wiederholte. Hueppe sagt über seinen Sporenbefund¹⁾:

». . . habe ich mich von der Sporenbildung überzeugt. In der Milch und in der Gelatine hatte ich wohl schon Formen beobachtet, welche Sporen zu sein schienen, konnte mich aber nicht bestimmt dafür aussprechen. Sicher gelang mir dies in den verschiedensten Zuckerlösungen. Hier beobachtete ich endständig an den kleinen Zellen das Auftreten eines kugeligen, glänzenden, stark lichtbrechenden Körperchens.«

In eine sterile Traubenzuckerlösung brachte ich eine möglichst grofse Menge von Bakterien und kultivierte 14 Tage bei gewöhnlicher Temperatur. Bei der mikroskopischen Untersuchung ergab sich, dafs keine Sporen gebildet waren, wohl aber eine starke Involution der Bakterien stattgefunden hatte, welche so tiefgreifend war, dafs selbst Aussaat in Traubenzuckergelatine, also Zufuhr guter Nährstoffe, nicht mehr regenerierend wirkte.

1) Hueppe, Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, 2, S. 339—340.

Ich bestätige damit übrigens den Befund Mac Donnells, der fand, daß Milchsäurebakterien nicht in reinen Milchzuckerlösungen wachsen, auch für Traubenzuckerlösungen.

Die Beobachtung von der Abnahme der Keime in den Kulturen nach einer gewissen Zeit bei gleichzeitigem Unvermögen derselben, selbst auf guten Nährböden (Gelatineplatten) wieder zu wachsen und Kolonien zu bilden, stimmt außerordentlich gut mit den Beobachtungen Burchards überein, der ähnliche Ruhezustände bei dem *Micrococcus ureae liquefaciens* fand.

Bei den folgenden Versuchen III-VIII wurde zu den Kulturflüssigkeiten gefälltes Calciumkarbonat zur Bindung der gebildeten Milchsäure hinzugefügt. Damit waren ähnliche Bedingungen geschaffen, wie sie in der Industrie zur Herstellung von technischer Milchsäure dienen.

III. Versuch.

200 ccm 1 proz. Peptonmolke mit reichlichem Calciumkarbonatzusatz, mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur von *Bacillus acid. lact.* Huppe bescheckt.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Bescheckung	3,402	—	—	10 010
„ 72 Stunden	2,162	1,240	0,018	300 600 300
„ 144 „	0,860	1,302	0,130	?
„ 216 „	0,560	0,300	0,203	?
„ 288 „	Spuren	0,560	0,180	918 278 910
„ 360 „	—	—	0,198	725 302 520

IV. Versuch.

Anordnung dieselbe wie beim III. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure in g pro 100 ccm Kul- turflüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Bescheckung	3,402	—	—	10 010
„ 72 Stunden	2,404	0,998	0,056	40 080 040
„ 144 „	2,060	0,364	0,168	?
„ 216 „	1,320	0,740	0,320	?
„ 288 „	0,440	0,880	0,260	2 082 080 520
„ 360 „	Spuren	0,440	0,279	493 906 630

Beide Versuche zeigen sehr deutlich den günstigen Einfluss, der ausgeübt wird, wenn die gebildete Säure sofort gebunden wird. Die Abnahme des Milchzuckers, die sich bei den beiden ersten Versuchen in sehr bescheidenen Grenzen hielt, geht hier rapide vor sich. Während dort der Milchzuckergehalt der Kulturflüssigkeit insgesamt sich nur um 0,43 resp. 0,42% verminderte, ist hier bei Versuch IV fast die ganze Menge des Milchzuckers nach 360 Stunden, bei Versuch III schon nach 288 Stunden aufgezehrt.

Dasselbe Ergebnis lieferten die zur Kontrolle dieser Versuche angestellten folgenden Versuche (V—VIII), deren Anordnung vollständig die gleiche war wie die der Versuche III und IV; nur kamen bei Versuch VII und VIII 500 ccm Peptonmolke zur Verwendung.

V. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,120	—	—	80 040
› 72 Stunden	1,418	1,702	0,130	?
› 144 ›	0,768	0,650	0,315	939 129 330
› 216 ›	0,172	0,596	0,556	540 810 270

VI. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	200 100
› 72 Stunden	1,388	1,806	0,112	2 649 203 440
› 144 ›	0,761	0,627	0,185	1 389 934 620
› 216 ›	0,112	0,649	1,008	1 121 120 280

VII. Versuch.

500 ccm 1 proz. Peptonmolke.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,164	—	—	200 100
› 72 Stunden	1,694	1,470	0,018	2 283 280 280
› 144 ›	0,976	0,718	0,083	1 681 680 420
› 216 ›	0,753	0,223	0,407	945 552 540
› 288 ›	0,162	0,591	0,065	189 274 590
› 360 ›	—	0,162	0,243	350 700 350

VIII. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,314	—	—	1 001
› 72 Stunden	2,892	0,422	0,018	51 005
› 144 ›	0,858	2,034	0,074	9 231 905
› 216 ›	0,805	0,053	0,056	2 274 823
› 288 ›	0,449	0,356	0,074	5 151 505

Die Versuchsergebnisse aus dieser Reihe (III—VIII) sind nachstehend auch noch in graphischer Darstellung wiedergegeben.

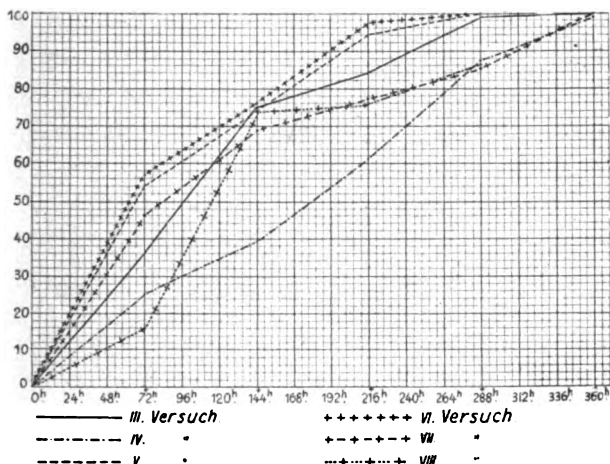
Diagramm I zeigt die Zersetzung des Milchzuckers in Prozenten, Diagramm II die Bildung der Milchsäure in Centigrammen, berechnet für je 100 ccm Kulturflüssigkeit. Diagramm III endlich zeigt die Zu- und Abnahme der im Kubikcentimeter Peptonmolke gezählten Keime.

Wie man sieht, weichen die Kurven der Diagramme von einander im allgemeinen mehr oder weniger ab; es verhalten sich aber auch die Kurven der einzelnen Versuche auf dem gleichen Diagramm verschieden.

Was die Milchzuckerzersetzung anlangt, so dauert dieselbe allgemein an, bis der vorhandene Milchzucker zersetzt ist. Die Schnelligkeit des Anstiegs der Zersetzung war jedoch verschieden, am größten bei den Versuchen V, VI und VII, im Verlauf derer

schon in den ersten drei Tagen etwa die Hälfte des Milchzuckers zerstört war. Bei Versuch IV war die Zersetzung durchaus verlangsamt; am Ende des dritten Versuchstages waren erst 25%, am Ende des sechsten Versuchstages erst 40% des vorhandenen

Diagramm I.
Zersetzung des Milchzuckers in Prozenten.



Milchzuckers zerlegt. In diesem Versuch erfolgte die Zersetzung aber außerordentlich gleichmäßig:

am 3. Tage zerlegt:	25%	
» 6. »	39%	+ 14
» 9. »	54%	+ 15
» 12. »	85%	+ 31
» 15. »	100%	+ 15

Verzögert war zu Anfang (bis zum dritten Tage) auch die Zersetzung des Milchzuckers in Versuch VIII (15%); jedoch wuchs dieselbe innerhalb der nächsten drei Tage bereits auf 73%.

Es liegt nahe, diese Unterschiede in der Milchzuckerzersetzung auf die Größe der Bakterienaussaat und -Vermehrung zurückzuführen. Im Versuch VIII ist in der That die Bakterienaussaat geringer gewesen als in irgend einem anderen Versuch. Nach drei Tagen waren die ausgesäten Bakterien zwar um das 50fache vermehrt, aber immerhin erst in der Hälfte der Menge vorhanden,

34 Beiträge zur Kenntnis d. quantitativen Zersetzung des Milchzuckers etc.

welche bei den meisten übrigen Versuchen schon gleich von vornherein vorhanden war. Am sechsten Tage allerdings war die Vermehrung auf das 10000fache gediehen. Eine solch rapide

Diagramm II.

Gebildete Milchsäure in Centigrammen pro 100 cem Kulturflüssigkeit.

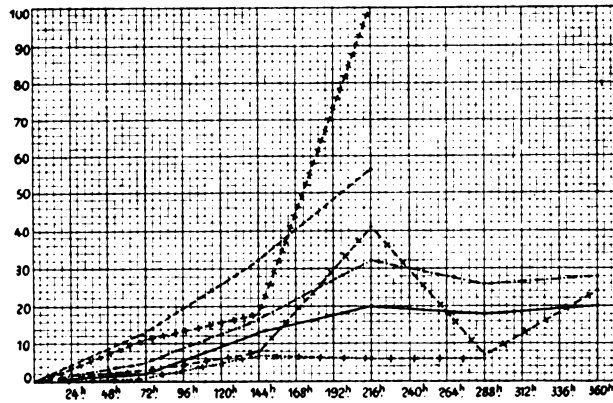
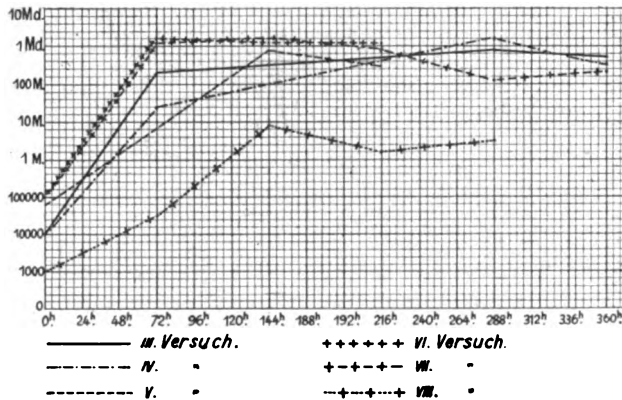


Diagramm III.

Vermehrung des Bac. acid. lact. Anzahl der Keime im Kubikcentimeter der Kulturflüssigkeit.



Vermehrung haben die Bakterien in den Versuchen VI und VII bereits in drei Tagen erfahren, während sie im Versuch IV erst am zwölften Tage erreicht war. Daher auch die verlangsamte Zersetzung des Milchzuckers in diesem Versuch.

Bemerkenswert ist, daß die Bakterienvermehrung nicht fortwährend anhält, sondern relativ früh ihr Maximum erreicht; alsdann bleibt entweder die Bakterienzahl einige Zeit gleich oder sinkt sofort wieder ab, bis schliesslich die schon erwähnte Erscheinung auftritt, daß auf den Zählplatten keine oder nur wenige Kolonien mehr zur Entwicklung kommen.

Die Ursache für dieses Verhalten der Bakterien könnte entweder die sein, daß mit der drohenden Erschöpfung des Nährbodens die Vermehrung aufhört; dann müßten aber immerhin noch zahlreiche Kolonien auf den Zählplatten zur Entwicklung gekommen sein; oder aber die Bakterien gehen infolge des Mangels an Nährmaterial oder durch Anhäufung der Stoffwechselprodukte zu Grunde, was, wie oben Seite 16 hervorgehoben ist, nicht der Fall war. Oder endlich, sie treten in ein Ruhestadium ein, ähnlich wie manche tierische Parasiten oder die Samen der Pflanzen, aus dem sie nur durch bestimmte Reize aufgeweckt werden. In diesem Falle müssen sie aber jedenfalls Reservestoffe aufspeichern (Fette, Kohlehydrate oder Eiweißstoffe). Läßt man letztere Annahme gelten, so sind alle Schlüsse aus dem Ergebnisse der Auszählung der Plattenkulturen höchst wahrscheinlich falsch. Man zählt dann die noch nicht in das Ruhestadium eingetretenen, jedenfalls aber nicht alle in der Kultur vorhandenen Individuen. Es eröffnet sich hier noch ein weites Feld für die Forschung.

Auffällig stark weichen die Kurven für die Milchsäurebildung unter sich und von den oben behandelten Kurven für die Milchsäurezerersetzung und die Bakterienvermehrung ab. In den Versuchen III, IV und VIII bleibt die Milchsäureproduktion am sechsten, bezw. neunten Tage stehen, ja es geht sogar die Milchsäuremenge wieder zurück. Der starke Rückgang der Milchsäureproduktion am zwölften Tage des Versuches VII kann vielleicht durch einen Analysenfehler bedingt sein. Hingegen steigt die Milchsäuremenge in den Versuchen V und VI konstant an, im Versuch VI sogar vom sechsten Tage an überraschend schnell.

Von vornherein sollte man erwarten, daß die Milchsäuremengen den zersetzten Milchzuckermengen parallel gehen würden;

das ist aber fast bei keinem Versuche nachzuweisen gewesen. Der Bakterienvermehrung geht die Milchsäureproduktion auch nur im Versuch VIII parallel; bei allen anderen Versuchen läßt sich gar keine Übereinstimmung im Gang der Milchzuckerzersetzung und Milchsäurebildung auffinden. Schon dieser Umstand spricht meines Erachtens dafür, daß die Milchsäurebildung der Bakterien kein einfacher molekularer Spaltungsvorgang ist, etwa wie der der Spaltung der Zuckerarten in Alkohol und Kohlensäure durch die Zellthätigkeit der Hefe.

Bei den sämtlichen vorstehenden Versuchen III—VIII ist außerdem auffällig, daß die Menge der gebildeten Milchsäure so außerordentlich gering ist im Verhältnis zum zerstörten Milchzucker. Rechnet man, welche Mengen Milchsäure hätten gebildet werden können, wenn aller Milchzucker in Milchsäure zerlegt worden wäre, so erhält man folgende Werte, die nachstehend übersichtlich geordnet nach den sechs Versuchen mitgeteilt sind:

Versuch	Verhältnis der gefundenen zu der erwarteten Milchsäure in %		
	nach 72 h	144 h	216 h
III	1,5	5,0	7,0
IV	5,6	12,0	15,0
V	8,0	13,0	18,0
VI	6,0	8,0	33,0
VII	1,2	4,0	17,0
VIII	4,5	3,0	2,0

Nur in einem Falle ist $\frac{1}{3}$ der theoretischen Milchsäuremenge gebildet, in den meisten Fällen nur $\frac{1}{7}$ bis $\frac{1}{6}$.

Bei der Bestimmung des Keimgehaltes im Verlaufe der Versuche III—VIII ist mir wiederholt aufgefallen, daß die Auszählungen der verschiedenen Kontrollplatten weniger gut übereinstimmende Resultate lieferten als die bei den Versuchen I und II. Ich glaube nicht irre zu gehen, wenn ich annehme, daß dies dadurch bedingt war, daß der verhältnismäßig schwere, rasch sedimentierende kohlensaure Kalk einen Teil der Bakterien mechanisch niederrifs, während die Probe zur Aussaat aus dem

allerdings gut umgeschüttelten Kölbchen mit der ausgeblasenen Portion entnommen wurde.

Ich habe daher bei dem nächsten Versuche statt des gefällten Calciumkarbonats Marmorstückchen verwendet. Die Befürchtung, daß Marmor als krystallinisches Calciumkarbonat vielleicht zu hart sei, um die abgespaltene Milchsäure schnell genug zu binden, und so etwa nachteilig auf die Vermehrung und Lebensthätigkeit der Bakterien einwirken könnte, erwies sich als unbegründet. Von den nach Beendigung des Versuches herausgenommenen Stücken Marmor ließen sich schon mit den Fingern leicht größere Krümmel abreiben; die ganzen Stücke waren so mürbe geworden, daß ich sie leicht zerbrechen konnte.

Der Versuch IX verlief im übrigen ebenso wie die vorhergehenden, nur waren die Resultate der Auszählungen thatsächlich besser übereinstimmend. Ich lasse das Versuchsergebnis nachstehend folgen.

IX. Versuch.

500 ccm 1 proz. Peptonmolke mit Marmorstückchen, geimpft mit einer frischen Bouillonkultur von *Bacillus acid. lact.* Hueppe.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	—
› 72 Stunden	3,090	0,104	0,009	101 101
› 144 ›	2,832	0,258	0,019	17 586 524
› 216 ›	1,076	1,756	0,093	539 173 855
› 288 ›	0,359	0,717	0,056	89 049 630
› 360 ›	Spuren	0,359	0,009	28 501 594

Eine kleine Abweichung zeigt das Resultat dieses Versuches allerdings darin, daß sowohl Milchzuckerzersetzung wie Bakterienvermehrung anfänglich mehr verzögert waren. Ich halte es für möglich, daß diese Verzögerung durch die etwas schwerere Angreifbarkeit des Marmors, bzw. die durch ihn gebotene kleinere Angriffsfläche bedingt war. Es kann hierdurch möglicherweise anfänglich doch eine gewisse hemmende Säuerung im Nährboden zustande gekommen sein.

Ich habe deshalb zu den folgenden beiden Versuchen (X und XI) Austernschalen verwendet. Die Austernschalen waren in der Weise präpariert, daß die zertrümmerten Schalen in einem Gefäß mit Wasser drei Stunden bei zwei Atmosphären Druck im Autoclaven zur Entfernung der organischen Substanz erhitzt wurden. Eine Analyse der Austernschalen ergab 0,38% Magnesiumoxyd, Spuren von Eisen und Phosphorsäure; der Rest war kohlen-saurer Kalk.

X. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,194	—	—	9 191
› 72 Stunden	Spuren	fast 3,194	0,112	unzählbar
› 144 „	—	—	0,028	unzählbar

Da der Versuch X wider alles Erwarten nach 72 Stunden schon beendet war, wurde zur Kontrolle ein zweiter Versuch angestellt.

XI. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milch- zuckers in %	Milchsäure pro 100 ccm Kultur- flüssigkeit	Keime pro 1 ccm
Nach d. Beschickung	3,328	—	—	101
› 24 Stunden	2,268	1,060	0,019	601 859
› 48 „	Spuren	2,268	0,130	2 638 928

Das Resultat dieser beiden Versuche war ungemein überraschend. Während in früheren Versuchen der Milchzucker frühestens nach 216 Stunden verschwunden war, waren beim Versuch XI schon nach 48 Stunden nur noch Spuren Zucker nachzuweisen.

Da die Versuchsbedingungen bis auf das Neutralisierungsmittel die gleichen geblieben waren, so konnte der Grund zu dieser auffälligen Erscheinung nur in ihm gesucht werden.

Dem geringen Eisengehalt kann die so energische Wirkung nicht zugeschrieben werden, da Bakterien im allgemeinen auf Eisengehalt des Nährbodens keinen Anspruch erheben.

Da der Gehalt an Phosphorsäure in den Austernschalen ein nur sehr geringer ist, Molke andererseits Phosphate in größerer Menge enthält, so ist der Ausfall der beiden letzten Versuche vielleicht der Magnesia zuzuschreiben, eine Vermutung, die mit den bisherigen Erfahrungen über die Wirkung des Magnesiagehaltes des Bodens auf höhere Pflanzen auch ganz gut im Einklang stehen würde.

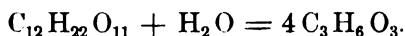
Ich habe deshalb einen Versuch in der gewohnten Weise angestellt, statt der Austernschalen aber Marmor genommen und soviel Magnesiumkarbonat hinzugefügt, als einem Gehalt von 0,38 % Magnesiumoxyd der Austernschalen entsprach.

Meine Hoffnung, hierdurch die gewünschte Aufklärung zu erhalten, wurde getäuscht. Die drei Tage im Brutschrank bei 37° gehaltene Molke hatte nicht die geringste Abnahme in ihrem Milchzuckergehalt erfahren; in einem zweiten Versuche, der fünf Tage währte und bei dem wieder Austernschalen verwendet wurden, konnte nur eine Abnahme von 0,29 % Milchzucker festgestellt werden.

Welcher Umstand die Erscheinung der rapiden Zerlegung des ganzen Milchzuckers bei den Versuchen X und XI veranlaßt hat, ist einstweilen unklar. In einem aber stimmen auch diese Versuche mit den vorhergehenden überein: in der verhältnismäßig sehr geringen Milchsäurebildung:

Versuch	Verhältnis der gefundenen zur erwarteten Milchsäure in %		
	nach 24 h	48 h	72 h
X	—	—	3,6
XI	1,7	5,4	—

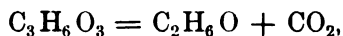
Der Theorie nach soll bei der Milchsäuregärung ein Molekül Milchzucker in vier Moleküle Milchsäure zerfallen:



Dafs die Umsetzung nicht glatt im Sinne dieser Gleichung verläuft, war schon lange bekannt. Man weifs ja auch, dafs Rohrzucker bei der Alkoholgärung nicht glatt in Alkohol und Kohlensäure zerfällt, vielmehr ein, wenn auch sehr geringer Teil des Zuckers zur Ernährung der betreffenden Hefeart verbraucht wird. Die Menge des erzeugten Glycerins und der Bernstein-säure, die als Nebenprodukte entstehen, pflegt aber 3,6 % resp. 0,7 %¹⁾ nicht zu überschreiten.

Es wäre also auch nicht besonders auffällig gewesen, wenn bei der Zersetzung des Milchzuckers durch den *Bacillus acidi lactici* Hueppe Nebenprodukte in nur geringer Menge aufgetreten wären. Nun aber ergab die Untersuchung auf Nebenprodukte, die mit dem Rest der Kulturflüssigkeit des Versuches IX nach Beendigung der Gärung angestellt war, einen auffallend hohen Prozentsatz von Alkohol²⁾, nämlich 0,9%. Weiter war oben festgestellt, dafs sich sowohl im Gelatinestich wie in Bouillonkulturen Gasbläschen entwickelten, die Hueppe als aus Kohlensäure bestehend erkannte. Meine schon mitgeteilten Untersuchungen haben ebenso wie die früherer Untersucher Essigsäure als Nebenprodukt ergeben. Sodann machte sich bei einzelnen meiner Versuche (III, IV, VII, VIII und X) nach 216 resp. 288 Stunden eine Verringerung der zuerst gebildeten Milchsäure bemerkbar.

Diese Erfahrungen liefsen die Vermutung zu, dafs der *Bacillus acidi lactici* Hueppe aufser einem Abbau des Milchzucker-moleküls in Milchsäure noch eine Zerlegung der Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure bewirke, im Sinne der chemischen Gleichung:



und dafs die Essigsäure vielleicht durch Oxydation des Alkohols gebildet würde, analog dem Vorgang bei der Essigbildung.

Oder es war auch denkbar, dafs durch die Anhäufung von Kohlensäure Sauerstoffmangel in den Kulturflüssigkeiten eintrat,

1) Flügge, Die Mikroorganismen, 1896, Bd. I, S. 226.

2) Scholl, Die Milch, Wiesbaden 1891, bestreitet zwar, dafs der *Bacillus acidi lactici* Hueppe Alkohol produziere, doch findet in den Lehrbüchern, z. B. Flügge, stets die Produktion von Alkohol Erwähnung.

der die Bakterien zwang, Essigsäure als abnormes Produkt zu bilden.¹⁾

Eine Durchlüftung des Versuchskolbens konnte hier vielleicht Klarheit schaffen.

Der Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: Ein Kolben mit 400 ccm 1proz. Peptonmolke mit Marmorstückchen, beschickt mit einer frischen Traubenzuckerbouillonkultur des *Bacillus acidi lactici*, wurde im Brutschrank bei 37° einer Durchlüftung unterzogen.

Zu diesem Zwecke wurde der Kolben mit einer Saugpumpe verbunden; zwischen ihm und der Pumpe waren eingeschaltet: eine Wulfsche Flasche (um etwa zurücksteigendes Wasser aufzufangen), zwei mit je 200 ccm von etwa $\frac{1}{10}$ N-Barytwasser gefüllte Pettenkofersche Barytröhren und wieder eine Wulfsche Flasche zur Kondensation des aus dem Versuchskolben weggeführten Wasserdampfes. Andererseits stand der Kolben (rückwärts) in Verbindung mit einem sterilisierten Filter aus Baumwolle und mit einer mit Wasser beschickten Waschflasche, um den Durchlüftungsstrom mit Wasserdampf zu sättigen, die sich ebenfalls im Brutschrank befand. An diese schlossen sich zwei Absorptionstürme, in denen sich mit Wasser befeuchteter Bimsstein befand, sowie einer, der mit Natronlauge getränkte Bimssteinstücke enthielt, und endlich eine Waschflasche mit Natronlauge, um die Kohlensäure der Luft zu absorbieren.

Die Saugpumpe wurde nur soweit in Thätigkeit gesetzt, daß die Luft langsam in kleinen Blasen durch die Barytröhren trat. Alle 24 Stunden wurde der Inhalt der Barytröhren in Stöpselflaschen abgefüllt und durch frisches Barytwasser ersetzt. Von dem Inhalt der Stöpselflaschen wurden nach dem Absitzen des Baryumkarbonats je 25 ccm entnommen und mit $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäurelösung titriert. Die Vermehrung der Bakterien, die Abnahme des Milchzuckers und die Menge der Milchsäure wurde wie bei allen anderen Versuchen jeden dritten Tag festgestellt.

1) Barthel, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, Abt. II, Bd. VI, S. 417, kommt zu dem Resultat, daß sich die Menge der Essigsäure bei Durchlüftung wie 3:2 (bei Nichtdurchlüftung) verhalte.

Nach Beendigung des Versuches wurde eine quantitative Bestimmung des Gesamtcalciums des Kolbeninhalts vorgenommen und damit die Menge der erhaltenen Kohlensäure verglichen.

Das Ergebnis dieses Durchlüftungsversuches sei in nachstehender Tabelle aufgeführt.

XII. Versuch.

Zeit	Milchzucker in %	Abnahme des Milchzuckers in %	Milchsäure in %	Keime pro 1 ccm	Kohlensäure in g	Kohlensäure in je 3 Tagen
Nach d. Beschickg.	3,328	—	—	20 020	—	
› 24 Stunden	—	—	—	—	0,6635	} 2,0493
› 48 ›	—	—	—	—	0,4026	
› 72 ›	1,342	1,986	0,074	170 340 170	0,9832	
› 96 ›	—	—	—	—	0,3452	} 0,7812
› 120 ›	—	—	—	—	0,1623	
› 144 ›	0,976	0,366	0,056	17 547 530	0,2737	
› 168 ›	—	—	—	—	0,2129	} 0,6188
› 192 ›	—	—	—	—	0,2572	
› 216 ›	0,909	0,067	0,037	15 045 030	0,1487	
› 240 ›	—	—	—	—	0,2275	} 0,3764
› 264 ›	—	—	—	—	0,0638	
› 288 ›	0,857	0,052	0,018	5 045 040	0,0851	
› 312 ›	—	—	—	—	0,0251	} 0,0609
› 336 ›	—	—	—	—	0,0286	
› 360 ›	—	—	—	—	0,0072	
› 384 ›	0	0,857	0,052	?	0,0000	

Der Versuch wurde abgebrochen, als keine Kohlensäure mehr entwickelt wurde. Die Kulturflüssigkeit war fast ganz klar geworden. Sie wurde nach der auf Seite 13 angegebenen Methode behandelt; der Rückstand wurde nach dem Abdampfen eingeäschert, und das rückständige schwefelsaure Calcium mit Soda geschmolzen. Nach dem Auslaugen und Auswaschen der löslichen Salze wurde das Karbonat in verdünnter Salzsäure gelöst, das Calcium als Oxalat gefällt und als Oxyd gewogen: gefunden wurden 0,334 g Calciumoxyd.

Versuch XII ergab 3,8866 g Kohlensäure
 0,334 g Calciumoxyd entsprechen 0,2620 g „
 so dafs 3,6246 g Kohlensäure

aus zerlegtem Zucker oder anderen Nahrungsstoffen herkommen müssen.

Daneben wurde durch Destillation der mit Schwefelsäure angesäuerten Kulturflüssigkeit 0,162 % Essigsäure gefunden. Der Milchsäuregehalt betrug 0,052 %.

Hieraus ergibt sich folgendes:

Wegen des Zusatzes von Marmor muß alle gebildete Säure in Form von Calciumsalz vorhanden gewesen sein, da die Peptonmolke vorher eben schwach alkalisch war.

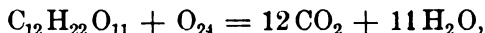
Gefunden wurden direkt	0,334 g CaO
ferner 0,162 % Essigsäure, also für 320 ccm ¹⁾ Molke 0,518 g, entsprechend	0,242 g CaO
und 0,052 % Milchsäure, also für 320 ccm Molke 0,166 g, entsprechend	<u>0,052 g CaO</u>

zusammen: 0,294 g CaO.

Durch Analyse gefunden	0,334 g Calciumoxyd
berechnet	<u>0,294 g</u>

somit mehr gefunden als berechnet 0,040 g Calciumoxyd, welche wohl auf den ursprünglichen Kalkgehalt der Molke zurückgeführt werden müssen.

Durch die gefundenen 3,6246 g Kohlensäure, die nicht aus zersetztem Marmor herrühren können, wird aber der Verbleib des Milchzuckers lange nicht aufgeklärt. Nimmt man für die Berechnung der zu erwartenden Kohlensäure selbst die Endgleichung:



so würde die gefundene Kohlensäure immer erst 2,3477 g Milchzucker entsprechen.

Allerdings kommt noch die Produktion von Alkohol in Betracht, aber auch dessen Menge reicht nicht hin, den Verbleib des Zuckers völlig aufzuklären.

Den Anlaß zu diesem Versuche hatte die Erwägung gegeben, ob etwa die Milchsäure weiter gespalten würde, und jene, ob die Zunahme der Kohlensäure in der Kulturflüssigkeit hemmend auf die Milchsäurebildung wirke.

¹⁾ 320 ccm Kulturflüssigkeit waren bei Beendigung des Versuches noch vorhanden.

Was die erstere Frage anlangt, so gibt der Ausfall des Versuches XII wohl die klare Antwort, daß die Milchsäure durch die Bakterien weiter zerlegt wird. Würde nur einfach ihre Bildung gehemmt sein, so müßte der Gehalt der Flüssigkeit an Milchsäure zwar langsam ansteigen, aber jedenfalls an sich sehr gering sein. Gerade das Gegenteil findet aber statt. Nachdem zunächst eine gewisse Menge Milchsäure gebildet ist, nimmt deren Menge von Tag zu Tag ab und steigt erst wieder kurz vor Abschluss des Versuches an, zu einer Zeit, wo der Milchzucker zum größten Teil bereits zerlegt ist.

Hingegen läßt sich nicht darthun, daß die Gegenwart von Kohlensäure in der Kulturflüssigkeit auf die Bildung von Milchsäure von nachteiligem Einfluß ist. In dem Durchlüftungsversuche wurden in den ersten drei Tagen aus 1,986 g Milchzucker 0,074 g Milchsäure gebildet, während in der gleichen Zeit in den übrigen Versuchen ohne Abführung der Kohlensäure gebildet wurden:

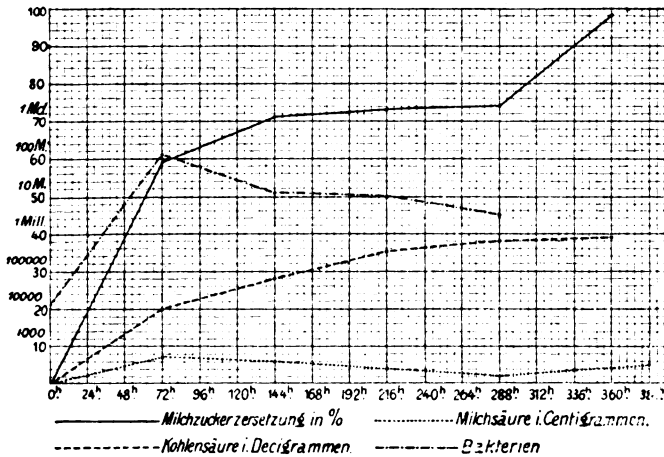
Versuch	Zerstörter Milchzucker	Gebildete Milchsäure	Auf 100 g Milch- zucker entfallen Milchsäure
III	1,240	0,018	1,45
IV	0,998	0,056	5,61
V	1,702	0,130	7,64
VI	1,806	0,112	6,20
VII	1,470	0,018	1,23
VIII	0,422	0,018	4,26
IX	0,104	0,009	8,65
X	3,194	0,112	3,51
XI	1,060	0,019	1,80
XII	1,986	0,074	3,73

Das Gesamtergebnis des XII. Versuches habe ich auf nachfolgender graphischer Darstellung wiedergegeben. Aus derselben wird ersichtlich, daß Milchzuckerzersetzung, Milchsäurebildung und Kohlensäureproduktion anfänglich mit einer rapiden Vermehrung der Milchsäurebakterien zusammengehen. Mit der Abnahme der Bakterien nimmt relativ alles wieder ab: Während

aber absolut die Menge der Kohlensäure und des zerstörten Milchzuckers noch wächst, nimmt die Milchsäure auch absolut an Menge ab.

Es könnte nun noch der Einwand erhoben werden, daß sämtliche Versuche bei zu hohen Temperaturen ausgeführt seien, bei welchen die Umsetzung des Milchzuckers aus thermochemischen Gründen leichter zu Essigsäure, Alkohol und Kohlensäure erfolgen könnte; aber auch diesen Einwand entkräftet der Befund

Diagramm des Versuches XII.



bei einem Versuche bei 17°, im Verlaufe dessen nach 12 Tagen auch nicht mehr Milchsäure (0,018%) gebildet war.

Ich glaube, daß zur Aufklärung der Widersprüche in den Versuchsergebnissen besondere Versuche nötig sind, die namentlich das Verhalten der Milchsäurebakterien in Kulturflüssigkeiten festzustellen bezwecken müßten, welche beliebig in ihrer Zusammensetzung modifiziert werden. Ich glaube dies um so mehr, als ja auch Burchard bei seinen Versuchen mit Zusatz von schwefelsaurem Kalk zum Harn ganz andere Resultate erzielte als bei den Versuchen ohne diesen Zusatz. Zweifellos stellen gewisse Zusätze zu den Kulturflüssigkeiten Reize für die Bakterien dar, unter deren Wirkung die Stoffzersetzung rascher, intensiver und andersartig werden kann.

46 Beiträge zur Kenntnis d. quantitativen Zersetzung des Milchzuckers etc.

Mir genügt zunächst das Ergebnis, daß der Milchzucker nicht bloß in Milchsäure, sondern in eine ganze Reihe von anderen Stoffen zerlegt wird, und daß bei Bindung der Milchsäure durch Kalk die Zersetzung des Milchzuckers eine ganz außerordentlich große ist.

Um über die Leistung der einzelnen Bakterienzelle einen Überblick zu gewinnen, füge ich folgende Tabelle bei:

Versuch	Anzahl der Keime pro Kubikcentimeter		Milchzuckerzersetzung in 72 Std. in mg
	bei Beginn	nach 72 Std.	
III	10 010	300 600 300	12,40
IV	10 010	40 080 040	9,98
VI	200 100	2 649 203 440	18,06
VII	200 100	2 283 280 825	14,70
VIII	1 001	51 005	4,22
XII	20 020	170 340 170	19,86

Daraus leitet sich folgende quantitative Stoffzersetzung der Milchsäurebakterien ab:

Versuch	Mittlere geometrische Keimzahl während 72 Std.	Milchzuckerzersetzung in 72 Stunden in mg	Zersetzung durch 1000 Keime in 72 Std. in mg	Zersetzung durch 1000 Keime pro Stunde in mg	Mittlere Teilungszeit eines Keimes in Stunden
III	1 734 650	12,40	0,0071	0,00010	4,9
IV	633 404	9,98	0,0158	0,00022	6,1
VI	23 028 400	18,06	0,0008	0,00001	5,3
VII	21 374 900	14,70	0,0007	0,00001	5,4
VIII	7 145	4,22	0,6029	0,00838	12,6
XII	1 846 675	19,86	0,0107	0,00015	5,8

Die mittlere Zersetzungsgröße für 1000 Keime schwankte nicht unerheblich, nämlich zwischen $\frac{1}{100000}$ bis $\frac{8}{1000}$ mg für die Stunde.

Als Mittel für die Teilungszeit eines Keimes ergeben sich 5,5 Stunden, wenn von Versuch VIII abgesehen wird, bei dem ganz abnorme Verhältnisse vorzuliegen scheinen.

Burchard beobachtete bei dem *Micrococcus ureae liquefaciens* die Erscheinung, daß, je schneller die Teilung eines

Keines erfolgte, desto langsamer der Harnstoff zersetzt wurde. Ich kann die gleiche Erscheinung für den *Bacillus acidi lactici* Hueppe nachweisen.

Da es mir gelang, auf Traubenzucker-Gelatine rasch sehr üppige Kulturen des *Bacillus acidi lactici* zu erzielen, so habe ich versucht, das Gewicht meiner Bakterien festzustellen.

Den Versuch habe ich folgendermassen angestellt: Die Kulturrasen wurden möglichst vorsichtig mit der Platinöse von der Gelatineplatte abgekratzt und in einem sterilen Wäagegläschen gewogen. Eine gewogene Menge wurde dann durch Schütteln mit Glasperlen gut in Wasser verteilt; von dieser wässerigen Suspension der Bakterien wurden Verdünnungen hergestellt, Platten gegossen und ausgezählt. Die Berechnung ergab:

17767750000 Bakterien für ein Gramm feuchter Bakterienmasse.¹⁾

Der Rest der Bakterienmasse wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ergab:

10,12 % Trockensubstanz,
89,88 % Wasser.

Wie oben aus der Tabelle ersichtlich, zersetzten 1000 Keime in der Stunde 0,00001 bis 0,00838 mg Milchzucker. Die stündliche Leistung eines Gramms feuchter Bakterienmasse bei der Zerlegung des Milchzuckers würde sich also auf 178 bis 14889 g Milchzucker beziffern.

1) Nägeli, Die niederen Pilze, München 1877, S. 7, hat für einen ganz kleinen *Coccus* berechnet, dass im trockenen Zustand 30 Billionen Spaltpilze auf 1 g entfallen; bei einem durchschnittlichen Wassergehalt der Spaltpilzzellen von 80 % würden etwa 6 Billionen Spaltpilze im feuchten Zustand auf 1 g kommen. Allerdings ist der *Bacillus acidi lactici* erheblich grösser als die von Nägeli verwendete *Cocccenart*.

Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. II.

Von

Dr. **Max Schottelius**,

Professor der Hygiene.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Freiburg i. B.)

Im XXXIV. Band dieses Archivs wurde von mir über Versuche berichtet, welche den Zweck hatten, an steril gezüchteten Hühnchen die Frage der Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung ihrer Lösung näher zu rücken.

Über den weiteren Verlauf dieser Untersuchungen, welche in den Jahren 1899, 1900 und 1901 fortgeführt wurden, konnte ich auf der Naturforscher-Versammlung in Hamburg unter Vorführung der diesbezüglichen Präparate einige Mitteilungen machen. Diese Mitteilungen mußten sich aber, den Umständen entsprechend, darauf beschränken, in gedrängter Kürze die wesentlichsten Ergebnisse der Versuche zusammenzufassen, und es war mir in der That auch mehr darum zu thun, in Hamburg einer größeren Anzahl von Fachgenossen meine Präparate, welche in kleinerem Kreis bereits mehrfach demonstriert waren, vorzeigen zu können, als einen erschöpfenden Bericht über den Verlauf der Versuche und über die sich daraus ergebenden Schlusfolgerungen zu erstatten.

Die ausführlicheren Mitteilungen, auf welche ich damals hinwies, sind nun im folgenden enthalten:

Nachdem es uns im Jahre 1898 gelungen war, wenigstens bis zum 17. Lebenstage ein Hühnchen steril zu erhalten, wurde

für die Brutperiode des Jahres 1899 die Aufgabe gestellt: den Versuch bis zum spontanen Absterben der Tiere durchzuführen.

Vorausgeschickt wurden aber einige Versuche, aus denen ich feststellen wollte, wie lange überhaupt ein frisch ausgeschlüpftes Hühnchen ohne Nahrung lebt und welchen Gewichtsverlust es erleidet und zwar einmal ohne Zufuhr von Wasser und dann bei Wasseraufnahme. Das Experiment wurde in einem oben offenen, hohen, geräumigen Glasbehälter vorgenommen, dessen Boden mit grobem gewaschenen Kies bedeckt war.

Das Ergebnis dieser Versuche war, daß die Hühnchen verhältnismäßig sehr lange Zeit ohne jede Nahrung am Leben bleiben können, 10—12 Tage lang! Meistens gehen die Tiere allerdings schon nach 3—5 Tagen ein. Die Wasserzufuhr scheint dabei nur wenig Einfluß zu haben, sondern maßgebend ist vor allem die angeborene Lebenskraft. Ich schliesse das daraus, weil die äußeren Lebensbedingungen Wärme, Licht etc. stets die gleichen waren und weil das absolute Gewicht der ausgeschlüpften Hühnchen nicht proportional maßgebend ist für die Lebensdauer. Mitbestimmend wirken allerdings auch die äußeren Faktoren: wenn die hungernden Tiere warm und während des größeren Teils des Tages dunkel gehalten werden, so kann man dadurch die Lebensdauer verlängern, während anderseits unruhiges Hin- und Herlaufen und kühlere Aufsentemperatur die vorhandene Lebenskraft rascher erschöpft. Am ersten und am zweiten Tage liegen die Hühnchen ohnehin fast ständig langgestreckt am Boden und lernen erst allmählich den Kopf heben, sich aufrichten und die Glieder benutzen. Ebenso kann ein Hühnchen noch Tage lang beim Erlöschen des Lebens ruhig am Boden liegen, ohne sich zu bewegen, aber die Atmung geht noch weiter. Dadurch zieht sich die Lebensdauer lange hin — in einem Fall bis zum 12. Tage.

Der Gewichtsverlust ist der gleiche wie bei den steril gezüchteten Hühnchen: er beträgt bei Tieren von 40—45 g Anfangsgewicht 10—15 g, so daß ein Endgewicht von 30—35 g beobachtet wird. Daß die Wasseraufnahme bei dem Gewicht eine wesentliche Rolle spielt, habe ich nicht konstatieren können

und ich muß demnach meine früher ausgesprochene Vermutung, daß es sich bei der anfänglichen Gewichtszunahme steril gezüchteter Hühnchen um eine Wasserzunahme der Körpergewebe handle, wie bei hungernden Hunden, berichtigen und die Erklärung dieser Thatsache auf eine später zu besprechende Ursache zurückführen.

Im ganzen wird man die verschiedene Lebensdauer sonst gleich gehaltener Hühnchen auf die leider nicht meßbare Größe der individuellen angeborenen Lebensenergie zurückführen müssen; auch sind einzelne Rassen oder Stämme lebhafter, beweglicher veranlagt und konsumieren daher ihre Lebenskraft schneller als andere. Dabei stehen sich die ersteren im Ernstfall, d. h. wenn in der freien Natur die entsprechenden Bedingungen eintreten sollten, bezüglich der Erhaltung ihrer Existenz nicht schlechter als die trägeren, denn sie würden ohne Zweifel die fernliegende oder schwer auffindbare Nahrung eher finden und sich vor dem Hungertode sicherer retten können, als die langsameren; während letztere wiederum den Vorteil haben, daß die Bedingungen an Ort und Stelle sich ändern können, und daß ihnen, wenn auch erst später, so doch noch zeitig genug die Existenzmittel zur Erhaltung des Lebens geboten werden. So gleichen sich die individuellen und die Stammesunterschiede auch hier einander aus und ergänzen sich, wenn es sich um die Erhaltung der Art handelt.

Um den bei den Züchtungsversuchen im Jahre 1898 mehrfach hervorgetretenen Mangel an fertig bebrüteten Eiern zu vermeiden, war der Brutapparat auf das Doppelte vergrößert, so daß statt 80—100 Eier jetzt 180—200 Stück gleichzeitig angebrütet werden können. Diese Stückzahl ist nicht zu groß, wenn man bedenkt, daß die Eier immer serienweise zum Züchtungsversuch kommen und daß bei einem völligen Mißlingen einer Versuchsreihe — durch Infektion des Zuchtkäfigs — thunlichst bald eine neue Eier-Serie voll angebrütet zur Stelle sein muß, damit die wenigen Monate, in denen man diese Versuche anstellen kann, möglichst ausgenutzt werden. Dabei ist dann noch zu berücksichtigen, daß immer einige Tage verstreichen, bevor

der Verdacht einer Infektion des Zuchtkäfigs bakteriologisch sicher gestellt werden kann, und daß dann die gründliche Desinfektion, Reinigung und Prüfung des Zuchtkäfigs wiederum einige Tage in Anspruch nimmt. Außerdem muß man mit der Neubeschickung des Zuchtkäfigs mit voll bebrüteten Eiern natürlich auch darauf gerichtet sein, daß das Experiment gelingt, und daß die sterilen Hühnchen mehrere Wochen lang am Leben bleiben. Dadurch fällt dann die Benutzung mancher zum Versuch vorbereiteten Eierserien aus, und der Hühnerhof bevölkert sich gewaltig, während — wie die untenstehenden Tabellen zeigen — kaum ein Dutzend sterile Hühnchen dabei herausgekommen sind.

Rechnet man dazu noch die Verluste, welche durch unfruchtete Eier sich ergeben und die Abgänge, welche dabei entstehen, daß durch die unvermeidliche mechanische Erschütterung beim Desinfizieren der Schale das Hühnchen im Ei abstirbt, so folgt daraus, daß man ständig mehrere hundert Eier in der Brutperiode haben muß, wenn man diese Versuche erfolgreich durchführen will.

Nun tritt aber nicht selten noch ein anderer übler Zufall beim Ausschlüpfen der Hühnchen im Zuchtkäfig ein, den die Natur beim Ausschlüpfen unter den Flügeln der Henne vermeidet. In letzterem Fall kommt es nur selten oder gar nicht vor, daß ein voll ausgebrütetes lebendiges Hühnchen noch während der Geburt, d. h. während des Ausschlüpfens aus der Schale abstirbt. Aber im Zuchtkäfig ist die Luft trockener, als unter den Flügeln der Henne, und so kommt es, daß nicht so selten die Federn des ausschlüpfenden Hühnchens, welches die Schale bereits angepickt und durchbrochen hat, an den Schalen festkleben und antrocknen, so daß das Hühnchen nicht herauskann; dann können sich die Lungen nicht ausdehnen, das Hühnchen kann gar nicht, oder nur ungenügend atmen und erstickt nach kurzer Zeit, nach etwa 6—12 Stunden. — Helfen kann man dabei nur ganz selten, denn wenn man wirklich das Risiko übernimmt und den Zuchtkäfig noch einmal öffnet, so kann man ja versuchen, mit Pinzette und Schere die Eierschale

sehr vorsichtig zu lösen; dabei kommt es aber fast immer zu kleinen Blutungen, die das zappelnde Hühnchen noch weiter verkleben, und wenn man die Schale energisch zerbricht, so reißt mit den angeklebten Federn die Haut ein, dann ist das Hühnchen verletzt und zum Experiment untauglich. — Bei diesem Vorgang wird vorausgesetzt, daß das Anpicken an dem nach oben liegenden Teile des Eies stattfand; wenn dies aber nach unten zu geschehen ist, dann bleibt das ganze Vorkommnis unentdeckt, bis man beim Herausnehmen der nicht geschlüpften Eier den Schaden sieht. So beeinträchtigt auch dieser Umstand die Zahl der sterilen Tiere und vergrößert das Verlustkonto.

Das alles sind aber Hindernisse, welche sich überwinden lassen, und wenn man die Klippen einmal kennt, die man zu vermeiden hat, so lassen sich mit der nötigen Geduld auch diese Versuche erfolgreich durchführen.

Im Jahre 1899 gelang die sterile Züchtung im ganzen in drei Versuchsreihen: einmal vom 28. März bis 10. April, dann vom 16. April bis 15. Mai und endlich vom 25. Mai bis 19. Juni; in den ersten beiden Serien wurden je zwei, in der letzten ein Hühnchen steril durchgebracht und sämtliche Tiere wurden bis zum spontan eingetretenen Tode beobachtet. Die Lebensdauer der einzelnen Hühnchen schwankte von 11 bis zu 29 Tagen und der Gewichtsverlust betrug bis zu 36% des Körpergewichtes, während der Gewinn an Körpergewicht bei den Kontrolltieren bis zu 154% stieg.

Bezüglich der allgemeinen Anordnung der Versuche und der angewandten speciellen bakteriologischen Kautelen verweise ich auf meinen früheren Bericht im 34. Band d. Arch. Die dort angegebenen Vorsichtsmaßregeln wurden in den folgenden Jahren in verschärftem Maße angewendet, namentlich wurden die bakteriologischen Kontrollen der Dejektionen, der Nahrung, des Wassers und der Luft zu Beginn und am Schluß des Versuches, sowie mehrfach während der Versuche gründlich durchgeführt. Außerdem wurden nun auch die Schalen der steril ausgeschlüpften Hühnchen nicht nur gewogen, sondern in toto in Nährgelatine eingeschmolzen, um jederzeit den Nachweis der Keimfreiheit

erbringen zu können. Diese Schalen bewirkten auch nach Monaten keine Schwärzung der Gelatine — eine Erscheinung, auf welche ich mich weiter unten zu beziehen habe — und dürfen demnach nicht nur für bakterienfrei, sondern auch als sublimatfrei angesprochen werden.

Sämtliche steril gezüchteten Hühnchen wurden in diesem, sowie in den folgenden beiden Jahren bis zum spontan eingetretenen Tode beobachtet und erst dann in Gelatine eingelegt. Bei einigen habe ich mit dem Einschmelzen nach spontan eingetretenem Tode noch mehrere Tage gewartet, um eventuelle postmortale Veränderungen des Körpers beobachten zu können. Wie zu erwarten war, tritt nur ein allmähliches Eintrocknen und schließlich eine Mumifikation ein, ohne daß sich Zersetzungs Vorgänge einstellen. Solche Hühnchen konnten natürlich nicht als Beweismaterial für Gewichtsverluste gegenüber den Kontrollhühnchen verwendet werden und deshalb haben wir dieses Experiment auch nicht öfters wiederholt, sondern haben die Tiere immer eingelegt, sobald der Tod sicher konstatiert werden konnte. Das ist ohne weiteres nicht immer durch den Augenschein leicht zu erkennen, denn die verendenden Hühnchen liegen zuweilen noch ein bis zwei Tage unbeweglich, wie tot da, und zeigen eine bis zum äußersten Minimum reduzierte Atmung und Herzthätigkeit, welche von außen durch die Glaswände des Verschlages nur mittels eines guten Feldstechers erkannt werden kann. Das Verhalten der steril gezüchteten Hühnchen während ihrer Lebenstage bietet mancherlei Interessantes. Wie ich in meiner ersten Mitteilung bereits bemerkt hatte, war ich anfangs der Meinung, man müsse — etwa durch eine Glaswand von den sterilen Hühnchen getrennt — eine Henne mit einigen gleichalterigen Hühnchen einstellen, damit die mutterlosen Tiere durch Imitationstrieb das Aufsuchen und Fressen der Nahrung und des Wassers lernen könnten. Das ist aber durchaus nicht notwendig, sondern nachdem das ausgeschlüpfte Hühnchen sich, meist am zweiten Tage, auf die Füße stellen kann, taumelt es noch einige Zeit unsicher hin und her, fällt wieder nieder und ruht stundenlang aus; dann aber steht und läuft es sicher

auf den Beinen und beginnt sofort mit dem Schnabel am Boden zu picken und von dort kleinkörnige Gegenstände aufzunehmen. Das Bodenmaterial besteht — wie früher beschrieben — aus gewaschenem kleinkörnigen Kies, gemischt mit der für junge Hühnchen geeigneten Nahrung: gequollene Hirsekörner, gehacktes hartgekochtes Eiweiß und zerstoßene Eierschalen. Man kann nun beobachten und auch durch die Untersuchung der Dejektionen feststellen, daß die Tierchen sehr bald die verschiedenen Körner zu unterscheiden wissen, nur wenige Steinchen aufnehmen und sich an die Nahrungsmittel halten. Ebenso finden sie das Wasser und vermeiden es, hineinzufallen. In den allerersten Tagen kommt es wohl einmal vor, daß ein Hühnchen mit den noch ungeschickten Beinbewegungen über den Rand des Wasserbehälters stolpert und in das flache, etwa 1 cm hoch mit Wasser gefüllte Becken hineinfällt; aber sofort erhebt es sich und stolpert oder wälzt sich wieder über den Rand aufs Trockene. Die instinktive Selbständigkeit dieser Tiere ist eine ganz eminente!

Eine andere, ebenfalls sehr interessante Erscheinung drückt sich darin aus, daß die steril gehaltenen Hühnchen ständig Hunger haben und eigentlich fortwährend fressen — und verdauen bzw. Dejektionen absetzen. Das findet bei den sterilen Hühnchen in ungleich höherem Maße statt als bei den normal ernährten Tieren. Auch bei letzteren ist ja — wie man sich auf jedem Hühnerhofe überzeugen kann — der Darmkanal von einer beneidenswerten Leistungsfähigkeit! Aber diese steril gezüchteten Tierchen übertreffen in der Fresslust und in der Ausscheidung des Darminhaltes die normal genährten Kontrolltiere um das Vielfache.

Die steril gehaltenen sind auch viel unruhiger; sie jagen eben fortwährend nach Nahrung umher. Wenn eines ein Stückchen Eierschale oder sonst ein Körnchen ergriffen hat, welches es nicht gleich hinunterschlucken kann, so suchen die andern es ihm mit allen Mitteln abzujagen; dann schlingt es das erste mit Mühe hinunter und alle fallen aufs neue über die auf dem Boden verstreute sterile Nahrung her.

Und trotz dieses fortwährenden Fressens und trotz des Verdauens durch die Körpersäfte wachsen die Tiere nicht, sondern nehmen ständig ab an Körpergewicht und an Kräften!

Als Ergebnis der Versuche aus dem Jahre 1899 haben wir also fünf steril gezüchtete und spontan verendete Hühnchen zu verzeichnen, von denen dasjenige, welches am längsten lebte, ein Alter von 29 Tagen — vom 16. April bis 15. Mai — erreichte. Dieses Hühnchen wog beim Ausschlüpfen 51 g und tot 36 g, hatte also 15 g oder über 29% seines Körpergewichtes während der 29 Lebenstage eingebüßt. Das entsprechende Kontrollhühnchen hatte inzwischen um 77 g oder um etwa 154% seines Körpergewichtes zugenommen. Die übrigen Versuchstiere dieses Jahrganges verhielten sich bezüglich ihres Gewichtsverlustes bzw. der Gewichtszunahme etwa proportional der Lebensdauer und dem Anfangsgewicht — wie aus der unten stehenden Tabelle ersichtlich ist —, nur das Hühnchen Nr. 5 zeigte bei einer Lebensdauer von 25 Tagen einen noch größeren Gewichtsverlust als das oben erwähnte 29 Tage alte Tier, nämlich 18 g oder 36% seines Körpergewichtes; während das entsprechende Kontrollhühnchen um 100% seines Körpergewichtes zugenommen hatte.

Im Jahre 1900 erzielten wir keine besonders guten Resultate, weil ich von meiner Studienreise nach Bombay erst Anfang Mai zurückkehrte und die Brutperiode daher nicht vollständig ausgenutzt werden konnte. Außerdem hatten wir noch ein besonderes Mißgeschick insofern, als bei einem der Versuche, bei welchem, wie gewöhnlich, sechs bis zum 19. Tage im Brutapparat vorgebrütete Eier in den Zuchtkäfig eingelegt waren — alle sechs Hühnchen zum Ausschlüpfen kamen und nach einigen Tagen munter im Käfig umhersprangen. Da ich den $\frac{1}{3}$ Quadratmeter Bodenfläche umfassenden Zuchtkäfig für zu klein hielt, um gleichzeitig sechs Hühnchen die nötige Bewegungsfreiheit zu bieten (bei allen übrigen Versuchen waren durchschnittlich zwei, höchstens drei Hühnchen von sechs Eiern ausgeschlüpft), so entschloß ich mich am sechsten Tage, den Trupp zu teilen und drei Stück in einen inzwischen konstruirten und natürlich gründlichst sterili-

Extra-Käfig einzusperren. Bei dieser Prozedur mußte der große Glasverschlag mehrere Male geöffnet und betreten werden, Nahrung und Wasser mußten für die abgetrennten Hühnchen frisch sterilisiert und kontrolliert werden, dann wieder die Kontrolle der Dejektionen, abgestoßenen Federn etc. vorgenommen werden, — kurzum, eines Tages zeigten sich sämtliche Kontrollproben durch einen schleimbildenden Schimmelpilz verunreinigt und alle sechs Hühnchen waren für unseren Versuch verloren.

Immerhin hatten wir auch im Jahre 1900 drei steril gezüchtete Hühnchen bis zum spontanen Tod durchgebracht, von denen das älteste 30 Tage lang lebte und während dieser Zeit 17 g oder etwa 32% seines Körpergewichtes einbüßte, während das Kontrollhühnchen 62 g oder 117% gewonnen hatte.

Die für das Jahr 1900 gestellte Aufgabe war eigentlich die gewesen, daß nunmehr nach jeweiliger Feststellung der Sterilität der Versuchstiere mit der Verfütterung bestimmter Bakterienarten begonnen werden sollte, aber wegen der üblen Zwischenfälle und Ablauf der Brutperiode mußte die Inangriffnahme dieser Aufgabe auf das Jahr 1901 verschoben werden¹⁾.

Im Frühjahr dieses Jahres sollten nunmehr also die Versuche beginnen zur Entscheidung der Frage: ob die Verfütterung von Darmbakterien an steril gezüchtete Hühnchen einen Einfluß auf deren Ernährung ausübt, bezw. deren Lebensdauer verlängert oder nicht.

Zu diesem Zwecke wurde der sterile Zuchtkäfig, in welchem die sterilisierten Eier zum Ausschlüpfen gelangen, durch eine vertikal gerichtete bewegliche Glastafel in zwei Hälften geteilt, und zwar so, daß durch Einschieben der Glastafel zwischen zwei etwa 3 cm hohe Schienen der Zuchtkäfig in zwei vollständig getrennte Räume zerfällt. Der bakteriensichere Abschluß der beiden Räume untereinander macht gewisse Schwierigkeiten, da

1) Im September 1900 hatte ich die Freude, die bisher gewonnenen Präparate, welche früher schon der naturforschenden Gesellschaft in Freiburg vorgelegt waren, einer Anzahl von Professoren der Hygiene vorzeigen zu können, welche auf dem Wege zu den Versammlungen in Trier und Aachen das hygienische Institut in Freiburg besuchten.

die Hühnchen jedes Packungsmaterial, an welches sie gelangen können, anpicken und herauszupfen. Baumwolle oder Asbest läßt sich daher nicht verwenden. Wir haben uns schliesslich so geholfen, daß die auf Boden, Rückwand und Decke aufgelöteten Blehschienen, zwischen denen die Glastafel später eingeschoben werden soll, an ihrem freien Rand umbogen und federnd gegen einander gedrückt wurden. Den Raum unterhalb des federnden Randes (welcher seiner Zeit der Glastafel fest anliegt) kann man dann mit Asbestwolle verstopfen, ohne daß die Hühnchen daran kommen können. Die vordere Wand des Zuchtkäfigs muß natürlich ebenfalls vorher zweigeteilt werden: ihre beiden, in Metallrahmen aufrecht stehenden Hälften sind in der Mittellinie des Käfigs um die Dicke der Glaswand voneinander entfernt; der so entstehende Schlitz wird also durch die eingesetzte Glastafel ausgefüllt, welche später — ganz hineingeschoben — die Trennungswand bilden soll. Die ganze Einrichtung funktioniert ähnlich wie der lichtdichte Abschluss der photographischen Doppelkassetten während der Exposition der Platte. Und wenn dort der Schiebdeckel wieder vor die Platte eingeschoben ist, so entsteht für unsern Fall durch das Einschieben der Glastafel die Zweiteilung des Zuchtkäfigs.

Ich verfolgte bei dieser Anordnung den Zweck, die steril ausgeschlüpften Hühnchen zunächst gemeinsam längere Zeit steril zu züchten. Am 12. bis 15. Tage, wenn die Tiere sichtbar abmatten, mager und schwach werden, dann wollte ich die trennende Glaswand einschieben und nun die oder das Hühnchen der einen Seite mit Bakterien versorgen, das der andern Seite aber sollte als Kontrolle spontan verenden. Zu diesem Zwecke mußten natürlich schon vorher beide Abteilungen, jede für sich, mit den entsprechenden Ventilationsöffnungen versehen sein, in jeder Abteilung mußte ein eigener Wasserbehälter aufgestellt und ein Futterplatz eingerichtet werden, sowie auch für Anbringung des Thermometers gesorgt sein.

Die Prüfung dieser Einrichtungen, welche ja schon im Verlauf des Winters vorbereitet waren, konnte natürlich nur durch den praktischen Versuch geschehen und bis die anfänglichen

Miſerfolge uns die Anbringung der einzelnen Verbesserungen des Apparates gelehrt hatte, war wiederum die Hälfte der Brutzeit verstrichen, so daß erst der am 3. Mai begonnene Versuch für die Beantwortung der aufgestellten Frage verwertet werden konnte.

Am 3. Mai 1901 schlüpften vier sterile Hühnchen aus und verhielten sich in den nächsten Tagen so, wie das schon vielfach beobachtet wurde. Von diesen vier Hühnchen waren allerdings zwei besonders schwach, so daß wir uns entschlossen, schon nach 8 Tagen die trennende Glaswand einzuschieben, indem wir dafür sorgten, daß in jede der beiden Abteilungen ein starkes und ein schwaches Hühnchen eingesperrt wurde.

Um zunächst einen prinzipiellen brauchbaren Versuch vorzuschicken, hatte ich die frisch deponierte Dejektion eines im Freien lebenden ausgewachsenen Huhnes in etwa 20 g Nährbouillon aufgeschwemmt und goß nun diese trübe Flüssigkeit über den Boden der einen Käfighälfte aus, so daß der Kies und die dazwischen liegenden Hirsekörner und auch der größere Vorratshaufen der sterilen Nahrung, welcher in der hinteren Ecke des Käfigs aufgeschüttet ist, mit den frisch aufgeschwemmten Darmbakterien des Huhnes infiziert wurde; die letzten Tropfen der Aufschwemmung wurden dann noch dem Wasser zugefügt und nun der Versuch sich selbst überlassen. Die Hühnchen fraßen in beiden Abteilungen des Zuchtkäfigs wie vorher und zeigten auch am folgenden Tage, den 12. Mai, keinerlei bemerkenswerte Verschiedenheiten oder Änderungen in ihrem Verhalten, nur das schwache Hühnchen in der sterilen Abteilung war sehr matt und lag schon stundenweise auf dem Boden. Am 13. Mai war dieses Tier tot, wurde nachmittags in Gelatine eingeschmolzen und bei dieser Gelegenheit — da der Glaskasten ohnehin geöffnet werden mußte — konnten auch Kontrollproben aus der sterilen Abteilung zur bakteriologischen Untersuchung entnommen werden: Wasser, Kies, Hirse.

Glücklicherweise bestanden die Proben die Prüfung; bis hierher war also keine Infektion der sterilen Seite des Käfigs von der mit Darmbakterien infizierten eingetreten. — Übrigens

kam das schwache Hühnchen der mit Darmbakterien versorgten Seite auch nicht recht voran; es lebte zwar noch 5 Tage länger als das am 13. eingegangene, dann verendete es aber auch trotz der Darmbakterien. Da es ja infiziert war, wurde es in Alkohol eingelegt, zeigt übrigens keine bemerkenswerten Befunde bezüglich seines Gewichtes oder sonstigen Verhaltens. Dagegen trat der Unterschied in der Entwicklung zwischen den beiden kräftigen Hühnchen — dem sterilen und dem mit Darmbakterien — immer deutlicher hervor. Das letztere wuchs und gedieh zusehends, die Federn wurden glatt und blank, die Bewegungen kräftiger, ruhiger und sicherer, während das sterile Tier fortwährend Nahrung verschlang und auffallenderweise immer an der mittleren Glaswand hin- und herjagte, wie um zu dem anderen Hühnchen zu kommen. Am 20. Mai, dem 16. Lebenstage, wurde das Tier sichtlich matt und ging am 21. Mai zu Grunde; es zeigte einen Gewichtsverlust von 10 g oder etwa $23\frac{1}{2}\%$ seines Körpergewichtes und war übrigens steril.

Das mit Darmbakterien gefütterte Hühnchen bekam nun wieder den ganzen Käfig eingeräumt, wurde noch bis zum 25. Mai beobachtet und dann ins Freie zu den anderen Kontrollhühnern gesetzt, woselbst es sich zu einem kräftigen Tiere inzwischen entwickelt hat. Das Anfangs-Gewicht dieses Tieres hatte 46 g betragen, sein Gewicht am Ende des Versuchs, ehe es ins Freie gebracht wurde, betrug 52 g. Das Hühnchen hatte also immerhin in den 14 Tagen seiner Bakterien-Ernährung um soviel gewonnen, daß es den Verlust der achttägigen sterilen Fütterung gedeckt und noch um 6 g Körpergewicht zugenommen hatte.

Die beiden auf Tabelle II zu den am 13. und am 21. Mai eingegangenen sterilen Hühnchen vermerkten Kontrollhühnchen sind nicht diese beiden vorstehend beschriebenen im Zuchtkäfig mit Darmbakterien behandelten Tiere, sondern das sind die stets bei den Versuchen gleichzeitig frei gezüchteten Kontrollhühnchen.

Auf den Tabellen konnten die beiden ersten Darmbakterien-Hühnchen, und damit auch deren Kontrollhühnchen nicht eingetragen werden, da erstere nicht in die Rubrik »steril«

gehören. — Der berichtete Versuch wurde am 25. Mai abgebrochen und das Hühnchen ins Freie gebracht, weil ich nicht eines einzigen, ohnehin bereits ausgenutzten Tieres wegen den ganzen Apparat besetzt lassen wollte.

Zu Ende Mai hatten wir nämlich wieder das Ausschlüpfen einer Serie angebrüteter Eier zu erwarten und mußten die verbleibenden sechs Tage benutzen, um den Glasverschlag und den Zuchtkäfig zu reinigen, zu desinfizieren, die frischen sterilen Materialien hineinzubringen und Alles auf Keimfreiheit bakteriologisch zu prüfen.

Das war am 30. Mai fertig, die neuen Eier wurden sterilisiert, acht Stück in den Zuchtkäfig eingelegt und am 31. Mai schlüpften wiederum vier Hühnchen aus. Von den übrigen vier Eiern kamen zwei überhaupt nicht zum Schlüpfen — die Hühnchen waren durch die Manipulationen beim Desinfizieren der Eier abgestorben, bzw. so geschädigt, daß sie nicht mehr schlüpfen konnten — und die anderen beiden Hühnchen blieben im Ausschlüpfen stecken: eines lag, wie wir später sahen, mit dem Kopf nach unten und das andere konnte sich nicht von der Schale befreien. In der Natur hilft in solchen Fällen die Henne nach; aus den oben angeführten Gründen ist aber für unsere Versuche die Anwendung künstlicher Hilfsmittel nicht zu empfehlen.

Schon im zeitigen Frühjahr d. Js. hatte ich Herrn Dr. Ragner, zweiten Assistenten am Hygienischen Institut, beauftragt, die bereits früher von Dr. O. Korn angestellten bakteriologischen Untersuchungen normaler Hühnerdejektionen weiter fortzusetzen und zu spezifizieren. Die Arbeit ist inzwischen im Centralblatt für Bakteriologie veröffentlicht und hat ergeben, daß unter den bei jungen Hühnchen zuerst auftretenden Darmbakterien am massenhaftesten ein zur Gruppe des *Bacter. coli* gehöriger Spaltpilz auftritt, welcher auch in Dejektionen ausgewachsener Hühner niemals fehlt und hier im selben Verhältnis und unter gleichen Bedingungen vorkommt wie der *Bacillus coli comm.* des Menschen. Ja, dieser *bacillus coli gallinarum* ist dem *bacillus coli hominis* so ähnlich, daß unter entsprechend geänderten Züchtungsbedingungen gewiß eine absolute Identität beider Rassen zu

erzielen wäre. Frische, drei Tage alte Reinkulturen unseres bacillus coli gallinarum wurden stets vorrätig gehalten, und als die am 31. Mai ausgeschlüpften Hühnchen am 6. Juni noch bei guten Kräften waren — ich wollte nämlich nicht zum zweiten Male bis zur äußersten Kraftgrenze warten — wurde die Trennungswand eingeschoben, so daß je zwei der Hühnchen in jeder der beiden Abteilungen sich befanden. Gleichzeitig wurde dann die Bouillon-Aufschwemmung einer dreitägigen Agarkultur des bacillus coli gallinarum wiederum über die ganze Bodenfläche der einen Käfig-Abteilung ausgegossen, nachdem vorher noch einmal Kontrollproben von Wasser, Kies und Kot entnommen waren, welche die bestehende Keimfreiheit des Käfigs ergaben. So war der Versuch eingeleitet.

Am 7. und 8. Juni waren keinerlei Unterschiede oder Veränderungen der vier Hühnchen zu bemerken. Am 9. wurde eines der beiden sterilen Hühnchen sichtlich schwach und ging am 11. ein. Da inzwischen auch das andere sterile Hühnchen sich gelegt hatte und voraussichtlich bald verenden würde, so wurde der Glaskasten des einen toten Hühnchens wegen nicht geöffnet, sondern erst am 12. nachmittags, als auch bei dem zweiten sterilen Hühnchen der Tod eingetreten war, wurden beide gleichzeitig in Gelatine eingeschmolzen und blieben — wie die vorliegenden Präparate zeigen — steril.

Das zu dem am 11. Juni abgestorbenen Tiere gehörige Kontrollhühnchen wurde übrigens bereits ebenfalls am 11. getötet und nach Bestimmung des Gewichts in Alkohol eingelegt.

Die beiden mit Bacterium coli gallinarum gefütterten Hühnchen befanden sich inzwischen wohl und munter und wuchsen nach weiteren acht Tagen zusehends. Leider wurden diese beiden Hühnchen später infolge eines Mißverständnisses ins Freie gesetzt, wie bei dem vorhergehenden Versuch mit aufgeschwemmter Hühnerdejektion. Richtig wäre es natürlich gewesen, die Tiere bakteriologisch daraufhin zu prüfen, ob nur das Bacter. coli gallinarum im Darm vorhanden war und zur weiteren Kontrolle die beiden Hühnchen dann in Alkohol einzulegen

Aber es sollte noch eine weitere Serie bebrüteter Eier Ende Juni zum Ausschlüpfen kommen; der Apparat mußte also wieder frisch desinfiziert und vorbereitet werden und dabei ist dann das Malheur passiert, daß die beiden Coli-Hühnchen, welche nun völlig den im Freien aufgewachsenen gleichkamen, herausgenommen und in den Hühnerhof eingesetzt wurden.

Zudem mißlang dann noch der letzte Züchtungsversuch vollständig: drei Hühnchen waren am 30. Juni ausgeschlüpft, aber die bakteriologische Kontrolle, welche beim Ausspritzen der Bact. coli-Kultur am 5. Juli vorgenommen wurde, ergab, daß ein Schimmelpilz und die gelbe Sarcine sich angesiedelt hatten, so daß die weitere Fortsetzung des Versuchs zwecklos war und damit für dieses Jahr die Versuchsreihe überhaupt abgeschlossen werden mußte.

(Siehe Tabelle I und II.)

Ein Rückblick auf die mitgeteilten Beobachtungen zeigt nun zunächst, daß trotz mancher Verbesserungen in der Anordnung der Versuche gegenüber den früheren Züchtungen noch immer technische Schwierigkeiten zu überwinden sind, um ein unanfechtbar reines Versuchs-Ergebnis zu liefern.

Tabelle I.
Steril gezüchtete Hühnchen.

Nr.	Jahr	Monat	Tag	Tod am	Tage alt	Anf- Gew.	End- Gew.	Ver- lust
						g	g	g
1	1899	März	28	8. April	11	46	31	15
2	1899	„	28	10. April	13	45	31	14
3	1899	April	16	7. Mai	21	48	38	10
4	1899	„	16	15. Mai	29	51	36	15
5	1899	Mai	25	19. Juni	25	50	32	18
6	1900	Mai	18	30. Mai	12	46	31	15
7	1900	„	18	30. Mai	12	45	32	13
8	1900	„	18	17. Juni	30	53	36	17
9	1901	Mai	3	13. Mai	10	46	36	10
10	1901	„	3	21. Mai	18	43	33	10
11	1901	„	31	11. Juni	10	40	32	8
12	1901	„	31	12. Juni	11	42	32	10

Tabelle II.
Normal ernährte Kontroll-Hühnchen.

Nr.	Jahr	Monat	Tag	Getötet	Tage alt	Anf.- Gew.	End- Gew.	Ge- winn
1	1899	März	28	8. April	11	g 47	g 54	g 7
2	1899	„	28	10. April	13	46	56	10
3	1899	April	16	7. Mai	21	49	118	69
4	1899	„	16	15. Mai	29	51	128	77
5	1899	Mai	25	19. Juni	25	49	98	49
6	1900	Mai	18	30. Mai	12	47	54	7
7	1900	„	18	30. Mai	12	46	54	8
8	1900	„	18	17. Juni	30	53	115	62
9	1901	Mai	3	13. Mai	10	48	54	6
10	1901	„	3	21. Mai	18	45	56	11
11	1901	„	31	11. Juni	10	39	43	4
12	1901	„	31	12. Juni	11	45	53	8

So lehrt ein Blick auf die tabellarische Übersicht der sterilen Hühnchen (Tafel I), daß sehr erhebliche Schwankungen im Gewichtsverlust bestehen, welche weder zu dem Anfangsgewicht der Hühnchen, noch zu der Lebensdauer in einer einigermaßen gesetzmäßigen Proportion stehen. Es wurde schon eingangs darauf hingewiesen, daß hier die angeborene »Lebensenergie« — ein leider unmeßbarer Faktor — gewiß eine wesentliche Rolle spielt, aber fast ist es noch bedauerlicher, daß ein viel platterer Faktor für das Endgewicht der Hühnchen sehr maßgebend ist: der nämlich, ob das Tier mit vollem oder mit leerem Kropf verendet. Stopft sich das Hühnchen vor dem Eingehen den Kropf noch einmal tüchtig voll, so kann es um 5 und mehr Gramm schwerer werden als ein gleiches Tier, das die Kraft verloren hatte, sein stets vorhandenes Hungergefühl kurz vor dem Tode noch einmal durch Füllung des Kropfes scheinbar zu befriedigen. Man könnte ja vielleicht vor dem Einlegen in Gelatine den Kropf aufschneiden und entleeren — eine immerhin mißliche Operation, wenn es sich um die Sorge handelt, das Tier möglichst schnell steril zu konservieren — jedenfalls ist das bis jetzt noch nicht geschehen, und so sehen wir in unseren Präparaten manche Tiere mit mehr oder weniger schlankem Hals

und andere mit dick gefülltem Kropf, und in den Tabellen figuriert der unverdaute Inhalt des Kropfes als Gewichtsgröße des Tierkörpers.

Darin liegt also noch ein Beobachtungsfehler, welcher überwunden werden muß.

Eine weitere Ungenauigkeit ergibt sich daraus, daß die im Freien normal ernährten Kontrollhühnchen sich nicht ganz so in ihrer Entwicklung verhalten wie die Hühnchen, welche durch eine Henne natürlich ausgebrütet sind und in den ersten Wochen durch die Henne beschützt werden. In letzterem Falle finden die Hühnchen nämlich auch während des Tages stundenlang Ruhe und gleichmäßige feuchte Lebenswärme unter den schützenden Flügeln der Henne, sparen dadurch an Kraft- und Wärmeverlust und werden für die Verwertung neuer Nahrungsaufnahmen besser vorbereitet. Die künstlich ausgebrüteten Hühnchen dagegen sind auch bei sorgsamster Pflege viel unruhiger, laufen und springen eigentlich fortwährend im ganzen Hühnerhof umher und entwickeln sich daher nicht so schnell, bzw. sie nehmen an Gewicht nicht so rasch zu, wie die Hühnchen unter der Henne. Fremde Hühnchen, die künstlich ausgebrütet sind, nimmt übrigens eine Henne nicht leicht an, sondern hackt im Gegenteil auf dieselben ein und verjagt sie von dem eigenen Schwarm. Nun trifft dieser Faktor zwar beide für unsere Versuche in Frage kommenden Gruppen: sowohl die steril gezüchteten als auch die normal ernährten Hühnchen und trübt daher nicht das relative Versuchsergebnis; immerhin entsprechen aber die auf der Kontroll-Tabelle (Tafel II) als Gewinn eingeschriebenen Zahlen nicht völlig den natürlichen Werten, sondern sind **geringer** als diese.

Um bei ferneren Versuchen bessere Brutergebnisse zu erzielen, würde ich es auch empfehlen, mindestens neben dem künstlichen Brutapparat mehrere Puterhennen mit Hühnereiern unterlegen zu lassen. Ein solches Tier ist ein äußerst sicher funktionierender Brutapparat und brütet 30 Hühnereier gleichzeitig aus. Der künstliche Brutapparat erfordert eine ständige, sehr mühevollere Kontrolle, bei dem täglich notwendigen Umlegen

der Eier treten stets Verluste ein und bei einem Versagen des Apparates steht unter Umständen die ganze 200 Eier betragende Einlage auf dem Spiele.

Schließlich würde ich empfehlen, statt der bei den letzten Versuchen beschriebenen verschiebbaren Trennungswand, welche den Brutkäfig in eine sterile und in eine für Bakterienfütterung bestimmte Hälfte teilt, lieber zwei Brutkäfige einzustellen und in jedem die sterilen Eier getrennt ausbrüten zu lassen. Die bakteriensichere Abtrennung der beiden Hälften ist sehr mislich; wir wären gewiss schon in diesem Jahre weiter gekommen mit den Versuchen über Bakterienfütterung, wenn wir nicht diese häufigen Reparaturen an dem Verschluss der Trennungswand gehabt hätten.

Aus allen diesen Mifsständen und noch bestehenden Ungenauigkeiten kann man Einwände herleiten und die Beseitigung der Fehlerquellen fordern, aber man kann an der Richtigkeit des Prinzips nicht mehr zweifeln: dafs für die Ernährung der Tiere — speziell der warmblütigen Wirbeltiere — die Thätigkeit der Darmbakterien notwendig ist.

Dafür sprechen nicht nur allgemein wissenschaftliche Überlegungen, sondern vor allem die vorliegenden Ergebnisse der Züchtungsversuche steriler Hühnchen und damit stimmen auch alle bisher erzielten Versuchsergebnisse anderer Untersucher¹⁾

1) Levin, welcher Gelegenheit hatte, die Natthorstsche Expedition im Sommer 1898 zu begleiten, hat die Behauptung aufgestellt — *Annales de l'Institut Pasteur* Bd. XIII —, dafs in den arktischen Zonen der Darminhalt der meisten warmblütigen Tiere absolut bakterienfrei sei. Dem gegenüber mufs doch daran erinnert werden, dafs sowohl die Vögel, als auch die Säugetiere der Polargegenden nur zeitweise in den Eisregionen sich aufhalten, übrigens aber Wandertiere sind und ihrer Nahrung nachziehen. Diese besteht — soweit die Tiere nicht untereinander sich auffressen — aus höheren Wassertieren: Fischen, Crustaceen etc., welche ihrerseits wiederum auf die in den wärmeren Meeresströmungen heimischen Lebewesen angewiesen sind, letztere sind aber — wie aus zahlreichen Untersuchungen, namentlich aus denen von Nordenskiöld und Nansen hervorgeht — durchaus nicht bakterienfrei, sondern enthalten niedere Organismen der verschiedensten Art in grosser Menge.

Wenn schon aus diesen Gründen der Darminhalt der arktischen Tiere nicht bakterienfrei sein kann, so stimmen damit auch die positiven Befunde

überein, selbst die von Nuttall-Thierfelder, wie ich das in meiner früheren Mitteilung nachgewiesen habe.

Neuerdings hat M^{me} O. Metschnikoff¹⁾ die mühevollste Züchtung steril aus dem Ei entwickelter Froschlarven bis zum 63. Tage erfolgreich durchgeführt. Das Resultat war, daß die steril mit Brot ernährten Larven am Ende des Versuchs ein Gewicht von durchschnittlich 25 mg und eine Länge von 15,5 mm erreicht hatten, während die nicht steril, übrigens aber ganz gleich gehaltenen Kontrolllarven ein Durchschnittsgewicht von 142 mg und eine Länge von 26,5 mm aufwiesen.

Daraus zieht M^{me} O. Metschnikoff unter Hinweis auf eine weitere Fortführung der Experimente mit Recht den Schluss, daß die Bakterien für das Leben und für das Wachstum der Froschlarven notwendig sind. Die Ergebnisse meiner Versuche über die sterile Züchtung von Hühnchen haben gezeigt, daß das gleiche Gesetz auch für die Entwicklung der Hühner gültig ist. Gewisse Zweifel an die Beweiskraft meiner früheren Versuche, welche M^{me} O. Metschnikoff darin erblickt, daß die Desinfizierung der bebrüteten Eier mit Sublimat einen Einfluß auf die Widerstandskraft bzw. auf die Lebenskraft der ausgeschlüpften Hühnchen haben könne, können wohl damit beseitigt werden, daß die Wirkung des Sublimats nach der Tiefe hin örtlich eine sehr begrenzte ist und es ist auch nicht anzunehmen, daß bei einem intensiven Abwaschen der Oberfläche eines Eies die Sublimatwirkung mehrere Millimeter in die Tiefe dringt, ohne wahrnehmbare Veränderungen zu hinterlassen. Außerdem äußert sich das Vorhandensein minimalster Mengen Sublimats an den in Nährgelatine eingelegten sterilen bebrüteten Eiern und Eierschalen stets in Form des Auftretens einer dunklen schwarzbraunen Zone in der Gelatine um das Ei — wohl infolge von

aller übrigen Beobachter überein, so namentlich diejenigen von H. Chauveau, welcher als Teilnehmer der Expedition des Fürsten von Monaco im Jahre 1900 speciell die Levinschen Angaben kontrolliert hat und dabei zu entgegengesetzten Resultaten wie Levin, d. h. ausnahmslos zum Nachweis von Bakterien im Darminhalt von Robben, Füchsen und von zahlreichen arktischen Vogelarten gekommen ist.

1) Annales de l'Institut Pasteur, Bd. XV, p. 631.

Reduktion des Quecksilbers. Solche Kontrolleier und Schalen, welche regelmässig eingelegt wurden, sind aus der ersten Zeit unserer Experimente noch in gröfserer Anzahl vorhanden. Später wurde aber jede Spur von Sublimat an den Eiern durch mehrmaliges Abreiben, Abbürsten und Abspülen mit Kochsalzlösung und Abtrocknen mit steriler Watte vollständig ausgeschlossen. In den letzten Jahren haben wir aufserdem die mit Sublimat desinfizierten Eier mit Schwefelleber behandelt und dadurch auf chemischem Wege das Sublimat zerstört.

Übrigens hätte sich eine Sublimatwirkung natürlich auch bei den Kontrollhühnchen äufsern müssen, deren Eier ganz gleich behandelt wurden wie die der steril gezüchteten. Da diese Tiere aber im ganzen gut gediehen sind, wenigstens an Gewicht normalerweise zugenommen haben, so hat entweder eine nachteilige Wirkung des Sublimats auf die Eier nicht stattgefunden oder, wenn sie stattgefunden hat, so mufs sie sich auf die sterilen und auf die Kontrollhühnchen gleicherweise geäufsert haben und kann also die Schlufsfolgerungen, welche sich aus dem relativen Verhalten der Versuchstiere ergeben, nicht beeinträchtigen.

Gewifs darf man nicht generalisieren und aus den speciellen Ernährungsbedürfnissen einer Species die gleichen Bedingungen für eine andere Art erschliessen wollen, aber darin geht M^{me} O. Metschnikoff doch wohl etwas zu weit, wenn sie die verschiedenen Versuchsergebnisse der Nuttall-Thierfelderschen Versuche an Meerschweinchen und meiner Versuche an Hühnchen aus den verschiedenen bakteriellen Bedürfnissen der beiden verschiedenen Tierspecies erklären will; dazu sind doch die Ernährungsbedingungen der warmblütigen Wirbeltiere einander zu ähnlich als dafs man derartige prinzipielle Verschiedenheiten zwischen der Ernährung von Hühnern und der von Meerschweinchen voraussetzen könnte. Andererseits möchte ich auch nicht in der Generalisierung so weit gehen, und die Ernährung der »Mites« mit denen der höheren »Wirbeltiere« vergleichen. Es sind wohl die Saugmilben, speciell die Zecken gemeint, von denen M^{me} Metschnikoff berichtet, dafs ihnen die niederen Organismen nicht nur nicht schädlich sind, sondern im Gegenteil

zur Nahrung dienen. Letzteres kommt auch bei den höheren Wirbeltieren und beim Menschen vor, sehen wir doch, daß z. B. mit dem Traubenmost dem menschlichen Magen sehr beträchtliche Mengen von Hefepilzen zugeführt werden, die doch gewiß vom Körper verdaut werden und ihm zur Nahrung dienen, wie eine lebendige Auster verdaut und zur Nahrung wird. Alle die ungeheueren Massen von Spaltpilzen, welche der warmblütige tierische Körper eben infolge seiner hohen Temperatur — diesem mächtigen Schutzmittel im Kampf gegen niedere Organismen — abtötet, sie unterliegen doch der Zersetzung durch die Verdauungssäfte und es ist kein Grund dagegen anzuführen, daß das peptonisierte Mykoprotein nicht aufgenommen und im Körper weiter verarbeitet werden sollte.

Welche Bedeutung diese Verarbeitung hat, das läßt sich zur Zeit wohl noch nicht erkennen. Wenn wirklich so viel verschiedene »Stoffe« in den Körpersäften und Geweben kreisen, wie sie mit Namen genannt werden, so werden sich dieselben wohl aus Bezugsquellen ersetzen müssen, unter denen der Darminhalt noch am ehesten in Betracht kommen dürfte. — Übrigens stehen die Ergebnisse meiner Versuche nicht im Gegensatz zu den von Nuttall und Thierfelder veröffentlichten Mitteilungen über die sterile Ernährung von Meerschweinchen, und ich verdanke — wie aus der Anordnung meiner Versuche ersichtlich ist — den Nuttall-Thierfelderschen Experimenten eigentlich die Anregung zu meinen Versuchen. Nur in der Deutung der Versuchsergebnisse hatte ich eine andere Meinung zu vertreten und um dazu eine positive Unterlage zu haben, entschloß ich mich zu dem Versuche, mit Hühnereiern zu arbeiten.

Es scheint mir nach meinen jetzigen Erfahrungen die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die Nuttall-Thierfelderschen Versuche mit gutem Erfolge wieder aufgenommen und weiter fortgesetzt werden können. Zu einer Verwertung für die Ernährungstheorie bzw. für die Bedeutung der Darmbakterien können diese Versuche aber erst dann herangezogen werden, wenn bei den Meerschweinchen an Stelle der Milchernährung die normale Pflanzennahrung dieser Tiere getreten ist.

Die Milch, welche bei den Hühnchen durch das Hühner-eiweiß im Ei ersetzt wird, bildet einen für das Junge bestimmten Teil des mütterlichen Organismus, und das junge Tier steht überhaupt noch nicht auf dem Boden einer eigenen Ernährung, so lange es auf die Funktion des mütterlichen Körpers angewiesen ist, gerade so wenig, wie man beim Hühnchen im Ei von einer selbständigen Ernährung sprechen kann, so lange noch das mütterliche Hühnereiweiß resorbiert wird.

Dann erst kommt die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung in Frage, wenn das Individuum, mag es nun ein Huhn oder ein Meerschweinchen oder sonst ein Tier oder der Mensch sein, unabhängig vom mütterlichen Organismus sich zu erhalten hat. Alle diese so bedeutungsvollen Versuche würden natürlich damit erst einen voll befriedigenden Abschluss erreichen, wenn es gelänge, das Gesetz von der Notwendigkeit der Darmbakterien für die Ernährung auch durch den Versuch am Säugtier zu bestätigen.

Zur Ausführung solcher Versuche am Meerschweinchen müßten aber bedeutende äußere Mittel bereit gestellt werden, über welche das hiesige hygienische Institut zur Zeit jedenfalls nicht verfügt, so werden also vorerst die Versuche mit steril gezüchteten Hühnchen den Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen in dieser Frage bilden müssen.

Zunächst wird es darauf ankommen, den Versuch mit dem *Bacillus coli gallinarum* mehrmals rein durchzuführen; derart, daß Hühnchen in einem thunlichst vorgeschrittenen Wachstumsstadium vorliegen, und ausschließlich den *Bacillus coli gallinarum* enthalten. Der Grad der Entwicklung dieser Hühnchen sollte dann nicht nur mit dem der steril gezüchteten Tiere verglichen werden, sondern namentlich auch mit dem der im Freien aufgewachsenen Kontrollhühnchen. In dieser Weise müssen jedenfalls die wichtigsten der konstant im Hühnerdarm vorkommenden Spaltpilzarten einzeln und kombiniert auf ihre Wirkung geprüft werden. Dazu muß sich die histologische und die chemische Untersuchung der steril gezüchteten und der mit Bakterien gefütterten Tiere gesellen. Sodann bietet gerade das Huhn Ge-

legenheit, eine Reihe pathogener Spaltpilze zu studieren, welche vom Darm aus wirken, so daß vielleicht auch in Bezug auf die Pathologie des Darmrohres aus solchen Versuchen Aufschlüsse erwartet werden können.

Ob und in welcher Weise dann die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die menschliche Pathologie praktisch verwertet werden können, das wird wohl einer ferneren Zukunft vorbehalten bleiben. Ausgeschlossen scheint es aber keineswegs, daß die bessere Kenntnis der normalen biologischen Vorgänge im Innern des Darmrohres dazu führen wird, daß nicht nur die Physiologie der Ernährung daraus Nutzen zieht, sondern daß auch die Pathologie des Darmrohres mit besserem Erfolg als bisher die Gründe für die Entstehung mancher Darmkrankheiten wird aufklären können.

Unsere »Pest« in Deutschland ist bekanntlich nicht die Bubonenpest, sondern es ist der Typhus. Nachdem alle bisher angewandten Mittel zur Bekämpfung dieser Krankheit es nicht haben verhindern können, daß Jahr aus Jahr ein schwere Typhusepidemien zum Ausbruch kommen, da sollte man keinen Weg unbenutzt lassen, der zur Aufklärung des dunklen Zusammenhanges der Typhusbacillen mit dem *Bacillus coli* führen kann. Der Weg von der physiologischen Wirkung des *Bacillus coli gallinarum* im Hühnerdarm bis zur erfolgreichen Bekämpfung des Typhusbacillus im menschlichen Darmrohr mag wohl ein weiter sein, es ist aber der einzige, von dem aus die physiologischen und die pathologischen Vorgänge des tractus intestinalis verständlich sind und daher wird dieser Weg — mag es früher oder mag es später sein — besritten werden müssen, und er wird zum Ziele führen.

So viel steht schon jetzt fest, daß sowohl für das Leben der Pflanzen als auch für die Ernährung der Wirbeltiere und für den Menschen die Thätigkeit der Darmbakterien notwendig ist.

**Ueber die
Konstanz der Sporenkeimung bei den Bacillen und ihre
Verwendung als Merkmal zur Artunterscheidung.**

Von

Dr. Georg Caspari,

Zahnarzt aus Rummelsburg in Pommern.

(Aus dem hygienischen Institut in Würzburg.)

(Mit Tafel I.)

Die Zahl der in den letzten 25 Jahren neugefundenen Bakterienarten ist so bedeutend angewachsen, daß ihre systematische Einteilung die größten Schwierigkeiten bereitet, nicht zum wenigsten wegen der großen Variabilität der morphologischen und biologischen Charaktere.

Lehmann und Neumann¹⁾ haben in ihrer Bearbeitung der Bakteriologie wohl zuerst systematisch darauf hingewiesen, und sind für ihre Anschauung mit umfangreicherem Material hervorgetreten. Farbstoffbildung, Verflüssigung der Gelatine und andere chemische Leistungen werden dort als ebenso variabel bezeichnet wie die Pathogenität, ja auch die morphologischen Qualitäten, auf die eine Systematik sich in erster Linie stützen muß: Größe, Form und Anordnung der Zellen, Begeißelung und Sporenbildung erscheinen als schwankend in ziemlich erheblichem Umfange. Sind auch die Beobachtungen, welche die Autoren für jede einzelne dieser Angaben anführen, nicht immer

1) Lehmann und Neumann, Bakteriologie und bakteriologische Diagnostik. München, Verlag von J. F. Lehmann, 1. Aufl., 1896.

zahlreich, so genügen sie in ihrer Gesamtheit, um den gewünschten Eindruck hervorzubringen, daß die Schwierigkeit der Systematik der Bakterien in erster Linie in deren Variabilität liege.

Von den bakteriologischen Merkmalen, die zur Aufstellung einer Systematik der Bakterien geeignet erscheinen, ist die Art der Sporenkeimung und deren Konstanz bisher ziemlich wenig geprüft worden. Wohl haben Cohn¹⁾ und insbesondere Prazmowski²⁾ darüber wichtige Angaben gemacht, doch hat erst in neuester Zeit Burchard, unter Leitung von Prof. Migula in Karlsruhe, der Sporenkeimung besondere Aufmerksamkeit geschenkt mit dem Resultate, daß der Vorgang der Sporenkeimung bei jeder Art eine sehr konstante Eigenschaft sei, während sich die verschiedenen Arten durch sehr verschiedene Sporenkeimung unterscheiden. Einzelne andere Autoren haben kleinere Arbeiten publiziert, die nicht mit Burchard übereinstimmen, und auf die ich später zu sprechen komme.

Professor Dr. K. B. Lehmann, der mit Dr. Hirai an einigen Arten die Konstanz der Sporenkeimung studierte, kam zu Resultaten, die die Angaben Burchards als höchst auffallend erscheinen ließen, so daß derselbe wünschte, die Frage möge durch möglichst sorgfältige und kritische Untersuchung von neuem bearbeitet werden. Ich unterzog mich dieser Aufgabe um so lieber, als gerade die Gruppe der sporentragenden Bacillen eine Menge theoretisch und praktisch wichtiger Arten einschließt.

Die Sporen sind als die Dauerzustände der Bakterien erkannt worden, welche von letzteren gebildet werden, sobald der Nährboden für die Existenz derselben ungeeignet geworden ist. Hierfür spricht auch besonders die wohl von keiner Seite

1) Cohn, Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, I. Heft 2, 1872. — Untersuchungen über Bakterien. IV. Beiträge zur Biologie der Bacillen, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II, 1876, Heft 2.

2) Prazmowski, Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. Leipzig, 1880. — Zur Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. Botanische Zeitung, 1877.

bestrittene Erfahrung, daß eine Auskeimung von Sporen auf demselben Nährboden nicht vor sich geht. Für das Auskeimen von Sporen sind als Bedingung erkannt worden: 1. unverbrauchter und für die bestimmte Bakterienart geeigneter Nährboden, 2. Feuchtigkeit und Wärme, 3. für viele Arten Sauerstoff. Die Keimung der Sporen leitet sich bei allen bisher beobachteten Arten in der gleichen Weise ein: die reife, vorher stark lichtbrechende und deutlich konturierte Spore beginnt, unter zur Auskeimung geeignete Bedingungen gebracht, im günstigsten Falle nach ca. ein bis zwei Stunden anzuschwellen, mit dieser Anschwellung ihren starken Lichtglanz zu verlieren, ihre Kontur runder und unbestimmter zu gestalten und allmählich an einer gewissen Stelle das Keimstäbchen hervortreten zu lassen. Je nach der Art nun, wie dieses Stäbchen die Membran verläßt, lassen sich drei verschiedene Modi, welche jedoch nicht ohne Übergänge sind, unterscheiden.

1. Keimung des Stäbchens unter Verquellen der Membran: Die Spore streckt sich in die Länge, die Kontur wird undeutlicher, der Lichtglanz erlischt, und diese Veränderungen gehen so lange langsam vorwärts, bis die Spore in Gestalt und Aussehen vollkommen einem Stäbchen gleicht, welches sich nach einiger Zeit teilt.

In keinem Stadium kann man auch nur die geringste Abhebung einer Sporenmembran beobachten. Man muß dann annehmen, daß sich entweder die Sporenmembran einfach zur Membran des jungen Stäbchens entwickelt oder, was wahrscheinlicher ist, »sie verschleimt und entzieht sich so der direkten Beobachtung« (Migula).¹⁾ Als Typus kann die von Klein bei seinem *Bacillus leptosporus* beschriebene Keimung gelten. Auch Burchard²⁾ beobachtete während der Keimung seines *Bacillus leptodermis* nie eine abgestreifte Sporenmembran. Er erklärt das »durch die infolge ihrer (der Sporenmembran) sehr zarten

1) Migula, System der Bakterien. Jena, 1897.

2) Burchard, Beiträge zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien. Arbeiten aus dem hygien. Institut Karlsruhe.

Struktur bewirkte, fast momentane Verquellung nach der Abstoßung; oder aber die alte Sporenhaut streckt sich direkt zur neuen Bakterienmembran, was allerdings weniger wahrscheinlich ist.«

2. Polare Keimung: Die Sporenmembran zeigt eine deutliche Abhebung während der Keimung und zwar so, daß das Stäbchen durch einen polaren Rifs in der Sporenhaut auschlüpft. Hierher gehören der Milzbrandbacillus und seine nächsten Verwandten.

3. Äquatoriale Keimung: Das Stäbchen schlüpft durch einen äquatorialen Rifs der Sporenhaut hervor. *Bacillus subtilis* und seine Verwandten.

Als Unterarten dieser Typen sind zunächst:

a) die schräge Auskeimung zu erwähnen, bei der das Stäbchen weder rein polar, noch rein äquatorial aus der Membran hervorbricht,

b) die hufeisenförmige Auskeimung, bei der zwar ein äquatorialer Einrifs der Membran erfolgt, das keimende Stäbchen sich jedoch in der Längsrichtung der Spore bildet, somit im Moment der Keimung sich mit dem gewölbten Rücken hufeisenförmig aus der Membran hervordrängt, indes die Stäbchenenden von der Membran umschlossen bleiben.

Diese Haupttypen der Sporenkeimung sind durch Übergänge miteinander verbunden, doch hat nach Migula und Burchard jede Art ihre besondere Form der Sporenkeimung, die sie von allen anderen Arten unterscheidet.

Inwieweit diese Konstanz besteht und inwieweit somit die Sporenkeimung zur Artunterscheidung der Bakterien zu verwenden, soll durch die folgenden Untersuchungen festgestellt werden.

Diese Untersuchungen wurden im hygienischen Institut der Universität Würzburg unter Leitung von Herrn Prof. Lehmann gemacht.

I. Teil. Untersuchungen.

Als ich diese Arbeit begann, bestanden zunächst die Hauptschwierigkeiten in der Beherrschung der Temperaturverhältnisse. Zur Erwärmung des Mikroskops benutzte ich den bekannten Zeifsschen Wärmekasten. Ich habe bei unserem Apparat durch eine gröfsere Reihe Untersuchungen konstatiert, dafs zwischen der am Regulator eingezeichneten Scala und der im Apparat durch ein Thermometer angezeigten Wärme, je nach dem Gasdruck, eine Differenz von 3—4° vorhanden ist. Weiterhin war zu beachten, dafs zur Erhaltung konstanter Temperaturen eine genügende Vor- und Durchwärmung des Mikroskops unbedingt notwendig ist. Es hat sich gezeigt, dafs hierfür eine Zeit von mindestens 60 Minuten, besser 90 Minuten, erforderlich ist. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen ist es mir gelungen, meine Untersuchungen bei konstanten Temperaturen vorzunehmen. Ich habe als beste Keimungstemperatur für die von mir beobachteten Arten 32—34° erkannt, und soweit im folgenden nicht anders hervorgehoben, meine Beobachtungen bei dieser Temperatur vorgenommen. Ich will schon an dieser Stelle bemerken, dafs gerade bei den Keimungsbeobachtungen, um gleiche Resultate zu erhalten, konstante Temperaturen zu den Hauptvorbedingungen gehören, dafs schwankende Temperaturen nicht unwesentlich, besonders auf die Zeitverhältnisse einzuwirken vermögen.

Als Nährböden wurden in erster Linie Agar, dann Gelatine und Bouillon in der gewöhnlichen Zusammensetzung benutzt. Der gewöhnliche Agar hat vor der Gelatine und der Bouillon den Vorzug, dafs man die Sporen auf dem Deckglase wegen der Festigkeit des Agar nicht so fest anzukleben braucht, was für den Keimungsverlauf nicht ohne Einflufs zu sein scheint; dafs weiterhin die sogenannte Molekularbewegung, welche fast regelmäfsig bei den Beobachtungen in Bouillon von Anfang an die genaue Untersuchung stört, wesentlich vermindert wird. Ein weiterer Nachteil der Bouillon ist die gelbliche Färbung des Gesichtsfeldes, welche oft feinere Lichtbrechungsunterschiede zu

erkennen verhindert. Auch die Gelatine verlangt festeres Ankleben des Materials.

Im Verlaufe meiner Untersuchungen bin ich nun so verfahren, daß ich zunächst die Reihe der von Burchard als neue Arten beschriebenen Bakterien nachuntersuchte. Ich bezog dieselben von Kral aus Prag. Weiterhin untersuchte ich dann noch eine Reihe selbstgezüchteter Bakterien. Da es für diese Arbeit nicht von Interesse schien, dieselben näher zu bestimmen, habe ich dies unterlassen und mich begnügt, ihrer Herkunft eine indifferente Bezeichnung als Unterscheidungsmerkmal beizufügen.

Zur Methodik will ich erwähnen, daß ich zunächst bestrebt war, reines Sporenmaterial zu erhalten. Stäbchendetritusmassen im Gesichtsfelde können auf die Beobachtung im höchsten Grade störend einwirken. Anfangs bin ich so verfahren, daß ich nach Burchard das betreffende Material in sterilisiertem Wasser oder Bouillon aufschwemmte, ca. $\frac{1}{2}$ Stunde auf 70° C. erwärmte, um auf diese Weise die noch vorhandenen lebenden Stäbchen abzutöten und ihren Detritus zum Verquellen zu bringen. Ich kam mit dieser Methode nur in seltenen Fällen zum Ziel. Einmal genügte die Temperatur nicht immer, um alle Detritusmassen zum Verquellen zu bringen. Dann lag auch die Gefahr nahe, daß durch das Erwärmen der Sporen in irgend welcher Richtung auf dieselben eingewirkt werde. Jedenfalls habe ich bemerkt, daß das so behandelte Material niemals so regelmäÙig keimte wie auf andere Methode gewonnenes.

Somit griff ich zu dem mehr Zeit raubenden Mittel, welches auch von Burchard zuweilen angewandt worden ist: durch längeres Verweilen bei geeigneter Temperatur in demselben Nährboden die Stäbchen zum Sporenbilden zu zwingen und ihre Detritusmassen zum Schwinden zu bringen. Für die von mir gezüchteten Arten genügte in den meisten Fällen schon eine Temperatur von 37° und eine Zeitdauer von 2—3 Tagen, um vollkommen reines und für die Beobachtung geeignetes Sporenmaterial zu erhalten. In anderen Fällen war zuweilen eine Zeitdauer von mindestens 6—8 Wochen erforderlich, um einiger-

maßen reines Material zu erhalten. Bei einigen Burchardschen Arten, die schon längere Zeit auf künstlichen Nährböden weitergezüchtet waren, kam ich aber auch auf diesem Wege nicht in den Besitz reinen Sporenmateriels. Ich versuchte deshalb mit Hilfe von Färbungsverfahren die vegetativen Elemente abzutöten und zu kennzeichnen, aber auch dieses Hilfsmittel lieferte mir die gehofften Resultate nicht. Aus diesem Grunde mußte das nähere Studium dieser Burchardschen Arten unterbleiben.

Die Präparate wurden in der Weise angefertigt, daß mit einer geglühten Platinöse eine geringe Menge des vorbereiteten Materials auf einem sterilen Deckglas verrieben, das Material an der Luft getrocknet und mit dem Nährboden versehen wurde. Untersuchungen mit Gelatine und besonders Bouillon machen (im Gegensatz zu denen mit Agar) ein vorsichtiges Erwärmen und Antrocknen über der Flamme erforderlich.¹⁾

Das so mit dem Nährboden versehene Präparat wird alsdann mit Paraffin oder Vaseline auf einem hohlgeschliffenen Objektträger befestigt.

Versuche.

In der nachfolgenden Beschreibung meiner Versuche will ich nun so vorgehen, daß ich, soweit es sich um Burchardsche Arten handelt, meinen Untersuchungen zum Vergleich die Keimungsbeobachtungen Burchards in kurzem Auszuge vorausschicke. Ich will an dieser Stelle erwähnen, daß ich aus meinen sehr zahlreichen Beobachtungen (ca. 25—30 von jeder Bakterienart) je einen als besonders gelungen zu bezeichnenden Versuch voranstelle und die anderen Versuche mit derselben Bakterienart, soweit sie nichts Neues bieten, nur kurz erwähne. Es sei auch nicht übergangen, daß eine nicht unbeträchtliche Anzahl von Versuchen aus bisher zum Teil unaufgeklärten Gründen trotz sorgfältiger und gleichmäßiger Anfertigung der Präparate scheiterte. Bei einem gewissen Prozentsatz dieser als mißglückt

1) Bei dem Antrocknen der Präparate über der Flamme muß man sehr vorsichtig verfahren, da meine so behandelten Präparate, wenn sie überhaupt keimten, große Variationen in der Auskeimungszeit zeigten.

zu bezeichnenden Versuche war teils das Präparat zu undeutlich, teils die zu untersuchenden Sporen zu klein, um überhaupt zu irgend welchen positiven Schlüssen Berechtigung zu geben, teils auch hatte ich besonders in der letzten Hälfte des Sommers mit ungünstigen und wechselnden Lichtverhältnissen zu kämpfen. Letztere Unannehmlichkeit wurde im Winter dadurch etwas gehoben, dafs ich die ganzen Untersuchungen bei Glühlicht vornahm, welches wenigstens den Vorzug der gleichmäfsigen Lichtstärke hatte.

Um möglichst objektive Urteile über das Gesehene zu fällen, habe ich aufser der Burchardschen Arbeit alles Litteraturstudium während meiner Beobachtungen vermieden. Es genügt deshalb wohl die Bemerkung, dafs ich nur das in meinen Zeichnungen wie auch in meinem Protokoll aufgenommen habe, was ich deutlich gesehen habe. Alles Undeutliche oder durch die Beobachtung nicht als sicher Erwiesene wird stets im nachfolgenden so bezeichnet werden. Nachdem dann meine Untersuchungen zu einem gewissen Abschlusse gelangt waren, begann ich meine Litteraturstudien, welche, wie ich nicht verhehlen will, einige genauere Nachuntersuchungen notwendig machten. Es wurden untersucht:

a) Burchardsche Arten (von Kral bezogen):

1. *Bacterium perittomaticum*.
2. *Bacillus goniosporus*.
3. *Bacterium Petroselini*.
4. *Bacterium Filamentosum*. E. Klein.
5. *Bacterium angulans*.
6. *Bacillus loxosporus*.

b) Durch die Freundlichkeit des Herrn Kollegen Zierler erhalten:

7. *Bacillus gangraenosus pulpae*.

c) Selbstgezüchtete Arten:

8. *Bacillus* aus der Luft gezüchtet von Herrn Professor Lehmann.
9. *Heubacillus* 1.
10. *Heubacillus* 2.

Ich will gleich an dieser Stelle hervorheben, daß die von Kral bezogenen Burchardschen Bakterienarten im wesentlichen in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften mit den von Burchard als charakteristisch angegebenen übereinstimmen, so daß ich diesen Faktor nicht mehr bei jeder einzelnen untersuchten Art zu erwähnen brauche. Der von Herrn Kollegen Zierler zur Verfügung gestellte *Bacillus gangraenosus pulpae* ist mit dem von Arkövy aus der gangränösen Zahnpulpa gezüchteten *Bacillus* sehr ähnlich. Der *Bacillus* aus der Luft wurde von Herrn Prof. Lehmann als zufälliger Befund einer anderen Kultur kultiviert, während *Heubacillus* 1 und 2 von mir aus Heuinfus nach bekannter Methode gezüchtet wurden. — Nach der Lehmann-Neumannschen Terminologie wären alle Burchardschen neuen Arten als »Bacillen« zu bezeichnen, ich habe eine Umtaufung unterlassen, weil ich mir nicht klar darüber war, inwieweit die von Burchard aufgestellten Arten als neu zu bezeichnen seien.

1. *Bacterium perittomaticum* Burchard.

Burchard beobachtete, daß sich nach 45 Minuten die ersten Veränderungen an den neu eingelegten Sporen zeigten; nach 2 Stunden 40 Min. hatten alle ihren Glanz verloren und waren mit einer Ausnahme alle stark angeschwollen. Der Moment der Auskeimung ist sehr schwer zu beobachten, da die Sporen vor derselben stark anschwellen; »sie verlieren dabei ihr starkes Lichtbrechungsvermögen so vollständig, daß die jungen hervortretenden Stäbchen sich fast gar nicht von dem in der Spore steckenden Teil unterscheiden lassen.« Nach 4 Stunden 45 Min. liefs sich die erste Keimung deutlich konstatieren, indem sich die Sporenmembran abzuhoben begann. Keimungsmodus ist polar.

Eigene Untersuchungen.

Perittomaticum 25. X. Präparat stammt aus der Originalkultur, wurde über der Flamme nicht fixiert, sondern nur an der Luft getrocknet. Präparat mit einem Agartropfen von 60° C. versehen. Deckglas mit Vaseline auf dem hohlgeschliffenen Objektträger befestigt.

9 Uhr 45 Min. Präparat unter das erwärmte Mikroskop gebracht und sogleich gezeichnet. Reines Sporenmaterial, von denen 9 Sporen im Gesichtsfelde fixiert werden. Die Sporen sind stark konturiert, scharf lichtbrechend, in ihrer Form länglichrund.

10 Uhr 5 Min. Der Sporenkontur zeigt sich in seiner ganzen Circumferenz verwischt, wodurch die Sporen selbst etwas angeschwollen erscheinen. Minimale Abschwächung des hellen Lichtglanzes.

2 Uhr 30 Min. Sporen 1, 3, 6, 7 keimen mehr weniger regelmäfsig polar aus. Die Auskeimung ist im ganzen streng polar, d. h. in der Längsachse der Spore. Auch alle mit diesem Präparat zugleich und nach der gleichen Methode für den Brutofen zur Nebenuntersuchung angefertigten Präparate (5) zeigen mehr weniger deutlich polare Auskeimung. Bei Spore Nr. 6 ist das Durchbruchloch des keimenden Stäbchens etwas verschoben, so dafs man diesen Modus nicht als streng polar zu bezeichnen braucht. Während des Zeichnens ist Nr. 7 schon geteilt. Ein Abheben der alten Sporenmembran ist nicht zu konstatieren. Der Moment, in dem das junge Stäbchen aus der stark verquollenen Keimspore hervorbricht, ist so kurz, dafs er kaum zu beobachten ist. Der ganze Akt macht den Eindruck, als ob das elastische Stäbchen, in der Membran eingeschlossen, gleichsam eingezwängt ist, und nach dem Durchbruch sich schnell bis zu einer gewissen Gröfse ausdehnt. Die Stäbchen sind unbeweglich.

8 Uhr 15 Min. abends. Sporen 2, 8, 9 ebenfalls polar ausgekeimt. Spore 4 unverändert.

Nächster Morgen. Spore 4 unverändert, keine Sporenbildung.

Mit Perittomaticum habe ich zur Kontrolle noch eine gröfsere Reihe weiterer Beobachtungen in Gelatine und Bouillon vorgenommen, welche im wesentlichen dasselbe zeigten:

1. Der Auskeimungsmodus war regelmäfsig polar, mit mehr weniger ausgesprochenen Schwenkung des auskeimenden Stäbchens. Die Sporenmembran war fast immer deutlich erkennbar, vielleicht in den flüssigeren Nährböden etwas mehr verquollen, und hing teils dem neu ausgeschlüpften Stäbchen noch an, teils gelang es demselben, die Membran frühzeitig abzustreifen. Die Stäbchen zeigten, falls nicht fixiert,

2. alle Eigenbewegung, welche an diejenige von subtilis erinnert. Die Auskeimungszeit, d. i. die Zeit bis zum Auskeimen der ersten Spore, schwankte zwischen 2 Stunden 45 Min. und 5 Stunden.

3. Einige Sporen keimten noch später, der gröfste Teil aber brauchte mindestens 12 Stunden. Auffallend war, dafs eine Reihe von gut ausgebildeten Sporen selbst nach 3 mal 24 Stunden noch keine Veränderung im Sinne einer Keimung zeigte; mithin die Annahme berechtigt scheint, dafs diese Sporen in demselben Nährboden überhaupt nicht auskeimen.

2. *Bacillus goniosporus* Burchard.

Burchard erwähnt, betr. der Auskeimung von *Goniosporus* nichts Besonderes. Die zu beobachtenden Sporen kamen um 8 Uhr 40 Min. unter das erwärmte Mikroskop, um 9 Uhr 30 Min. waren sie bereits blässer und begannen anzuschwellen, um 9 Uhr 45 Min. waren sie vollkommen trübe; erst um 11 Uhr 55 Min. ist die Anschwellung an allen Sporen sehr deutlich bemerkbar. Um 1 Uhr 50 Min. sind 4 von den 5 beobachteten Sporen polar ausgekeimt und die 5. Spore steht unmittelbar davor. Um 2 Uhr 5 Min. sind alle 5 Sporen ausgekeimt und 1 Spore hat bereits die alte Sporenhaut in Form eines schwach sichtbaren Käppchens etwas abzustreifen begonnen. Dieses soll wohl das Charakteristikum für diese Bakterienart sein; denn Burchard hebt extra hervor: die Sporenhaut sitzt den Stäbchen als helles, durchsichtiges Mützchen auf. Burchard scheint nur 3 Präparate und diese gleichzeitig angefertigt zu haben, und von diesen ist das näher Beschriebene anfangs bei 30° C., dann noch eine Stunde, vielleicht weil die Keimung nicht schnell genug vor sich ging, bei 33° C. gehalten worden. Trotzdem findet sich keine Anmerkung, ob überhaupt weitere Versuche mit *Goniosporus* gemacht wurden und wie ein Versuch bei konstanter Temperatur ausgefallen ist.

Meine eigenen Untersuchungen mit *Goniosporus* haben mir nun sehr widersprechende Resultate geliefert. Gerade mit *Goniosporus* habe ich sehr viel und auf allen Nährböden experimentiert, um die Keimung und die sich während derselben zeigenden Eigentümlichkeiten zu studieren.

a) Versuche mit Agar.

Goniosporus 6. XI. Präparat stammt aus der Originalkultur. Material an der Luft getrocknet, mit Agar beschickt, bei 32—34° C. beobachtet. Gleichzeitig mit diesem Präparat 5 Präparate für den Brutofen.

11 Uhr. Präparat unter das erwärmte Mikroskop gebracht. Reines Sporenmaterial. Sporen länglich oval, stark lichtbrechend, scharf konturiert, sehr deutlich.

11 Uhr 25 Min. Spore a vollkommene Trübung und starke Anschwellung auf der ganzen Circumferenz der Spore. Es scheint jedoch nur die Membran verquollen zu sein, da die Spore ihre frühere länglich ovale Form beibehalten hat.

12 Uhr 40 Min. Sporen c, d, f, g, i erscheinen ebenfalls verquollen. Spore a bedeutet in die Länge gestreckt und deutlich mit einem Ring versehen.

12 Uhr 55 Min. Spore a hat sich noch mehr gestreckt.

1 Uhr 5 Min. Sporen c und f sind auf der ganzen Circumferenz stärker angeschwollen und erscheinen so noch mehr vergrößert.

1 Uhr 7 Min. Spore a deutlich polar ausgekeimt. Das Stäbchen sieht mit einer etwas breiten Kappe aus dem Schlitz der Membran hervor. Es

scheint also der polaren Keimung eine deutliche Längsstreckung vorauszugehen. (Präparate des Brutofens zeigen vorwiegend polare Keimung; jedoch auch einige schräg polare Keimungen.)

3 Uhr. Alle Sporen außer b und e mehr weniger deutlich polar ausgekeimt. Viele Stäbchen sind schon mehrfach geteilt. Einige sind beweglich. Am 7. XI. ist um

10 Uhr noch keine Sporenbildung zu beobachten. Die Eigenbewegung hat vollkommen aufgehört.

Am 8. XI. zeigen sich lang ausgewachsene Fäden mit undeutlicher Septierung ohne Trübung des protoplasmatischen Inhalts. Versuch abgebrochen.

b) Gelatine.

Am 9. XI. wurden Sporen von *Goniosporus* in Gelatine beobachtet, welche sich vor der Auskeimung allmählich vergrößerten, d. h. in die Länge streckten, und schließlich ohne eine Membran erkennen zu lassen, in das ausgekeimte junge Stäbchen übergingen, so daß der Moment der Keimung, d. h. ein Zerreißen der Membran nicht zu beobachten war. Dieser Auskeimungsmodus setzte mich sehr in Erstaunen, zumal im Agar eine deutliche Membran beobachtet worden war und auch Burchard eine solche gesehen hatte. Es wurden daher eine größere Reihe von Untersuchungen (ca. 25) mit *Goniosporus* in Gelatine vorgenommen, welche im wesentlichen zu gleichen Resultaten führten. Auch Beobachtungen im ganz frischen Agar zeigten an einigen Sporen die Sporenmembran vollkommen verquollen, so daß Bilder beobachtet wurden, welche denen der Gelatine-Beobachtung vollkommen glichen.

Am 16. XI. wurde ein Versuch mit Gelatine im Verein mit Herrn Prof. Lehmann angestellt und lückenlos kontrolliert.

Die vorher stark lichtbrechend gewesene Spore dehnte sich allmählich unter Undeutlichwerden ihres Inhalts. Eine Membran fällt in diesem Stadium nicht auf; vielmehr ist die erfolgte Keimung erst dann zu konstatieren, wenn das Stäbchen sich zur Teilung anschickt. Ein allein liegendes junges Stäbchen ist von einer auskeimenden, genügend vorgeschrittenen Spore nicht zu unterscheiden. Auch nach erfolgter Teilung des Stäbchens ist man nicht imstande, eine Sporenmembran deutlich zu erkennen, auch ist das jüngere Stäbchen nicht schmaler als das ältere. Ein Moment, in dem das junge Stäbchen aus der es einschließenden

Um 8 Uhr abends zeigte sich das Keimstäbchen aus Spore Nr. 8 geteilt, ohne während dieser Zeit eine Membran erkennen zu lassen. Weitere Auskeimungen waren im Präparat nicht zu konstatieren.

Goniosporus 4. XII. (Siehe Tafel, Fig. 1.)

Material aus der Originalkultur, an der Luft getrocknet, mit frischem Agar beschickt, bei 32—34° C. beobachtet. Es wurden, um einen gewissen Prozentsatz zu gewinnen, dieses Mal 56 Sporen beobachtet und gezeichnet.

Nach 2 Stunden 30 Min. keimten
 deutlich aus 18 Sporen = ca. 32,15 %.
 Veränderungen im Sinne einer
 Keimung zeigten 19 Sporen = ca. 33,85 %.
 Bei genügend langer Beobachtung
 wären also ausgekeimt . . . 37 Sporen = ca. 66 %.
 Überhaupt keine Veränderung zeigten also nach
 2 Stunden 30 Min. ca. 34 %.

Von den 18 ausgekeimten Sporen war die Keimung:
 Streng polar bei Nr. 1, 2, 26, 28, 29, 40, 45, 46. 48 = 9 = ca. 50 %.
 Schräg . . . Nr. 4, 6, 8, 12, 34 = 5 = ca. 28 %.
 Ohne ein Membran erkennen zu lassen Nr. 21, 23, 41, 43 = 4 = ca. 22 %.

Bei meiner Beobachtung war es mir auffallend, dafs gerade diejenigen Sporen, welche, ohne eine deutliche Membran zu erkennen zu geben, auskeimten, fast stets zuerst eine Veränderung im Sinne einer Keimung zeigten und auch im Präparat sich durch besondere Gröfse auszeichneten.

3. *Bacterium Petroselini* Burchard.

Burchard hat für die Keimung des *Bacterium Petroselini* ein Charakteristicum angegeben, nämlich, dafs die Sporenmembran, nachdem das keimende junge Stäbchen dieselbe nach Verlauf von ca. 1 Stunde 10 Min. ohne Besonderheiten polar durchbricht, deutlich 2 Schichtungen erkennen läfst. Er hat bei genauerer Durchsuchung gefunden, dafs in der That 2 Sporenhäute vorhanden waren. Die äufsere Haut ist, wie aus der Art der Lichtbrechung hervorgeht, die derbere, die innere die zartere. Meistens lagen die Häute sichelförmig bei einander, resp. untereinander.

Bei meinen Untersuchungen kam es mir darauf an, einmal nachzuschauen, ob es mir auch gelingen würde, 2 Sporenhäute bei der Keimmembran zu unterscheiden, dann aber besonders zu beobachten, wie sich diese beiden Membrane zu einander und zu den auskeimenden Stäbchen verhalten würden. Ich begnüge mich, aus der grossen Reihe meiner Untersuchungen drei Beobachtungen mitzuteilen; da diese das, was ich teils allein, teils mit Herrn Prof. Lehmann gesehen habe, demonstrieren. Herr Prof.

Lehmann hat sich ganz besonders für diese Untersuchungen interessiert und war so liebenswürdig, mir für dieselben einen Zeiss'schen Apochromat zur Verfügung zu stellen.

Bakt. Petroselini 18. XI. (Siehe Tafel, Fig. 2.)

Material aus der Originalkultur, an der Luft fixiert, mit Agar versehen, bei 32—34° C. beobachtet.

4 Uhr. Das Präparat wird unter das erwärmte Mikroskop gebracht. Es zeigt reines Sporenmateriale, von dem 11 Sporen im Gesichtsfelde liegen und sogleich gezeichnet werden. Sporen stark lichtbrechend, länglich, oval-cylindrisch, scharf konturiert.

5 Uhr 30 Min. Nr. 1, 2, 3, 8, 10, 11 haben sich bedeutend vergrößert. Diese Vergrößerung scheint nicht nur der Ausdruck einer Membranquellung zu sein, vielmehr scheint die ganze Spore gequollen und etwas mehr abgerundet. Der Glanz ist verloren, die Sporen erscheinen matt. Die Membran hebt sich deutlich ab und bildet eine hellere Zone um die gequollene Spore herum. Weiterhin strecken sich die Sporen wieder etwas mehr, bis plötzlich um

6 Uhr 15 Min. Spore Nr. 1 deutlich schräg polar auskeimt. Die Membran ist, wenn auch stark verquollen, deutlich sichtbar und centralwärts macht sich ein stärker lichtbrechender Ring an derselben bemerkbar. Das junge Stäbchen kommt spitz aus der Membran heraus.

6 Uhr 35. Spore Nr. 3 keimt deutlich polar aus. Es lassen sich an der Sporemembran zwei verschiedene Schichtungen unterscheiden. Spore und junges Stäbchen sind von einem feinen, hellen Hof umgeben. An der Keimmembran der Spore Nr. 1 zeigt sich die cirkuläre, verschieden lichtbrechende Schichtung derselben noch deutlicher.

7 Uhr 10 Min. Spore Nr. 3 hat die äußere Membran abgestreift und ist deutlich von einer zweiten, vielleicht etwas weniger stark lichtbrechenden Membran umgeben. Die erste Membran liegt sichelförmig neben dem auskeimenden Stäbchen; letzteres ist vorn zugespitzt und ein wenig gekrümmt. Spore Nr. 1 läßt jetzt ebenfalls deutlich zwei Membranen, eine äußere stärker lichtbrechende, und eine innere hellere erkennen. Nr. 2 ist gleichfalls deutlich polar ausgekeimt. Auch hier eine Schichtung der Keimmembran. Die äußere Membranschicht beginnt bereits sich abzustreifen.

7 Uhr 15 Min. Das Präparat wurde nochmals Herrn Prof. Lehmann zur Beurteilung übergeben. Derselbe konstatierte:

1. Schräg polares Auskeimen von Stäbchen Nr. 1, das nochmals gezeichnet wurde; deutlich polares Auskeimen von Stäbchen 2 und 3.

2. Die drei ausgekeimten Sporen lassen mit Sicherheit 2 verschieden starke Membrane erkennen, von denen die äußere als derbere, Exine, die innere als weniger starke Intine unterschieden werden können.

3. Die Stäbchen sind unbeweglich.

Auch Sporen Nr. 8, 10 und 11 scheinen Keimung vorzubereiten; dieselbe konnte jedoch nicht mehr beobachtet werden.

Gleichzeitig mit dieser Untersuchung wurde eine andere Stelle des Präparats beobachtet und gezeichnet. Sie zeigt im wesentlichen das Gleiche.

4 Uhr. Sporen a, g stark lichtbrechend, von fast cylindrischer Form, scharf konturiert.

5 Uhr 30 Min. Sporen a, b, c, d, e stark verquollen, sowohl Membran als auch der protoplasmatische Inhalt weniger lichtbrechend. Die Form ist jetzt fast vollkommen oval.

6 Uhr 35 Min. Sporen a, b und d ausgekeimt. a und b deutlich zwei Membranen. a deutlich polare Auskeimung, b dagegen schräg polar.

6 Uhr 55 Min. Spore c ausgekeimt, deutlich polar, zwei Membranen, auch Spore d läßt zwei Membranen erkennen.

Bact. Petroselini 21. XI. (Siehe Tafel, Fig. 3.) Kontrollversuch.

Versuch unter Kontrolle von Herrn Prof. Lehmann angestellt. Material aus der Originalkultur, an der Luft getrocknet, mit Agar beschickt. 32 bis 34° C.

12 Uhr 55 Min. 13 Sporen werden im Gesichtsfelde fixiert und sogleich gezeichnet. Sporen fast cylindrisch, stark lichtbrechend, scharf konturiert.

2 Uhr 40 Min. Sporen 1, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13 haben sich bedeutend vergrößert, etwas abgerundet und ihren Glanz vollkommen verloren. Sporen 1, 5, 6 lassen die Membran deutlich vom protoplasmatischen Inhalt der Sporen unterscheiden.

4 Uhr 5 Min. Spore 1 keimt polar aus; jedoch ist die Spitze des Stäbchens schräg abgeknickt. Spore 5 streng polar gekeimt. Die Membran zeigt sich schärfer konturiert und läßt bei deutlicher Einstellung zwei verschiedene Lichtbrechungssphären innerhalb derselben unterscheiden. In diesem Fall konnte ich den ganzen Vorgang des Auskeimens beobachten, derselbe dauerte ca. 20 Minuten vom ersten Hervorbrechen des Stäbchens bis zu diesem Stadium und machte den Eindruck, als wenn das keimende Stäbchen die Membran mehr und mehr spannt, und dieselbe plötzlich sprengt. Nach ihrem Zerreißen zieht sich die Membran allmählich zusammen und wird so stärker lichtbrechend. Gleichzeitig sind auch Sporen 6 und 13, beide jedoch deutlich schräg polar, ausgekeimt. Auch Spore 13 läßt mit Sicherheit zwei verschiedene Lichtbrechungssphären innerhalb der Keimmembran unterscheiden.

5 Uhr 35 Min. Spore 11 keimt deutlich polar aus. Indessen haben Spore 1 und 13 ihre erste Membran abgestreift und lassen deutlich eine zweite Membran an dem Stäbchen erkennen. Bei genauem Einstellen zeigt die abgestreifte Membran von Spore 13 ein seitliches Loch. Das aus Spore 5 hervorgebrochene Stäbchen ist etwas gewachsen; die beiden Membranen lassen sich jetzt deutlicher unterscheiden; je nach der Einstellung erscheint die Exine oder Intine hell oder dunkel. Gleiches zeigt Spore 6. Hier hat sich das Stäbchen schon vollkommen von der Membran befreit und ist herausgeschlüpft; diese läßt deutlich eine doppelte Schichtung erkennen. Ein höchst eigenartiges Verhalten zeigt Spore Nr. 12. Das Stäbchen ist hier

schräg polar ausgekeimt, jedoch nach rückwärts gekrümmt und an dem oberen Ende kolbenförmig verdickt. Die Membran zeigt zwei Schichten.

6 Uhr 15 Min. Die Stäbchen aus Sporen 1 und 13 haben die erste Membran vollkommen abgestreift und beginnen sich von der zweiten Membran zu emanzipieren. Diese Beobachtungen lassen keinen Zweifel darüber, ob in diesem Falle zwei Membranen vorhanden waren und abgeworfen wurden. Sonst konnte etwas Neues nicht konstatiert werden. Die Beobachtungen wurden noch bis 9 Uhr abends fortgesetzt; während dieser Zeit keimten auch Sporen 7 und 9 aus. Die Auskeimung von Spore 7 könnte man als äquatorial bezeichnen mit einer schrägen Richtung des Keimstäbchens. Spore 9 keimt polar; somit lassen sich nur bei sehr gutem Willen zwei Membranen erkennen. Bis 9 Uhr waren somit alle differenzierten Sporen ausgekeimt. Die Sporen Nr. 2, 3, 4, 8, 10 zeigten von vornherein keine Neigung zum Keimen und hatten sich auch bis 9 Uhr abends noch nicht verändert.

Fasse ich die Resultate dieser beiden Versuche, welche durch die übrigen von mir angestellten, hier aber nicht mitgeteilten, unterstützt wurden, zusammen, so läßt sich feststellen:

1. dafs die Keimungsart von *B. Petroselini* grofse Variabilität zeigt,

2. dafs nämlich die Membran sich deutlich in zwei Hüllen auflösen und dieselben nacheinander abwerfen kann, dafs aber auch in gewissen Fällen während der ganzen Keimung stets nur eine Membran zu beobachten ist,

3. dafs das junge Stäbchen sowohl polar als auch schräg polar, in zwei Fällen sogar deutlich äquatorial aus der Membran hervorbrach (Tafel, 5 Uhr 35 Min. Spore 12; Tafel. Spore 7, 8—9 Uhr),

4. dafs nicht alle Sporen gleichzeitig keimen, und einige überhaupt keine Neigung zum Auskeimen besitzen.

4. *Bacterium filamentosum* E. Klein.

Burchard hebt hervor, dafs die Keimungsbeobachtungen dieses Bakteriums von vornherein dadurch etwas erschwert wurden, dafs es ihm in keiner Weise gelingen wollte, völlig reines Sporenmateriale zu erhalten. »Die Zellhaut scheint bei dieser Art besonders resistent zu sein, wodurch sich auch die relativ sehr langsam vor sich gehende Keimung erklären mag.« Bei anfangs 31, nach 1 Stunde 20 Min. auf 35° C. erhöhter Temperatur zeigten von 4 Sporen 3 nach 1 Stunde 10 Min. eine deutliche Trübung und Anschwellung; eine von ihnen besonders war kreisrund geworden und keimte nach 5 Stunden 10 Min. polar aus, wobei sich die Sporenmembran seitlich etwas abhob. Dieses Abheben soll wohl das Charakteristicum dieser Keimungsart sein; denn als bis zum nächsten Morgen das »kräftig herangewachsene

Stäbchen« die alte Sporenmembran zur Hälfte abgestreift hatte, »hob sich dieselbe deutlich von dem Stäbchen als heller, umfassender Bogen ab.« Gleichzeitig mit Spore 1 keimte auch Spore 2 polar. Es ist ferner noch hervorzuheben, daß zwei von den vier Sporen, obwohl sie von vornherein Differenzierung im Sinne einer Keimung gezeigt hatten, erst nach 36 Stunden auszukeimen begannen. Es keimten also von vier: 2 Sporen nach 5 Stunden 10 Min., 2 Sporen nach 36 Stunden. Leider hat Burchard nicht angegeben, wie die Keimung bei den letzten beiden Sporen verlief. Es scheint vielmehr, als ob nur die eine der vier Sporen in besonderer Weise keimte und so ein Charakteristikum lieferte. Auch gibt Burchard nicht an, ob er überhaupt mit diesem Bakterium noch mehr Keimungen beobachtet hat, was er sonst fast niemals zu vergessen pflegt. Ferner fehlte auch zu meinem großen Bedauern die Angabe, wie alt die Kultur war und woher sie stammte.¹⁾

Meine eigenen Untersuchungen wurden mit einem Material vorgenommen, das, wie schon erwähnt, von Kral bezogen war, jedenfalls also noch länger auf künstlichen Nährböden gezüchtet, als das Burchardsche gewesen ist. Die ersten Keimungsbeobachtungen, welche ich mit diesem Bakterium vornahm, setzten mich durch ihre Eigentümlichkeit sehr in Erstaunen, und auch Herr Prof. Lehmann, dem ich dieselben zeigte, war zunächst versucht, an einen ganz neuen, bisher noch nicht beobachteten Keimungsmodus zu denken. Ich habe eine größere Reihe Untersuchungen mit diesem Material angestellt, welche alle dasselbe zeigten.

Bacterium filamentosum E. Klein. 26. XI. (Siehe Tafel, Fig. 4.)

Material stammt aus der Originalkultur, wurde an der Luft fixiert, mit Agar beschickt und bei 32—34° C. beobachtet.

12 Uhr. Reines Sporenmaterial, sogleich gezeichnet; Sporen stark lichtbrechend, scharf konturiert, länglichoval bis cylindrisch, niemals kugelig. im Querschnitt kreisförmig.

12 Uhr 45 Min. Sporen b, c, i, o, p verlieren ihren Glanz und lassen eine geringe Vergrößerung erkennen, welche allmählich immer stärker wird und sich auch bei einzelnen anderen Sporen zeigt.

1) Ich halte diese Angabe für besonders wichtig aus dem Grunde, weil, wie ich im II. Teil noch näher auszuführen Gelegenheit nehmen werde, ich aus meinen vergleichenden Untersuchungen der Keimungsvorgänge von altem und jungem Sporenmaterial die Überzeugung gewonnen habe, daß das Alter der Kultur wesentlichen Einfluß auf die Keimungsart auszuüben imstande ist. Burchard scheint sein Material von Klein erhalten zu haben, also nicht mit einer frisch gezüchteten Art gearbeitet zu haben.

3 Uhr 15 Min. Innerhalb der gequollenen Sporen eine Differenzierung des Protoplasmas, welche den Eindruck hervorrufft, als ob sich die Spore zu teilen beginne. Es läßt sich deutlich in der Mitte desselben eine je nach der Mikroskopeinstellung helle oder dunkle Querleiste erkennen. Eine genauere Untersuchung, welche zugleich mit Herrn Prof. Lehmann vorgenommen wurde, machte uns wahrscheinlich, daß es sich um eine c-förmige Krümmung des keimenden Stäbchens innerhalb der Sporenmembran handelt. Infolge der Kleinheit der Sporen ist es sehr schwer, ein vollkommen deutliches Bild des ganzen Vorganges zu bekommen. Selbst stärkere Okulare halfen nur wenig. Ich habe mich bemüht, nur das in den beigefügten Zeichnungen aufzunehmen, was mit den mir zu Gebote stehenden Hilfsmitteln deutlich zu erkennen war. Bis

5 Uhr 20 Min. sind schon einige Auskeimungen zu verzeichnen und Stäbchen b ist schon geteilt. Herr Prof. Lehmann, der nochmals eine genaue Untersuchung vornimmt, konstatiert, daß die Stäbchen c-förmig in der Membran eingeschlossen sind, und daß die Keimung selbst derart vor sich geht, daß das keimende Stäbchen, in dem Bestreben, sich zu strecken, die Membran sprengt. Die Einrißstelle der Membran ist sehr variabel, gewöhnlich scheint sie jedoch äquatorial zu sein. Die Membran streift sich allmählich über das sich langsam streckende Stäbchen zurück. Auf diese Weise kann die Auskeimung sowohl deutlich polar Spore k + m, als auch schräg polar, Spore g, als auch mehr oder weniger äquatorial, Spore i erscheinen. Ein eigentümliches Verhalten zeigen die Sporen a, b und o. Hier hat sich das Stäbchen schon etwas mehr von der Membran befreit. Die Keimung von Spore a zeigt Ähnlichkeit mit dem Modus der polaren; hier ist es dem einen Stäbchenende gelungen, sich zuerst aus der Membran herauszudrängen. Anders Stäbchen b und o; hier waren beide Stäbchenenden in der Membran eingeschlossen, so daß ein Strecken derselben verhindert war. Bei der fortschreitenden Keimung wurde die Membran an dem Punkte der größten Zerrung, d. i. äquatorial gesprengt, und zwar bei b an der konvexen Seite des Stäbchens, bei o an der konkaven.

Das Präparat wurde bis zum Abend beobachtet und über Nacht unter dem erwärmten Mikroskop gelassen.

Am 27. XI. zeigte sich um 8 Uhr 25 Min. nur minimales Wachstum. Sporen resp. Stäbchen aus a, b, c, d, g, i, k, l, m, o, p, q, r, waren variabel ausgekeimt. Das Weiterwachstum der ausgekeimten Stäbchen aber derart gering, daß Stäbchen p immer noch erst einmal geteilt, indes alle anderen Stäbchen ungeteilt waren. Alle Stäbchen waren unbeweglich.

10 Uhr 55 Min. Stäbchen g und l geteilt. Die Köpfchen an den Enden der Stäbchen sind jetzt vollkommen verschwunden.

Am 28. XI. war das Wachstum nur minimal vorgeschritten. Stäbchen i war etwas in die Länge gewachsen und zeigte in der Mitte die Anlage einer Spore. Sporen f, e und h unverändert im Sinne einer Keimung.

Bacterium filamentosum. 29. XI. (Tafel, Fig. 5.)

Die Abbildungen sind stark vergrößert gezeichnet und nach den Vorstellungen, die ich mir gebildet habe, schematisiert. Bei diesem Versuche

habe ich in den entscheidenden Momenten stets Herrn Prof. Lehmann hinzugezogen, welcher auch einen Teil der in Fig. 5 wiedergegebenen Zeichnungen entworfen hat. Der Versuch zeigte im wesentlichen das gleiche wie alle anderen Beobachtungen: Eine Differenzierung des Protoplasmas, als ob die Spore durch eine Brücke geteilt würde; allmählich läßt der Inhalt ein c-förmig gebogenes Stäbchen erkennen. Die Membran reißt an höchst variabler Stelle ein und kontrahiert sich auch unregelmäßig, so daß das keimende Stäbchen sowohl polar als schräg polar, als auch äquatorial aus ihr hervorbricht. Auffallend geringes Wachstum. Stäbchen unbeweglich.

Es ist also zu konstatieren, soweit unsere optischen Hilfsmittel reichen:

1. uns stets im Innern der keimenden Spore das Stäbchen gekrümmt angelegt erschien:

2. daß die Membran vorzüglich äquatorial einreißt, die späteren Lageverhältnisse zwischen Membran und Keimstäbchen aber im höchsten Grade variabel sind,

3. daß das keimende Stäbchen anfangs im Innern der Spore an den Enden verdickt scheint, später jedoch einem gewöhnlichen Stäbchen ähnlich wird.

5. *Bacterium angulans* Burchard.

Burchard hat zur Untersuchung dieses Bakteriums 10 Tage altes Material, das er selbst gezüchtet hat, herangezogen. Die Keimung erfolgte nach 2 Stunden 15 Minuten. Im Verlauf der Keimung schwellen die beiden beobachteten Sporen stark an, werden matt und bekommen eine fast kugelförmige Form; trotzdem war Burchard stets im stande, in der Keimungsmembran einen äquatorialen Riß, durch den das keimende junge Stäbchen hervortrat, zu erkennen. Die jungen Stäbchen sind gleich nach der Auskeimung auffallend plump und dick, werden jedoch besonders am nächsten Tage, also vor der Sporenbildung schmaler und kürzer, an den Enden sind sie jetzt auch nicht mehr, wie früher, abgerundet, sondern scharf abgestutzt, so daß sie beinahe viereckig erscheinen.

Da meine Keimungsbeobachtungen im wesentlichen mit denen Burchards übereinstimmen, begnüge ich mich, nur einzelne Besonderheiten hervorzuheben, anstatt die ganzen Versuche in extenso vorzuführen. Auch bei mir keimte *Bacterium angulans* äquatorial, nachdem sich die Spore etwas abgerundet hatte, die Keimungszeit war im höchsten Grade schwankend. Das Characteristicum jedoch, den höchst eigentümlichen Vorgang der Formveränderung an den Stäbchen, habe ich niemals beobachten können. Bei meinen Versuchen waren die Stäbchen

nicht gerade auffallend plump, aber an den Kanten stets abgerundet; eine nachmalige Verkürzung derselben konnte ich trotz vieler und genauer Versuche niemals bemerken. Da die Stäbchen unbeweglich waren, und auch kein zu lebhaftes Wachstum zeigten, gelang es mir, sie einige Tage unter einem Mefsapparat zu beobachten; ich habe jedoch niemals eine Verkürzung an demselben Bakterium beobachtet. Längere und kürzere Stäbchen kamen allerdings vor. Obgleich ich auch mehrfach Sporenbildung beobachten konnte, war eine Formveränderung im Sinne Burchards nicht zu konstatieren.

6. *Bacillus loxosporus* Burchard.

Burchard hat beobachtet, daß die Sporen des *Bacill. loxosporus* (um 10 Uhr bei 34° C., von 11 Uhr ab 35° C., von 1 Uhr ab 36° C. beobachtet!) bis 1 Uhr 50 Min. keine Veränderung zeigten, daß sich dann die Sporenhaut in zwei halbkugelige Hälften auseinanderklappt, aber nur aus der einen Hälfte das Stäbchen auskeimt. Es ist dies also ein äquatoriales Zerreißen der Sporenhaut, aber ein polares Keimen, « Es zeigte sich bei näherer Durchsichtung des Präparats, daß dieses eigenartige Aufklappen der Sporenmembran in zwei halbkugelige Hälften bei der Keimung aller Sporen auftritt, also ein für diese Art besonders charakteristisches Merkmal ist. Leider ist auch hier wieder nicht erwähnt, wie alt das Material war, mit dem die Untersuchung vorgenommen wurde.

Für meine eigenen Untersuchungen stand mir leider nur ein Material zur Verfügung, welches infolge seiner Kleinheit nur wenig instruktiv war. Dasselbe war, wie schon erwähnt, von Kral bezogen und wohl schon auf die verschiedensten Nährböden übergeimpft worden. Aus der Reihe meiner Beobachtungen will ich nur einen herausgreifen, welcher das, was ich gesehen habe, zeigen möge.

Bacillus loxosporus 4.

Material aus der Originalkultur, an der Luft getrocknet, mit Agar versehen, bei 32–34° C. beobachtet.

10 Uhr 45 Min. Sporen sehr klein, oval, stark lichtbrechend, scharf konturiert.

12 Uhr. Alle Sporen haben ihren Glanz verloren und erscheinen stark verquollen, ovale Form; jedoch an einzelnen Sporen eine minimale Längsstreckung.

12 Uhr 20 Min. Einige Sporen zeigen große Ähnlichkeit mit den keimenden Sporen von *Filamentosum*: In der Mitte eine helle oder dunkle Protoplasmabrücke und an den Rändern eine mondsichelförmige Differenzierung. Es hat den Anschein, als wollte die Spore sich teilen.

12 Uhr 45 Min. Die Sporen haben sich noch mehr gestreckt, so daß sie den Eindruck von Stäbchen hervorrufen.

1 Uhr 20 Min. Die Stäbchen sind vollkommen ausgewachsen, einige geteilt. Bei genauem Zuschauen kann man auch noch an den Enden einiger Stäbchen eine dunklere Kontur unterscheiden. Der Moment des Zerreißens der Membran war infolge der Kleinheit der Sporen trotz sorgfältiger und andauernder Beobachtung nicht zu erkennen.

Ich habe im ganzen ca. 30 Untersuchungen von *loxosporus* auf das Sorgfältigste beobachtet; ich konnte jedoch das, was Burchard konstant an allen Sporen beobachtete, nie wieder entdecken.

Wie aus den eben mitgeteilten Resultaten aus den von mir mit Burchardschen Bakterienarten vorgenommenen Untersuchungen zu ersehen ist, stimmten meine Beobachtungen mit den von Burchard mitgeteilten nur in den seltensten Fällen genau überein. Zuweilen jedoch waren die Differenzen so bedeutend, daß ich versucht war, anzunehmen, ich hätte nicht mit reinem Sporenmaterial gearbeitet, oder aber die Keimungsart einiger Bacillen, ihr Hauptkeimungsmodus zeigte sich derart von dem von Burchard angegebenen Characteristicum abweichend, daß ich überhaupt an eine andere Bakterienart denken mußte. Immer konnte ich aber durch den Vergleich der morphologischen und physiologischen Nachuntersuchung die Identität der betreffenden Art feststellen.

Daß Burchard das, was er seiner Arbeit angibt, gesehen hat, davon bin ich vollkommen überzeugt, glaube aber, daß er in gewissen Fällen zu schnell eine zufällig im Mikroskop beobachtete Keimungsvariation als charakteristisch für die untersuchte Bakterienart annahm, ohne die Art genügend beobachtet zu haben. Da ich bei keiner der Burchardschen Bakterienarten, die ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, den von Burchard als konstantes Characteristicum angegebenen Keimungsmodus als konstantes Merkmal erkennen konnte, habe ich noch einige frisch gezüchtete Arten auf die Konstanz in dem Auskeimungsmodus untersucht. Es kam mir dabei naturgemäß weniger auf die Frage, wie das betreffende Bakterium keimte, an, sondern vielmehr, wie viel Einzelindividuen derselben Art den vollkommen gleichen Keimungsmodus zeigten.

Im Nachfolgenden habe ich einige dieser Untersuchungen aus meinem Protokoll ausgewählt.

7. *Bacillus gangränosus pulpaе Arkövy.*

Dieser Bacillus wurde von Zahnarzt Zierler im hiesigen Institut isoliert und seine Keimung untersucht. Demselben verdanke ich auch das Material zu meinen Untersuchungen, von denen ich nur eine hier anführen will, zumal sie außer den Studien über die Konstanz nichts Neues zu bieten vermögen.

Das Material konnte trotz sorgfältigster Vorbehandlung nicht vollkommen von vegetativen Elementen befreit werden. Um das Präparat deutlicher zu machen, wurde eine Reinkultur $\frac{1}{2}$ Stunde lang auf 80° C. erwärmt, alsdann auf einem Deckglase fein verstrichen, an der Luft getrocknet, mit Agar versehen.

11 Uhr 45 Min. 8 Sporen gezeichnet; Form länglich oval, im Querschnitt rund, stark lichtbrechend, scharf konturiert.

12 Uhr 15 Min. Sporen Nr. 2, 3, 6, 7, 8 beginnen trüber zu werden und in der ganzen Circumferenz gleichmäßig zu verquellen.

12 Uhr 25 Min. Sporen 4 und 5 gleichfalls verquellen. Sporen 2, 3, 7 und 8 haben sich etwas abgerundet, ohne jedoch kugelig zu sein. Bei scharfem Zusehen kann man bei Spore 8 äquatorial eine minimale Ausbuchtung erkennen.

1 Uhr 30 Min. Die Ausbuchtung von Spore 8 läßt sich deutlich als ein keimendes Stäbchen erkennen, das sich vollkommen äquatorial durch die Membran hindurchdrängt und um 1 Uhr 30 Min. schon geteilt ist. Sporen 3 und 7 ebenfalls streng äquatorial gekeimt. Keimstäbchen vorne verbogen und zugespitzt. Spore 2 und 5 dagegen deutlich schräg polar ausgekeimt, wobei auch die Einrißstelle der Membran polarwärts verschoben erscheint.

4 Uhr. Die Keimstäbchen, anfangs unbeweglich, werden gewöhnlich nach der 1. Teilung beweglich. Zuweilen haftet ihnen noch, selbst wenn sie schon zu langen Fäden ausgewachsen sind, die Sporenmembran in Form einer Kappe an, von der sie sich, wie es scheint, zu befreien streben. Einige kürzere Fäden und einige Stäbchen tragen keine Membran mehr. Das zuerst aus der Spore heraustretende Stäbchen scheint keine Geißeln zu besitzen und zuweilen läßt sich beobachten, wie an einem langen Faden nur die ältere Hälfte beweglich ist, während die jüngere entweder still liegt oder passiv mitbewegt wird.

8. Aus der Luft gezüchteter Bacillus,

in den Formenkreis von *Bacillus subtilis* gehörend, von Herrn Professor Lehmann erhalten.

Das Material wurde auf einem Deckglase fein verstrichen, an der Luft getrocknet, mit Agar versehen und bei 32—34° C. beobachtet.

11 Uhr. Es werden einige Sporen im Gesichtsfelde fixiert und sogleich gezeichnet. Dieselben sind stark lichtbrechend, mit scharfer Kontur versehen, cylindrisch, an den Kanten etwas abgerundet. Zwischen ihnen einige einzelne Stäbchen verstreut, einige zu Fäden vereinigt.

12 Uhr 15 Min. Einige Sporen verlieren ihren Lichtglanz. Membranen verquollen, sowie der ganze Umriss der Sporen mit feinen Ausbuchtungen versehen. Sporen vollkommen kugelig.

12 Uhr 30 Min. Plötzlich bricht aus Spore Nr. 6 eine Vorwölbung äquatorial, wie es scheint, und ein wenig gekrümmt hervor und schiebt sich langsam weiter heraus. Auch an anderen Sporen ist das Gleiche zu beobachten.

1 Uhr. Einige Stäbchen haben ihre Sporenmembran abgestreift. Ein ungeteiltes Stäbchen, das etwas größer ist als die anderen, ist durch schlängelnde Bewegung bemüht, von seiner Membran loszukommen. Bei Spore 4 hatte ich Gelegenheit, den ganzen Vorgang der Keimung in allen Phasen zu beobachten (vgl. Tafel, Fig. 6). Nachdem die Spore vollkommene Kugelform angenommen, zeigen sich an der Peripherie hellere und dunklere Partien, bei denen man infolge der starken Verquellung nicht mit Sicherheit entscheiden kann, ob sie sich allein auf die Membran oder auch auf den protoplasmatischen Inhalt beziehen (a). Weiterhin zeigt sich die Oberfläche mit ganz feinen und nicht immer konstanten Verwölbungen versehen (b), welche jedoch verschwinden, je mehr sich nach einer Seite hin ein konischer Fortsatz hervordrängt. Dieser Fortsatz ist vielleicht etwas weniger lichtbrechend als die keimende Spore (c) und je weiter sein Wachstum fortschreitet, umso deutlicher wird diese Lichtdifferenz (d), ein Zeichen, daß die Membran durchrissen ist und sich zurückzuziehen beginnt. Das junge Stäbchen drängt jetzt weiter aus der Membran heraus, und die Membran zieht sich langsam über ihm zurück (e und f), um schließlich als ein scharfer Kontur dem einen Stäbchenende anzuhafte (g). Innerhalb der Sporenmembran macht sich jetzt ein hellerer Lichthof bemerkbar, der anzudeuten scheint, daß sich das junge Stäbchen von der Membran befreit. Das vorher im Verhältnis zur Sporenmembran und zu den bereits ausgeschlüpfen Stäbchen auffallend helle Keimstäbchen wird an seinen Konturen wesentlich dunkler, bis eine scharfe Linie die Stäbchenmembran erkennen läßt (g, h, i).

Welcher Art in diesem Falle die Keimung war, ist unmöglich festzustellen, wenn man nicht aus der früheren Lage der Spore Rückschlüsse macht. Das frisch ausgeschlüpfte Stäbchen scheint gewöhnlich nicht sogleich mit Geißeln versehen zu sein, es kommen jedoch auch soeben ausgekeimte Stäbchen zur Beobachtung, welche, kaum vollkommen aus der Sporenmembran hervorgequollen, schon in deutlicher, sehr angestrebter Bewegung bemüht zu sein scheinen, von derselben loszukommen. Derartige Zustände konnten bei Durchsuhung des Präparats in großer Anzahl konstatiert werden. Der größere Teil der Stäbchen ist im Bestreben, die Sporenmembran abzustreifen, erfolgreich.

Die Sporenbildung war schon nach 24 Stunden nach der Aussaat vollendet. Sie geht derart vor sich, daß ein Teil des Protoplasmas sich differenziert, aber im Gegensatz zum gewöhnlichen Typus derart, daß sich in dem Stäbchen, mehr dem einen Ende genähert, eine helle Zone des Protoplasmas ungefähr in der Größe der reifen Spore sondert, in der Form jedoch mehr oval als cylindrisch. Diese Sporenanlage scheint den übrigen Teil des Protoplasmas aus dem Stäbchen in sich aufzunehmen; denn sie wird, zuerst hell erscheinend, allmählich stärker lichtbrechend, bis sie mehr der cylindrischen Form sich nähernd, vollkommen einer reifen Spore gleicht. Nach 12 Stunden kann das ganze Stäbchenprotoplasma zur Spore verwandelt worden sein, so daß nur noch die Stäbchenmembran die reife Spore umschließt. In vielen, vielleicht den häufigsten Fällen, schwindet auch sie sehr schnell.

Von den vielen weiteren Beobachtungen in dieser Art beschreibe ich nur noch eine. Material in bekannter Weise behandelt; Agar, 32–34° C.

Nach 2 Stunden begann die erste Keimung, soweit zu erkennen, äquatorial. Doch waren bei manchen äquatorialen Keimungen geringe Abweichungen von der streng senkrechten Richtung des jungen Stäbchens zur Längsachse der keimenden Sporen zu beobachten. Eine Verschiebung der Rifsstelle nach den Polen zu war jedoch nicht zu erkennen. In allen Fällen ging dem eigentlichen Keimungsakte der Sporen eine Formveränderung derselben in der Weise voraus, daß dieselben sich mehr abrundeten, aber nicht immer Kugelform annahmen. Im allgemeinen erschienen sie mehr aufgequollen und ließen mehrfach wechselnde Ausbuchtungen der Membran deutlich erkennen (Prof. Lehmann). Das Stäbchen ist in ca. 2 Stunden vollkommen ausgeschlüpft und in diesem Falle waren die Stäbchen vor der ersten Teilung unbeweglich.

Die ganze Entwicklung dieses Bacillus von Spore zu Spore dauert kaum 24 Stunden, so daß ich in einigen Fällen sogar direkt die neugebildeten Sporen zur Untersuchung heranzog. Es zeigte sich jedoch, daß dieses Material im Laufe der Weiterimpfungen nicht mehr so regelmäÙig keimte, daß die Zahl der keimenden Sporen wesentlich verringert war und daß auch, besonders in der Auskeimungszeit, große Schwankungen beobachtet wurden.

Heubacillus 1.

Dieses Bacterium keimt nicht so präzis wie das aus der Luft gezüchtete. Es wird ein Präparat an der Luft getrocknet und mit Agar versehen bei 32–34° C. beobachtet.

11 Uhr stark lichtbrechend, cylindrische Sporen mit Stäbchen untermischt, ohne Eigenbewegung.

12 Uhr 35 Min. Sporen mehr ovale Gestalt, einige fast kugelig. Stäbchen lebhaft beweglich.

1 Uhr 2 Sporen ausgekeimt, schräg äquatorial. Eine Spore (c), die sich kugelig abgerundet hatte, keimt ebenfalls; sie macht den Eindruck, als ob sie streng äquatorial ausgekeimt ist; jedoch nach einigen Minuten zieht sich

die Membran an der einen Stelle etwas zurück, und die Keimung erscheint jetzt schräg polar. Bis zum nächsten Tage sind Sporen gebildet, mit denen der folgende Versuch angestellt wird.

Heubacillus 1.

Stäbchen durch Kochen bei 75° C. abgetötet. Agar 32–34° C.

1 Uhr 15 Min. Sporen fast cylindrisch, wenige Stäbchen unbeweglich.

3 Uhr. Nachdem die Sporen sich etwas abgerundet haben, keimen Spore 3 und 7 streng äquatorial aus. Bei Spore 7 wurde der Moment der Keimung gerade beobachtet. Er zeigte große Ähnlichkeit mit der Art, wie der Luftbacillus auskeimte; hier drang jedoch das junge Stäbchen gleich ein ganzes Ende aus dem Membranrifs hervor und die Sporenmembran kontrahierte sich plötzlich sichtbar.

3 Uhr 5 Min. Spore 5 und 6 äquatorial ausgekeimt.

3 Uhr 15 Min. Spore 4, vorher vollkommen kugelig, keimt mit einem plötzlichen Ruck, ähnlich Spore 7. Bis zum nächsten Tage Sporen gebildet, mit denen der folgende Versuch angestellt wird.

Heubacillus 1.

Stäbchen durch Kochen bei 75° abgetötet. Gelatine 32–34° C.

4 Uhr. Sporen fast cylindrisch, Kanten etwas abgerundet, wenige Stäbchen unbeweglich.

5 Uhr. Alle Sporen stark verquollen, ovale Form, Nr. 1 und 3 sehr stark vergrößert.

5 Uhr 45 Min. Spore 3 keimt mit einer Spitze deutlich schräg äquatorial, Spore 5 streng äquatorial mit einer breiten Kappe.

6 Uhr 5 Min. Spore 1 schräg äquatorial, Spore 4, vorher vollkommen kugelig, keimt mit einem plötzlichen Ruck.

Heubacillus 2.

Material nicht vorbehandelt, an der Luft getrocknet, mit Agar beschickt, bei 32–34° C. beobachtet.

I. Versuch. Sporen stark lichtbrechend, cylindrisch, mit abgerundeten Kanten, zeigen nach ca. 1 Stunde 15 Minuten, nachdem sie sich fast vollkommen abgerundet und stark vergrößert haben, mehr weniger streng äquatoriale Auskeimung. Es keimten von 14 beobachteten Sporen innerhalb 4 Stunden 35 Minuten alle 12 veränderten Sporen.

Am nächsten Morgen zeigte das Präparat reines Sporenmateriale, alte und neugebildete Sporen. Aus diesem wird ein Präparat für den

II. Versuch angefertigt, Luft getrocknet, Agar 32–34° C.

12 Uhr. 12 Sporen gezeichnet, stark lichtbrechend, cylindrisch, Kanten etwas abgerundet; alte und neue Sporen nicht zu unterscheiden. Spore 2 und 7 sind etwas mehr oval und weniger lichtbrechend.

1 Uhr. Einzelne Sporen stark verquollen, Lichtglanz verloren, und stark abgerundet.

1 Uhr 30 Min. Nr. 5 keimt deutlich schräg äquatorial. Der Membranrifs liegt etwas dem einen Pole zu, jedoch ist das junge Stäbchen nach der andern Seite gekrümmt.

4 Uhr 30 Min. Spore 1 deutlich schräg äquatorial ausgekeimt, Spore 2 und 3 unverändert, Spore 4 unverändert, Spore 5 zeigt noch deutlicher den schräg äquatorialen Typus. Spore 6 und 7 unverändert. Spore 8 keimt schräg polar mit einer seitlichen Abknickung des Stäbchens. Spore 9 deutlich streng äquatorial. Spore 10 unverändert. Spore a und b streng äquatorial. Der Vorgang der Keimung ist derselbe, wie er bei den früheren äquatorialen Auskeimungen beobachtet wurde. Bis zum nächsten Morgen hatte ein großer Teil der Stäbchen Sporen gebildet; einige fanden sich jedoch noch in voller Beweglichkeit. Es gelang mir zufällig, hieraus ein Präparat zu züchten, das im Gesichtsfelde reines Sporenmateriale zeigte. Dasselbe wurde für den

III. Versuch mit Agar beschickt und bei 32—34° C. beobachtet.

Von 7 beobachteten Sporen keimte 1 Spore noch ca. 1 Stunde 15 Min. Die nächsten 3 Keimungen konnten erst nach 4 Stunden beobachtet werden. Im weiteren Verlaufe zeigten sich die ausgekeimten Stäbchen nur selten frei herumschwimmend, sondern sie hatten eine ausgesprochene Neigung, zu langen, unbeweglichen Fäden auszuwachsen. (Beobachtet mit Herrn Prof. Lehmann.)

Am nächsten Morgen zeigten einige Fäden Sporen in unregelmäßigen Abständen, einige Stäbchen dieser Fäden hatten gar keine Sporen gebildet. Die Fäden waren deutlich, wenn auch etwas unregelmäßig septiert.

Zwei weitere Versuchsreihen, bei denen ich ebenfalls Sporenmateriale von Präparat auf Präparat überimpfte, zeigten mir ebenfalls deutlich:

1. dafs die Sporenkeimung unregelmäßiger wird,
2. dafs weniger Sporen auskeimen und auch
3. weniger Sporen gebildet werden.

II. Teil. Folgerungen aus den Beobachtungen; Vergleich meiner Resultate mit denen meiner Vorgänger.

Ein Blick in die Litteratur zeigt, dafs schon vor Burchard eine Reihe von Autoren Material zusammengebracht haben, welches den Beweis dafür liefert, dafs die verschiedenen Bakterienarten unter sich vielfach verschieden keimen. Aber aus den gleichen Arbeiten geht gleichzeitig hervor, dafs innerhalb derselben Bakterienart weitgehende Modifikationen des Keimungs-

1) P o m m e r (B. brassicae). Ein Beitrag zur Kenntniss der fadenbildenden Bakterien. Mitteil. a. d. botan. Inst. z. Graz. 1886.

typus zur Beobachtung gelangen. Es genügt wohl als Beweis hierfür zu erwähnen, daß schon Pommer¹⁾ (1886) an seinem *Bacillus brassicae* gefunden hat, daß die Sporenhaut nicht immer an ein und derselben Stelle durchbrochen wird, sondern manchmal am Pol, manchmal am Äquator oder auch an andern dazwischen liegenden Punkten; daß ferner Grethe¹⁾ ein Jahr vor Burchard an einem aus einem Papagei gezüchteten, sowie einigen Heubacillen ebenfalls alle Übergänge von der polaren bis zur äquatorialen Keimung beobachten konnte. »Durch diesen letzten Befund«, schreibt Mühlshlegel²⁾, »erklären sich auch die auseinandergelassenen Beobachtungen von Cohn und Prazmowski. Jener sah die Sporenkeimung des *Bacillus subtilis* polar, dieser äquatorial auskeimen.« Die Cohnsche Arbeit ist 1876, die Prazmowskische 1880 erschienen. Burchards Arbeit ist erst 1898 gedruckt worden. Trotzdem schreibt er auf Seite 56: »Bei der Keimung beobachtete ich ausnahmslos, daß dieselbe bei jeder Art in einer unveränderlichen und für die Art durchaus charakteristischen Weise stattfindet. Dies bestätigen ja auch die Beobachtungen der eingangs erwähnten anderen Forscher auf diesem Gebiete, soweit sie sich nicht auf die bloße Angabe der Art der Keimung allein beschränken.« Wie vorsichtig diese Behauptung Burchards von der »ausnahmslosen Unveränderlichkeit« und dem charakteristischen Wesen jeder einzelnen Bakterienart aufgenommen werden muß, möge, ehe ich unsere Beobachtungen im Zusammenhang vergleiche, an einem Beispiel gezeigt werden. Burchard hat die Keimung des *Bacterium filamentosum* nur an 4 Sporen beobachtet, von denen zwei nach 5 Stunden 40 Min. keimten. Jedoch nur eine von ihnen zeigte ein Charakteristicum, nämlich daß sich die Sporenmembran »seitlich etwas abhob«. Die beiden andern beobachteten Sporen keimten erst am Abend des nächsten

1) G. Grethe, Über die Keimung der Bakteriensporen. Sep.-Abdr. aus Fortschritte d. Medizin, Bd. 15, 1897.

2) Mühlshlegel, Über die Bildung und den Bau der Bakteriensporen. Fortschritte d. Medizin,

Tages, also nach ca. 36 Stunden; ob aber auch sie die seitlich etwas abgehobene Membran zeigten, erwähnt Burchard gar nicht. Zur weiteren Beurteilung der Burchardschen Angaben citiere ich aus seiner Zusammenfassung Absatz 4: »Es gibt Bakterien, die regelmäfsig bipolar keimen (*Bacillus bipolaris*)«, und zum Vergleich aus der Untersuchung von *bipolaris*, S. 36: »Sehr häufig sind unter zehn keimenden Sporen drei bis vier, die nur an einem Pole keimen«. Das sind bis zu 40%.

Dieses aus den Widersprüchen der Burchardschen Arbeit selbst! Ich gehe jetzt zum eigentlichen Thema: Der Konstanz und Verwendbarkeit der Sporenkeimung über.

Die Characteristica, welche Burchard als »das sicherste diagnostische Hilfsmittel zur Erkennung der Art« empfiehlt, erstrecken sich auf folgende Punkte:

- »1. Verhalten der Sporeumembran vor der Keimung,
- »2. Verhalten der alten Sporenhaut während der Keimung,
- »3. Art der Keimung des neuen Stäbchens,
- »4. Verhalten der alten Sporenhaut nach der Keimung,
- »5. Entwicklung des neuen Stäbchens,
- »6. Zeitdauer der Keimung, und
- »7. Temperaturverhältnisse.«

Um häufige Wiederholungen zu vermeiden, verzichte ich darauf, die Differenzen, welche meine Untersuchungen gegenüber der Burchardschen ergeben haben, noch einmal ausführlich an dieser Stelle wiederzugeben; dieselben finden sich oben am Schlusse jeder Untersuchung zusammengestellt. Nur das Prägnanteste habe ich für das Folgende herausgegriffen.

Die beiden Hauptforderungen, welche man an ein »sicherstes diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung der Art« naturgemäfs stellen mufs, sind neben der Möglichkeit, dasselbe überhaupt mit Sicherheit zu erkennen, die Feststellung, dafs es

1. nur der betreffenden Art zukommt, oder wenigstens
2. der betreffenden Art immer zukommt.

Meine Untersuchungen haben wohl zur Genüge gezeigt, daß diese beiden Forderungen von keinem, der von Burchard angegebenen diagnostischen Hilfsmittel in strengem Sinne erfüllt werden. Sowohl das Verhalten der Membran vor, während und nach der Keimung, als auch die Art der Keimung des neuen Stäbchens, sowie dessen weitere Entwicklung, sind bei fast allen von mir nachuntersuchten Arten als erheblich variabel innerhalb derselben Art erkannt worden:

Die Sporenmembran von *Bacterium Petroselini* liefs bei Burchard zwei Sporenhäute erkennen, die regelmäfsig nacheinander abgeworfen wurden. Diese Beobachtung soll für *B. Petroselini* das Erkennungsmerkmal bilden. Es sind jedoch schon von A. Mayer¹⁾ mittels Reagentien an andern Sporenmembranen zwei Häute als Exine und Intine beschrieben worden; ferner hat auch Mühlschlegel²⁾ an einer Reihe von Bacillensporen zwei Schichten der Membran, nämlich ein mattgraues, breiteres Endosporium und ein dünneres, als scharfe Linie erscheinendes Ekto-sporium färberisch nachweisen können. Bei meinen Versuchen mit *Petroselini* habe ich zwar zuweilen eine zweischichtige Sporenhaut während der Keimung unterscheiden können, jedoch nur zweimal habe ich bei einer gröfseren Reihe von Versuchen die beiden Häute hintereinander abstreifen sehen; meistens waren aber auch nicht einmal die beiden Schichtungen zu erkennen. Somit besitzt das *Bacterium Petroselini* Burchard das von seinem Entdecker angegebene Erkennungsmerkmal 1. nicht allein³⁾, und 2. läfst es dieses Merkmal nicht immer erkennen. Aber auch das Verhalten und die Entwicklung des Keimstäbchens, der eigentliche Auskeimungsmodus des *Bact.*

1) A. Mayer, Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an *Astasia asterospora* A. M. und *Bacillus tumescens* Zopf. Flora. Ergänzungsband, Bd. LXXXIV, 1897, Heft 3.

2) a. a. O.

3) Burchard hat offenbar durch Übersehen der zitierten Arbeiten die Bedeutung seiner schönen Beobachtung von der doppelten Sporenmembran überschätzt. Daraus erwächst ihm kein ernster Vorwurf. Ebenso halte ich es für möglich, daß die von Burchard beobachteten *Petroselinussporen* alle deutlich zwei Membranen erkennen liefsen.

Petroselini, den Burchard als polar beschreibt, zeigte mir weitgehende Variationen; in einem Falle war sogar die Auskeimung deutlich äquatorial und das keimende Stäbchen bog sich nach dem einen Pole um (vgl. S. 86, 87).

Vielleicht noch gröfsere Variationen, sowohl betreffs des Verhaltens der Membran als auch des jungen Stäbchens, beobachtete ich bei *Bacillus goniosporus* Burchard. Wie ich schon bei meinen Versuchen erwähnt habe, hat Burchard es unterlassen; das Characteristicum, welches er während der Keimung dieses *Bacillus* beobachtete, anzugeben. Ich nehme aus seiner Beschreibung an, dafs es auch hier wiederum in dem Verhalten der Sporenmembran zu suchen sei, welche nach der Keimung den Stäbchen als helles, durchsichtiges Mützchen aufsitzt. Aber jeder, der sich mit Sporenkeimung beschäftigt hat, wird zugeben müssen, dafs die Membran stets als helles Mützchen oder mehr weniger durchsichtige Kappe dem Stäbchenende aufsitzt, wenn es sich nicht um ein vollkommenes Verquellen derselben handelt. Dieses vollkommene Verquellen der Sporenmembran während der Keimung habe ich nun gerade bei *Goniosporus* unter bestimmten Bedingungen regelmäfsig erhalten. Nämlich, wenn ich die Untersuchungen in Gelatine vornahm. Züchtete ich den *Bacillus* auf Gelatine weiter und untersuchte ihn in Gelatine, so verquoll die Membran vollkommen, indes bei einer Keimungsbeobachtung dieses auf Gelatine weiter gezüchteten Materials im frischen Agar an der Mehrzahl der Sporen wieder eine Membran deutlich zu erkennen war (vgl. Versuchsreihe *Goniosporus* S. 81). Nicht ganz frischer Agar zeigte stets an allen Sporen eine Membran. Ich glaube deshalb mit einem gewissen Rechte für dieses verschiedene Verhalten der Membran, die Verschiedenheit der Nährböden in Anspruch nehmen zu dürfen. Migula schreibt in seinem »System der Bakterien«, Sporenkeimung S. 194: »Die Keimung ist verschieden, je nach dem Nährboden, in welchem sich die Spore befindet.« Koch hat keine Abhebung der Sporenmembran beobachten können »und in der That kommt es bei *Bac. anthracis* in flüssigen Nährsubstraten häufig nicht dazu«. In festen Nährböden spielt sich

der Keimungsprozesses jedoch derart ab, daß die Sporenmembran polar zerreißt:

Erkennen wir diese Einwirkung des Nährbodens, der niemals ein absolut konstanter ist, auf das Verhalten der Sporenmembran an, so erscheinen die Angaben Burchards, daß für eine ganze Reihe von Arten der Grad der Verschleimung der Sporenmembran bei der Keimung charakteristisch sei, mindestens weiterer Nachprüfung bedürftig. Ich selbst konnte von Kral keine Kulturen dieser Arten bekommen; bin jedoch subjektiv überzeugt, daß auch hier ähnliche Resultate wie bei *Goniosporus* erhalten werden.

Höchst eigentümlich war das Verhalten des keimenden Stäbchens von *Filamentosum* E. Klein. Dort fand ich nicht allein statt der von Burchard beschriebenen einfachen polaren Keimung ein eigentümliches, gekrümmtes Verhalten des Stäbchens vor der Keimung, sondern auch die Art der Keimung war im höchsten Grade wechselnd, bald polar, bald äquatorial. Eine hypothetische Erklärung dieser Variation aufzustellen, will ich mir versagen, da meine Untersuchungen mir noch keine genügende Stütze bilden. Erwähnt sei nur, daß *Bact. filamentosum*, sowie auch *Bac. loxosporus* Burchard, der sich ähnlich verhielt, schon längere Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet worden sind.

Auch die andern von mir nachuntersuchten Burchardschen Arten zeigten mehr weniger individuelle Variationen, welche ich stets am Ende jeder Untersuchung hervorgehoben habe.

Bacillus gangränosus pulpae keimte hauptsächlich äquatorial bis schräg äquatorial. Eine Besonderheit im Verhalten der Membran war mir nicht möglich festzustellen.

Es erübrigt nun noch auf die Keimung der von mir frisch gezüchteten Bacillen einzugehen. Um Wiederholungen zu vermeiden, verweise ich auch hier wiederholt betreffs eingehenderer Schilderung auf den untersuchenden Teil. Fasse ich die dort gemachten Untersuchungen zusammen, so ist hervorzuheben, daß dieselben, wenn auch nicht im Sinne Burchards konstant, so doch wesentlich regelmäßiger keimten als die Burchardschen

Arten. Und um die Probe auf das Exempel zu machen, konnte ich bei dem Weiterzüchten dieser Bacillen auf künstlichen Nährböden unter steter mikroskopischer Beobachtung feststellen, wie die einzelnen Arten immer unregelmäßiger keimten. (vgl. Versuchsreihe S. 93).

Weder die Zeit, welche bis zur Keimung verstreicht, noch die Temperatur, welche zur Keimung notwendig ist, liefert, wie ebenfalls aus meinen Untersuchungen in Übereinstimmung mit den anderen Autoren hervorgeht, höhere und brauchbare Speciesmerkmale.

Schlussfolgerungen.

Es lassen sich aus diesen Beobachtungen folgende Hauptresultate ziehen:

1. Es gibt verschiedene Typen der Sporenkeimung, und dieselbe ist bei den einzelnen Arten oft recht verschieden; jedoch zeigt sich auch innerhalb der einzelnen Arten zuweilen große Variabilität, indem oft in sehr erheblichem Prozentgehalt verschiedene Individuen wesentliche Abweichungen von dem für die Art festgesetzten Typus bilden.

2. Die Thatsache, dass bei der gleichen Bacillenart, je nach dem Nährboden, die Sporenmembran bald deutlich abgeworfen wird, bald vollkommen verquillt und dann verschwindet, muss bei Verwendung dieser Eigenschaft zur Artdiagnose sehr berücksichtigt werden.

3. Die Variabilität wächst mit dem Weiterzüchten auf künstlichen Nährböden. Es mag darin zum Teil die Verschiedenheit meiner Resultate von denen Burchards begründet sein.

4. Es gibt Bacillen mit zwei Sporenhäuten; jedoch ist hieraus beim gegenwärtigen Stand unserer Kenntnis kein Merkmal zur Erkennung einer bestimmten Art zu konstruieren.

5. Es gibt Bacillen, die bipolar keimen; jedoch zeigen bei den bisher beschriebenen Arten stets sehr viele Individuen einfach polare Keimung.

6. Ein Bedürfnis zur Aufstellung des Typus »schräg polare Keimung« scheint mir nicht zu bestehen. Stets finden sich bei polar wie äquatorial keimenden Arten eine Anzahl schräg polar keimender Individuen. — Spezies, die konstant schräg polar keimen und nicht sehr viele polar oder äquatorial keimende Individuen enthalten, erscheinen mir nicht einwandfrei beschrieben.

7. Nimmt die Spore vor der Keimung Kugelform an, so wird der Entscheid, ob äquatoriale oder polare Keimung stattfindet, unmöglich.

8. Aus allem Gesagten folgt als Endergebnis:

Die Art der Sporenkeimung ist ein Artmerkmal, das volle Aufmerksamkeit verdient. Die Behauptung aber, daß die Sporenkeimung für jede Art in durchaus unveränderlicher charakteristischer Weise verläuft und daher das sicherste diagnostische Hilfsmittel zur Erkennung der Art ist (Burchard), geht viel zu weit. Weder besitzt jede Art einen auffallend von den anderen Arten abweichenden Modus der Sporenkeimung, noch ist dieser Modus für jede Art konstant. Die Sporenkeimung variiert vielmehr, namentlich bei der längeren Kultur der Arten fast in ähnlicher Weise wie die übrigen morphologischen und biologischen Eigenschaften der Bakterien.

Die Sporenkeimung ist somit wohl unter den angeführten Einschränkungen ein beachtenswertes, aber keineswegs ein absolut charakteristisches, also auch kein ausreichendes Merkmal zur Artcharakterisierung.

Als ich gerade im Begriff war, Herrn Prof. Lehmann diese Arbeit vorzulegen, wurde mir von demselben eine bis heute¹⁾ in zweiter Fortsetzung erschienene Abhandlung von Dr. O. Gottheil, »Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien«, weil sie auch mein Gebiet streifte, zur Durchsicht übergeben. Aus derselben habe ich hervorzuheben, daß sich die dort niedergelegten Beobachtungen mit meinen Resultaten vollauf decken und eine

1) Zweite Fortsetzung, erschienen im Centralblatt f. Bakteriologie etc. Zweite Abhandlung, VII. Bd., Nr. 13. Jena, 10. Juni 1901. Untersuchung der Keimung der Sporen, S. 456.

nachträgliche wesentliche Stütze für die aufgestellten Thesen zu bilden wohl imstande sind.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Lehmann für die hilfreiche Unterstützung bei der Anstellung der Versuche, sowie für das grofse Interesse, welches derselbe dem Verlaufe dieser Arbeit entgegenbrachte, auch an dieser Stelle meinen tiefgefühltesten Dank auszusprechen.

Tafelerklärung.

Aus naheliegenden Gründen ist es unterlassen, alle auskeimenden Sporen in den einzelnen Phasen ihrer Entwicklung im Bilde festzuhalten; ich habe mich vielmehr begnügt, das Wichtigste, die Differenzen in den Keimungstypen derselben Art, zu fixieren.

- Fig. I. *Bacillus goniosporus*, frischer Agar, 32—34° C.
 - Fig. II. *Bacterium Petroselini*, Agar, 32—34° C.
 - Fig. III. *Bacterium Petroselini*, Agar, 32—34° C.
 - Fig. IV. *Bacterium filamentosum*, Agar, 32—34° C.
 - Fig. V. *Bacterium filamentosum* stark schematisiert.
 - Fig. VI. *Luftbacillus*, Spore 4, in den einzelnen Phasen ihrer Entwicklung.
-

Studien über die Absterbebedingungen der Sporen einiger Aspergillusarten.

Von
Prof. **A. Lode.**

(Aus dem hygienischen Institute der k. k. Universität in Innsbruck.)

Die ältere und auch die neuere Litteratur ist verhältnismäßig reich an Beobachtungen, welche mehr oder weniger tief eingreifende Störungen der Gesundheit betreffen, als deren Ursache Schimmelpilze und zwar in überwiegender Anzahl Aspergillusarten bezeichnet werden. Diese Erkrankungen betreffen nicht allein den Menschen, sondern zahlreiche Tierspezies, bei letzteren nicht selten die Form ausgebreiteter Epizootien annehmend, die den Stand der befallenen Tiere arg vermindern und wieder Anlaß zu Übertragungen auf den Menschen geben.

So ist die Pneumomycosis aspergillina nach Angabe französischer Autoren¹⁾ eine verhältnismäßig häufige Beobachtung.

In der Reihe der natürlich erkrankten Tiere scheinen die Vögel besonders stark vertreten. Aus einer Zusammenstellung der diesbezüglichen Litteratur von Schütz²⁾ in den Mitteilungen des kaiserlichen Reichsgesundheitsamtes ist zu entnehmen, daß fast alle Vogelarten, ich erwähne das Huhn, die Taube, die Gans,

1) Vgl. Frosch, Systematik der Fadenpilze in Flügges Handbuch der Mikroorganismen, II, S. 21.

2) Schütz, Über das Eindringen von Pilzsporen in die Atmungswege und die dadurch bedingten Erkrankungen der Lungen. Mitteilungen aus d. Reichs-Gesundheitsamte, II, S. 208.

den Schwan, Papagei, Fasan, Falken, Dompfaff, Holzhäher, die Schneeeule, den Straufs und Königsadler schwer und zum Tode führende Schimmelmikosen — vorwiegend die Lungen und die Luftsäcke betreffend — zeigen können.

Von den größeren Haustieren sind Fälle bei der Kuh und beim Pferde bekannt geworden.¹⁾

Künstlichen Infektionen, besonders leicht mit *aspergillus fumigatus*, sind außer verschiedenen Vogelarten (Gans, Taube, kleine Singvögel) auch Kaninchen zugänglich. Erstere, wie wir uns im hiesigen Laboratorium mehrfach überzeugten, am einfachsten, indem man die Versuchstiere in einen Raum bringt, in welchem sich reife, reichlich versportete Schalenkulturen, die man mittels eines Gebläses anbläst, befinden. Ebenso leicht gelingt die Infektion, wenn man die Versuchstiere mittels des Apparates von H. Buchner verspraysporensuspensionen einatmen läßt.

Bei Kaninchen führt die Injektion von Sporen in die Vene des Ohres oder in die äußere Jugularvene meist leicht zum Ziele²⁾, vorausgesetzt daß man genügend große Mengen Sporenmateriale des *Aspergillus fumigatus* injiziert hatte; als minder pathogen erwies sich *aspergillus flavus* und *aspergillus niger*. Wie Leber³⁾ zuerst beschrieb, gelingt auch die Ansiedelung des *Aspergillus* in der Hornhaut leicht, wenn man ein kleines Partikelchen des Pilzmyceliums in eine Hornhautwunde einführt oder eine indifferente Flüssigkeit, welche *Aspergillus*sporen suspendiert enthält, in das Hornhautgewebe einspritzt.

Bei den durch Inhalation infizierten Tauben entwickelt sich meist nach 2—3 Tagen ein schweres Krankheitsbild; die Tiere

1) s. Bournay, Pneumomycose aspergillaire chez une vache (Revue vét. de Toulouse, 1895, p. 121. — Frank, Deutsche Zeitschr. f. Tiermediz. in vergl. Path., XVI, 1890. — Lucet, Etudes chimiques et spérím. sur l'*aspergillus fumigatus*. (Boull. de la Soc. centr. de medic. vét. 30 juin 1894, u. a.

2) Grawitz, Über Schimmelvegetationen im tierischen Organismus. Virchows Arch., Bd. LXXXI.

3) Leber, Keratomycosis aspergillina als Ursache von Hypopyonkeratitis. Graefes Arch., Bd. 25, Abt. II, S. 285.

sitzen mit gestäubten Federn, die Atmung ist frequent und mühsam; nach wenigen Stunden bis mehreren Tagen tritt der Tod ein. In einem Falle trat der tödliche Ausgang in weniger als 36 Stunden ein, während Tiere, die gleichzeitig der Inhalation ausgesetzt waren, nach 12 und 15 Tagen der Infektion erlagen. Meist rascher und mit geringeren Mengen sind kleine Singvögel, wir verwendeten Gimpel, zu töten.

Bei der Sektion sieht man meist einen mehr oder minder ausgebreiteten Teil des Parenchyms beider Lungen verdichtet und blutreich. Die Ausstrichpräparate lassen neben zahlreichen Leukocyten, roten Blutkörperchen, gequollenen Alveolarepithelien, meist in stattlicher Anzahl die verästelten Mycelien des *Aspergillus* erkennen. Besonders schön sind die mikroskopischen Bilder im Schnittpräparate, das nach der Gram-Günther oder Gram-Weigertschen Färbung behandelt ist. Die Mycelien nehmen die Gramsche Färbung prächtig auf und lassen viel besser als im ungefärbten Präparate ihre weit in das Gewebe hineinragenden Fäden und Verästelungen erkennen.

In einigen Fällen waren die pathologischen Veränderungen nur auf die Lungen beschränkt, und weder das Mikroskop noch der Kulturversuch gestattete den Nachweis von Pilzelementen im Blute oder in den inneren Organen. In anderen Fällen waren jedoch mehr oder minder zahlreiche Herde, besonders an der Oberfläche der Nieren, des Peritoneums zu sehen, die kleinere und gröfsere Knötchen darstellten und teilweise oberflächlich zerfallen erschienen. In diesen Knoten konnte kulturell und auch leicht mikroskopisch die Anwesenheit von Pilzfäden festgestellt werden.

Beim Menschen treten *Aspergillus*mykosen hauptsächlich in drei Formen bzw. in drei Organen auf: 1. Als Mykosen des Respirationstraktus hauptsächlich in der Lunge, pneumonische Erkrankungen hervorrufend. Die Litteratur, sowohl die ausländische als auch die deutsche, enthält eine reiche Casuistik, auf die wir an dieser Stelle um so weniger einzugehen brauchen, als vor einigen Jahren Renon in einer Monographie: *Etude sur l'aspergillose chez les animaux et chez l'homme*, Paris 1897

das einschlägige Material gesichtet und kritisch besprochen hat. Hervorzuheben wäre allenfalls die nicht selten vorkommende Mischinfektion des Aspergillus mit dem Tuberkelcacillus. Interessant und gewerbehygienisch in der deutschen Litteratur, soweit ich dieselbe überschaue, nicht erwähnt sind die Pneumomykosen, welche die Taubenfütterer und die Haarkämmer häufig erleiden.

Das erstere Gewerbe¹⁾ les gaveurs de pigeons, in Paris kaum mehr als zehn Vertreter aufweisend, befasst sich mit dem Atzen der jungen, für den Markt aus Südfrankreich und Oberitalien hergesendeten Tauben. Auch während des Transportes werden die Tauben, z. B. auf dem Bahnhofe in Modena, von einem Gaveur gefüttert. Die Beschäftigung dieser Leute besteht in folgendem: Zuerst wird in einem Kübel eine Mischung hergestellt aus Wasser, Wickensamen und Hirsekörnern, worauf der Mann seinen Mund mit diesem Brei anfüllt. Hernach faßt er die Taube bei den Flügeln mit einer Hand, mit der anderen öffnet er den Schnabel, nähert denselben seinem Munde und schiebt, so viel die Taube aufnehmen kann, von der Nahrung in den geöffneten Rachen. Die ganze Manipulation dauert pro Taube nur wenige Sekunden, so daß jeder Atzer des Morgens und des Abends nicht weniger als je 2000, in der Hochsaison bis zu 6000 Tauben pro Tag zu füttern in der Lage ist.

Das zweite Gewerbe, welches zur Aspergillusmykose disponiert ist, ist das der Haarkämmer. Diese (les peigneurs de cheveux) befassen sich mit dem Sortieren der aus den Kehrichtkisten gesammelten menschlichen Haare, indem sie dieselben nach Länge, Farbe, Dicke ordnen, um sie den Coiffeuren hernach zu verkaufen. Wenn die Haare trocken sind, werden sie ohne weiteres gekämmt, sind sie hingegen fett, werden sie mit Roggenmehl bedeckt und behandelt. Bei dieser Arbeit kommt es zu starker Staubbelästigung durch den Mehlstaub, welcher bekanntermaßen Aspergillussporen in großer Menge enthält. Auch den Arbeitern scheint die Gefahr bekannt zu

1) Siehe Renon, a. a. O., 199 u. ff.

sein. Renon zitiert die Äußerung eines Kranken: »C'est la farine qui nous tue«.

Auch bei den Taubenmästern sind die den Futterkörnern anhaftenden Sporen vermutlich das ätiologische Moment.

Eine zweite Gruppe von Aspergilluserkrankungen beim Menschen betrifft die Hornhaut des Auges und wurde von Leber¹⁾ zuerst unter dem Namen Keratomycoosis aspergillina beschrieben. Es handelte sich um eine schwere Hypopyonkeratitis, welche ätiologisch deshalb interessant ist, weil der Krankheitsprozess nach einer Verletzung durch eine gegen das Auge angeflogene Haferspelse entstanden war.

Ein weiterer, von Uthoff²⁾ beschriebener Fall betrifft einen Mann, dem beim Schütteln eines Birnbaumes eine Birne an das Auge fiel. Weitere Fälle haben Fuchs³⁾, Uthoff, Axenfeld, Schirmer⁴⁾ u. a. veröffentlicht.

Die dritte Gruppe von Affektionen betrifft den äußeren Gehörgang. Aus der Fülle der einschlägigen Litteratur, die Siebenmann⁵⁾ bis zum Jahre 1889 und neuerdings Renon⁶⁾ gesammelt hat, ist zu ersehen, daß die Otomycoosis aspergillina eine überaus häufige Mykose ist, die desto häufiger beobachtet wird, je aufmerksamer man nach ihr sucht. So kommt nach Bezolds⁷⁾ Beobachtungen durchschnittlich auf 65 Ohrenkranke eine Pilzinvasion. Bezold hat allein 48 Fälle selbst beobachtet. Wreden verfügte bereits 1873 über 74 eigene Beobachtungen.

In einem Teile der Fälle handelt es sich nicht um Mykosen im eigentlichen Sinne des Wortes, sondern um eine harmlose Wucherung von Mycelien im Cerumen. In anderen Fällen dagegen dringen

1) Leber, Graefes Archiv, Bd. 25, II, S. 285.

2) Berliner klin. Wochenschrift, 1889, S. 39.

3) Wiener klin. Wochenschrift, 1894, S. 39.

4) Cit. nach Renon, a. a. O., S. 277 u. 278.

5) Siebenmann, Die Schimmelmikosen des menschlichen Ohres. Wiesbaden, 1889.

6) a. a. O., S. 280.

7) Bezold, Vortrag im Münchner ärztl. Verein, cit. n. Siebenmann, a. a. O., S. 37.

die Pilze in das Epithel des äußeren Gehörganges und des Trommelfelles, schwerere Symptome auslösend.

Als seltene Vorkommnisse seien nebenher auch die Aspergillusmykosen der Haut und des Nasenrachenraumes erwähnt.

Trotz der Manigfaltigkeit der beschriebenen Krankheitsbilder ist wenig Exaktes über die Abtötung der Krankheitserreger bekannt. Einzelne, meist nach unexakten Methoden ausgeführte Versuche über die Absterbebedingungen der Aspergillinen finden sich zwar, doch fehlt eine Einheitlichkeit der Versuchsanordnung und die Beobachtung jener Kautelen, die nur allein sichere Schlüsse über die Widerstandsfähigkeit einer Mikrobenart gestatten. Entsprechend der Unsicherheit unseres Wissens nach dieser Richtung ist auch das therapeutische Handeln der Autoren. Neben wirklich pilztötenden Agentien werden harmlose Präparate empfohlen oder Beimengungen zu desinfizierenden Flüssigkeiten gemacht, die als überflüssig für den Desinfektionseffekt sich erweisen. Aber auch in biologischer Hinsicht ist es interessant, den wichtigen Formenkreis der Schimmelpilze hinsichtlich seiner Absterbebedingungen in den Kreis einer Untersuchung zu ziehen. Nicht in letzter Linie sei auch hier nochmals der Epizootien gedacht, bei deren Bekämpfung naturgemäß eine wirksame Desinfektion der Ställe und Käfige, sowie der Gegenstände, mit welchen die Pfleglinge in Berührung kommen, zu erstreben ist. Ohne exakte einschlägige Versuche würde man sicherlich nicht auf dem besten und billigsten Wege zum Ziele gelangen.

Wir wollen im folgenden einige wichtigere Angaben über die Beeinflussung von Schimmelsporen durch physikalische Einflüsse oder chemische Agentien kurz anführen und hierbei nur jene Autoren erwähnen, welche systematische Untersuchungen über unsere Frage ausgeführt haben.

In erster Linie ist hier Siebenmann zu erwähnen, der eine Reihe einschlägiger Angaben¹⁾ in seiner Monographie über

1) Siebenmann, Die Schimmelmykosen des menschlichen Ohres. Medizin.-botan. Studien auf Grund experimenteller Untersuchungen. II. verm. Ausgabe von: Die Fadenpilze Aspergillus u. Eurotium. Wiesbaden, 1889, S. 26.

die Schimmelmikosen des menschlichen Ohres gemacht hat. Leider waren seine Methoden, und zwar sowohl die von ihm selbst als unbrauchbar bezeichnete erste, als auch die verbesserte zweite, nicht geeignet, irgend welche zum Vergleiche heranzuziehende Resultate zu liefern.

Anfangs wurde aus Conidien und Gelatine ein Brei gemacht und in diesen Seidenfäden getaucht; letztere wurden in die zu prüfende Flüssigkeit gegeben, getrocknet und auf Glasplatten mit einer von Prof. Lichtheim angegebenen Nährgelatine (mit Zusatz von Zucker und Ammon. oxal.) übergossen. Es ergab sich, daß Chlorwasser, Bromwasser 3%, Jodwasser $\frac{1}{7}$ ‰, Jodoformalkohol 4%, Naphthalinalkohol 6%, Salicylwasser 0,3%, Salicylalkohol, Alkohol konz., Karbolwasser 5%, Quecksilbersublimat 1‰ und eine wässrige konzentrierte Lösung von frischem Cerumen in 15 Minuten die lebensfähigen Sporen resp. Mycelien getötet hatten.

Das fehlerhafte dieser Methode liegt darin, daß die Seidenfäden mit einer Schichte Gelatine imprägniert wurden, welche einerseits ein Eindringen des Antiseptikums erschwert, andererseits die Anwendung der optimalen Temperatur (bei *Aspergillus* ca. 35° C.) unmöglich macht und auch den Luftzutritt, der für das Wachstum der Schimmelpilze notwendig ist, erschwert.

Den angeführten negativen Wachstumsergebnissen stehen positive gegenüber, die bei Anwendung einer wässrigen Lösung von Kalium chloricum 4%, Kaliseife 1%, Zinkchlorid 2% beobachtet waren.

In der zweiten Versuchsreihe wurden versportete Gelatine-kulturen in Stückchen von ca. 1 qcm zerschnitten und diese Stückchen in Antiseptica gebracht, abgespült und in Gelatine gelegt. Die früher hervorgehobenen Fehler der Methode sind der abgeänderten ebenfalls zur Last zu legen, wozu noch der Umstand kommt, daß in die jetzt beträchtlicheren Gelatinestücke noch schwieriger als in die imprägnierten Seidenfäden das Antiseptikum einzudringen vermag. Dementsprechend ungünstig sind auch die Sterilisationserfolge. So hatten nach zehnstündigem Verweilen in rektifiziertem Alkohol, in 1‰ Sublimat-

lösung, in gesättigtem Naphthalinalkohol, nach zwölfstündigem in gesättigten Bor- und Salicylsäurelösungen die in den Gewebestücken eingeschlossenen Sporen die Keimkraft noch nicht verloren; erst nach 12—20 stündigem Verweilen hatte der rektifizierte Alkohol desinfizierend gewirkt. 1% Bleiacetat erwies sich selbst nach 20 stündiger Einwirkungsdauer als unwirksam, ebenso 3% Karbolsäure nach zehnstündiger Einwirkung, während 5% Karbolwasser bei zehnstündiger Einwirkung getötet hatte.

4% Salicylalkohol tötete nach sechsstündiger Einwirkung unverlässlich, nach zehnstündiger sicher.

Interessant ist ferner Siebenmanns Angabe, daß Aspergillusconidien in stark ammoniak- oder schwefelammonhaltiger Luft in drei Tagen ihre Keimkraft völlig verloren hatten. Auch die Angabe, daß in einer Luft von 50—60° 12 Stunden zur Abtötung hingereicht hatten, verdient Beachtung.

Weiters wären zwei französische Autoren, die sich eingehender mit der Ätiologie der Aspergillusmykosen befaßt haben, zu erwähnen.

Renon widmet in seiner oben zitierten Monographie, S. 66, ein ganzes Kapitel der Resistenz der Sporen der Aspergillusarten. Er konstatiert ihre große Widerstandsfähigkeit gegenüber atmosphärischen Einflüssen; vier Jahre alte, im Laboratorium bewahrte Kulturen erwiesen sich lebensfähig. Auch bei geöffnetem Watterpfropf und völligem Eintrocknen der Raulinschen Flüssigkeit blieben die Sporen monatelang am Leben. Im infizierten Ei waren sie (Lucet) noch am Ende eines Jahres, in faulenden tierischen Flüssigkeiten nach einem Monate lebensfähig. Doch zeigten alte Sporen gegenüber jüngeren ein verzögertes Wachstum.

Kälte schädigt das Wachstum nicht, selbst wenn Temperaturen unter 0° C. einwirken. In einem Raume, dessen Temperatur des Nachts täglich auf 4—5° C. absank, waren die Sporen nach einem Monate lebensfähig. In einem Eisblock eingefrorene Sporen blieben durch zwei Monate entwicklungsfähig (Lucet). Gefriermikrotomschnitte der Kaninchenniere enthielten noch

lebende Sporen, ein Verhalten, das Lichtheim¹⁾ auch für die jungen Mycelien in den Pilzherden der Niere beschrieb.

Höheren Temperaturen gegenüber zeigte sich der Pilz ebenfalls recht widerstandsfähig. Im Wasserbad hielt er suspendiert in Sabouraudscher Flüssigkeit 60° C. durch 10 Minuten, 57° durch ¼ Stunde, 53° durch 48 Stunden aus. Dagegen ging er in 60gräd. Wasser in 5½ Stunden, bei 57° C. während 15 Stunden zu Grunde.

Von chemischen Desinficientien erwähnt Renon a. a. O. nur einen eigenen Versuch mit Quecksilbersublimat, das in einer Lösung von 1 : 1000, mit Weinsteinsäure angesäuert, nach einer Viertelstunde den Sporen ihre Keimfähigkeit geraubt hatte.

Auch im Tierkörper findet man die Sporen lange lebend. Ein von Renon zitierter Fall, in welchem ein Hase 5½ Monate nach der Infektion in der Leber den Nachweis von entwicklungs-fähigem Materiale zu erbringen gestattete, könnte freilich auch als chronische Aspergillusmykose gedeutet werden. Im Lymphsacke des Frosches und in den Organen desselben fanden sich 35 Tage nach der Impfung lebende Pilze²⁾. Ebensowenig vernichteten die Verdauungssäfte ihre Lebensfähigkeit, was aus der Untersuchung von Fäkalien, des Magen- und Darminhaltes von mit Pilzsporen gefütterten Kaninchen und Meerschweinchen erwiesen wurde.

In einem Berichte an die Société de biologie vom Jahre 1895³⁾ erwähnt Renon einige Versuche zur Feststellung der entwicklungs-hemmenden Konzentration des Silbernitrats. Mit Aspergillus fumigatus erhielt er negative Resultate bei Verwendung von 1—4 Tropfen einer Silbernitratlösung 1 : 100 für 4, 5 und 10 ccm Nährflüssigkeit, als welche die Raulinsche Flüssigkeit, die Maltoselösung von Sabouraud, Weinwürze, Bierwürze und Glycerinbouillon verwendet wurden.

1) Lichtheim, Über pathogene Schimmelpilze. I. Die Aspergillus-mykosen. Berliner klin. Wochenschr., 1882, Nr. 9.

2) Renon, Recherches sur le premier stad. de l'infection dans l'aspergillose expérim. Bull. med. Nr. 60, p. 717, 1896.

3) Renon, De la resistance des spores de l'aspergillus fumigatus. Comptes rend. de séances et memoires de la société de biologie, II. Bd., Ser. 10, 1895, p. 91.

Wenn man die hierbei erreichte Konzentration unter der Annahme, daß 20 Tropfen einem Kubikcentimeter, also 1 Tropfen 0,0005 g Silbernitrat entspricht, berechnet, so hat man in dem Falle, in welchem 4 Tropfen 4 ccm Flüssigkeit zugesetzt wurden, eine Lösung von $\frac{5}{10} \text{‰}$, bei Hinzufügung von 1 Tropfen zu 10 ccm $\frac{5}{100} \text{‰} = \frac{5}{1000} \text{‰}$.

Bedenkt man ferner die vermutlich stattfindende Bindung eines Teiles des Metallsalzes durch die organischen Verbindungen des Nährbodens, so begreift man die Unwirksamkeit der verwendeten Konzentrationen.

Wurden ferner feuchtes Brot oder Kartoffelscheiben in eine Lösung von 50 Tropfen Silbernitratlösung 1:100 zu 25 ccm Wasser, oder in eine Lösung von 5 Tropfen der gleichen Silberlösung zu 10 ccm Raulinscher Flüssigkeit getaucht, so trat nur im letzteren Falle einige Male Wachstumshemmung ein. In diesem Falle betragen die Konzentrationen nach meiner Berechnung im ersteren Falle rund $\frac{1}{10} \text{‰}$, bei Verwendung der Raulinschen Flüssigkeit $\frac{2.5}{100} \text{‰}$.

Mit Rücksicht darauf, daß sich Jodnatrium bei der Therapie der Aspergilluspneumomykose verhältnismäßig bewährt hatte¹⁾, wurde auch dieses Salz geprüft. Auch bei diesen Versuchen ist die Menge der verwendeten Lösungen nur in Tropfen angegeben und daher nur schätzungsweise ermittelbar. Der Jodkaligehalt in der verwendeten Würze resp. Raulinschen oder Sabouraudschen Lösung betrug $6\frac{1}{4}$ und $12\frac{1}{2} \text{‰}$. Der Erfolg war ein negativer.

Auch Lucet²⁾ stellte die Widerstandsfähigkeit der Aspergillussporen gegenüber einer Reihe atmosphärischer Einflüsse fest. Bei Zimmertemperatur und am Lichte hielten sich Kartoffelkulturen durch mehr als zwei Jahre. Ebenso lange waren sie auch, bei Zimmertemperatur bewahrt, auf Filtrierpapier eingetrocknet lebend. Im Brutschranke bei 37° C. bewahrte Kartoffelkulturen waren nach 10 Monaten in einem Eisblocke eingefrorene Sporen, noch nach 2 Monaten züchtbar.

1) Renon, Etude sur l'aspergillose. Loc. cit., p. 255.

2) Lucet, De l'aspergillus fumigatus chez les animaux domestiques et dans les œufs en incubation; étude clinique et expérimentale. Paris, 1897.

In faulenden Flüssigkeiten hielten sie sich durch einen Monat, in einem Abscesse bei einem Kaninchen durch 2 Monate. Einem Meerschweinchen und einem Pferde wurden Sporen per os einverleibt, nach einigen Tagen gelang ihr Nachweis in den Fäces. (Einwandfrei?)

Mit Sporen getränkte und getrocknete Seidenfäden waren nach 12stündigem Verweilen getötet in 5proz. Lösungen von Schwefelsäure, Salpetersäure, Phenol, Sublimat, Zinksulfat, Zinkchlorid und Silbernitrat; dagegen waren bei gleicher Konzentration und Einwirkungsdauer Salzsäure, Borsäure, Kupfer- und Eisensulfat, Calomel (5% Lösung?) und Crésyl Jeyes unwirksam.

Überblickt man die Ergebnisse, welche in den angeführten Berichten niedergelegt sind, so sind sie trotz einer ziemlichen Anzahl von Einzelversuchen, höchstens orientierend.

Dabei kranken Siebenmanns Versuche an einer unzuverlässigen, übrigens erst nach seinen Veröffentlichungen besser ausgebildeten Methodik. Lucets Angaben sind teilweise nicht einwandfrei und mindestens allzu skizzenhaft. Renons Angaben, insbesondere jene seiner antiseptischen Versuche mit chemischen Agentien sind hinsichtlich der Dosierung so ungenau, daß sie auf wissenschaftlichen Wert wenig Anspruch machen können. Freilich sind die zitierten Angaben klinischen Arbeiten entnommen, in denen die uns interessierenden Fragen nur nebenher behandelt wurden.

Eigene Desinfektionsversuche.

Den unmittelbaren Anlaß zur Ausführung der zu beschreibenden Experimente bildeten Kulturversuche, die zu diagnostischen Zwecken für die hiesige Ohren- und Kehlkopfklinik des Herrn Professors Juffinger ausgeführt wurden. Zunächst bekamen wir frisches, und, wie der Versuch mit Tauben und kleinen Vögeln ergab, virulentes Materiale des *Aspergillus fumigatus*. Dadurch wurde unser Interesse auf die Biologie der pathogenen Schimmelpilze gelenkt und auch die therapeutischen Bestrebungen bei — zunächst — Otomykosen studiert. Die auf diesem Gebiete herrschende Unsicherheit liefs sich leicht auf die dürftigen,

teilweise einander widersprechenden Angaben hinsichtlich der Absterbebedingungen der Schimmelpilze zurückführen, und so schien uns eine eingehende und systematische Prüfung dieser Frage wünschenswert.

Trotz grosser aufgewendeter Mühe, scheinen uns allerdings jetzt auch unsere Angaben noch vielfach lückenhaft und nur ein bescheidener Anfang für die systematische Bearbeitung des bezeichneten Gebietes.

An Mikroorganismen standen ausser den vorerwähnten, von Krankheitsfällen herstammenden, eine Reihe teils aus Luft oder verschiedenen Nährsubstraten frisch herausgezüchtete, teils in der Sammlung durch längere Zeit kultivierte Pilze zur Verfügung.

Um den Versuchen engere Grenzen zu ziehen, wurden zunächst nur Aspergillusarten und von diesen auch nur als pathogen erwiesene, oder in der Litteratur als solche angenommene, ausgewählt. Es waren dies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus flavescens*. Daneben wurde mit den meisten Agentien auch der *Aspergillus clavatus*, den ich der Sammlung des Wiener hygienischen Institutes verdanke, geprüft.

Bei der Schwierigkeit der exakten Diagnose der verschiedenen Arten will ich hier eine mit Messungen einzelner Pilzbestandteile ausgestattete Beschreibung vorbringen, damit erforderlichenfalls die Identifizierung meiner Arten mit anderen ermöglicht ist. Von jeder Art wurde ein Stamm, der rasch versporte und üppig wuchs, ausgewählt, hinsichtlich seiner optimalen Temperatur studiert und lediglich mit dessen Abkömmlingen weiter gearbeitet.

Beschreibung der Pilze.

I. *Aspergillus fumigatus*.

Stark verfilztes, in die Tiefe des Nährbodens eindringendes grauweisses bis weisses Mycel. Sobald Fruktifikation eingetreten ist, beginnen sich die Kolonien, die eine ansehnliche Grösse von mehreren Centimetern Durchmesser erreichen können, blau-grünlich zu verfärben. Die Gelatine wird unter dem Filze der Mycelien, nicht aber in der Umgebung der Kolonien erweicht. Das Mycel und die Fruchträger ragen wenig über die Oberfläche des Nährbodens hervor.

Sporen blafs, farblos, meist regelmässig rund, einfach konturiert, 2 bis 3 μ im Durchmesser. Reife Sporen bräunlich. Sterigmen unverzweigt, 6—8 μ

lang, cylindrisch, doch nicht regelmäfsig, oft auch pfriemenförmig, stellenweise verengt oder leicht aufgetrieben, blafsbraun. Dicke 2—3 μ . Die Sterigmen bedecken vorwiegend die Kuppe der Blase und zeigen der Hauptmasse nach axiales Wachstum, so dafs die mit Conidien bedeckten Köpfchen besenartig und nicht kugelartig erscheinen. Die Blase ist durch eine scharf konturierte Membran abgegrenzt. Die Fruchträger sind meist beträchtlich dicker als die Mycelien, erstere messen 2—3 μ , letztere gewöhnlich 4—6 μ , selbst bis 10 μ .

Intravenös für Kaninchen, nach Inhalation von Sporen für Gimpel, Stieglitze und Tauben pathogen.

II. *Aspergillus niger*.

Üppig wuchernde Vegetation, die die Gelatine stark verflüssigt. Die Verflüssigungszone reicht jedoch nicht weiter als die Vegetationsmasse. Das Mycel ist peripher rein weifs, gegen die Mitte zu, besonders bei jüngeren Kulturen, gelblich bis schwefelgelb; die fruktifizierten Partien braun bis tiefschwarz. Das Mycel ragt auch, solange noch keine Fruktifikation erfolgte, um mehrere Millimeter über die Oberfläche des Nährbodens. Die Höhe der Fruchträger beträgt bis 8 mm.

Mikroskopisch sieht man feinere und gröbere Mycelfäden, häufig mit stark granulierten Inhaltmassen versehen. Die Fruchträger sind scharf konturiert, 12—20 μ dick und meist vom Grunde bis zur Blase gleichmäfsig. Der Übergang in die meist schon kugelige, seltener eiförmige Blase ist ziemlich scharf.

Der Durchmesser reifer Köpfchen beträgt 150 μ und darüber, die Blase bei reifen Köpfchen ca. 60—70 μ . Die Sterigmen sitzen peripher um die ganze Blase. Die Sterigmen sind mächtig, verzweigt, indem an ihrem keulenförmigen Ende eine Anzahl (5—10) fingerförmige Äste sitzen, die die Conidien acrogen abschnüren. Die Sterigmengröfse schwankt auferordentlich und beträgt bei den grosen, reifen Köpfchen bis zu 50 μ und 60 μ . Zerquetschte oder beschädigte Blasen zeigen häufig eine Pilzform, indem der obere Teil der dem Fruchträger ansitzenden Blase sich einstülpt und teilweise umkrempt.

Die Sporen werden in ungeheuren Massen abgeschnürt und haben einen Durchmesser von 3—4 μ . Sie sind hellbraun bis schwarzbraun, im reifen Zustande stark konturiert, rund mit granuliertem Inhalt. Häufig ragen 1—2 bis 2 μ lange warzenförmige Erhebungen über die sonst glatte Oberfläche der Sporen, die als Reste der Verbindungsstücke der im unreifen Zustande kettenartig aneinanden gegliederten Conidien aufzufassen sind.

Auch in grössten Mengen Kaninchen intravenös injiziert oder Taubendurch Inhalation einverleibt, erwies sich unser Stamm als nicht pathogen.

III. *Aspergillus flavescens*.

Rasch wachsende Rasen aus rein weifsem Mycel bestehend. Die Fäden ragen, so lange keine Fruchträger gebildet sind, bis zu 6—8 mm über den Nährboden vor und erscheinen watteartig verfilzt. Die Gelatine wird unter der Kulturmasse erweicht. Die Sporen sitzen auf kurzen, wenig über die

Oberfläche ragenden Fruchträgern und zeigen eine gelbgrüne bis braune Färbung. Mikroskopisch erscheinen die Sporen bläsgelb, die reifen intensiv gelb ohne grünliche Verfärbung. Ihre Größe schwankt zwischen 3—6 μ , sie sind rund, jedoch häufig nicht regelmässig rund, indem vielfach Wärrchen und kleine Krystalle über die Oberfläche hervorragten. Der Sporenhalt ist granuliert und enthält stark lichtbrechende Körnchen.

Die Blase, deren grösster Durchmesser 12—14 μ beträgt, hat meist nur an der Kuppe die wenigen unverzweigten Sterigmen, die vorwiegend achsiales Wachstum zeigen und ca. 2—4 μ dick sind. Die Fruchträger sind mächtiger als die übrigen Mycelien und messen im Durchmesser 8—12 μ , während das übrige Mycel selten mehr als 4 μ im Durchmesser aufweist.

An Tauben und kleinen Singvögeln erwies sich der Stamm bei Inhalationsversuchen als nicht pathogen.

IV. *Aspergillus clavatus*.

Massige Vegetation, deren unversporete Anteile nur wenig über die Oberfläche ragen. Die Fruchträger sind auffallend hoch (bis 5 mm über der Oberfläche) und mit graublaugrünen reifen und weissen unreifen Köpfchen bedeckt. Eine Erweichung der Gelatine findet unter der Vegetationsmasse statt. Mikroskopisch unterscheidet man leicht die mächtigen 25—35 μ dicken Fruchträger von den zarteren 8—10 μ messenden Mycelien. Die Fruchträger endigen in massige Blasen von Keulenform, die dem Pilze seinen Namen gegeben haben. Die Dimensionen der Blase anzugeben, ist wegen der verschiedenen Größe einzelner Exemplare und wegen des allmählichen Überganges des Fruchträgers in die Keule schwierig. Rechnet man den Beginn der Blase vom Ansatz der ersten Sterigmen, so misst man oft 160 bis 200 μ Länge und ca. 60 μ Breite. Die Sterigmen sitzen pallisadenförmig auf der Blase und werden in aufserordentlich grosser Anzahl gebildet. Ihre Länge kann bis zu 20 μ angenommen werden. Die Conidien sind farblos, leicht oval und haben ca. 3 und 4 μ im Längen- bzw. Querdurchmesser.

Methodisches.

Für Prüfung der Widerstandsfähigkeit des Schimmelpilzmaterialies könnten einerseits die Mycelien, andererseits die Sporen in Betracht kommen, und in der That bestand zu Anfang der Plan, für beide Vegetationsformen die Wirkungswerte schädigender Agentien festzustellen. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass mit Mycelien kein einheitliches Resultat zu erzielen sei, indem für den Desinfektionserfolg die Größe der Mycelstückchen von ausschlaggebender Bedeutung war. So erhält man meist, offenbar wegen des, vielleicht durch Gerinnungsvorgänge erschwerten Eindringens des Antisepticums, bei Verwendung grösserer Partikelchen noch nach Einwirkungszeiten Wachstum, wo dasselbe bei kleineren

Flöckchen längst ausgeblieben war. Auch das Verfahren, die Aufschwemmungen vor dem Versuche zu filtrieren, was zur Erzielung gleichmäßiger Versuche auch bei Bakterienemulsionen gemacht werden muß, ist bei Verwendung von Mycelien ausgeschlossen, indem die langen Fäden zum größten Teile selbst am Leinwandfilter hängen bleiben, und man kaum getrübe, nur wenige Fadenstückchen haltende Filtrate erhält. Nach einigen orientierenden Versuchen erwies sich übrigens, daß die Widerstandsfähigkeit der Mycelien, abgesehen von den Misserfolgen bei Verwendung größerer Klümpchen von Mycelien, sicherlich nicht größer, sondern vermutlich viel kleiner ist als bei den Conidien, wozu noch der Vorteil kommt, daß man bei deren Verwendung ungleich gleichmäßiger und netter arbeiten kann.

In praxi würde man fast in allen Fällen, wo Desinfektionsmittel angewendet werden könnten, mit der Existenz von Conidien zu rechnen haben. So sicherlich bei den Vegetationen im äußeren Gehörgange, bei denen man stets fruktifizierte Fruchträger beobachtet. Auch in einem Falle von Pneumomycosis aspergillina fand ich im Sputum schöne versportete Köpfchen. Überall wo Luftzutritt zur Vegetation möglich ist, und das ist in allen Körperhöhlen, in den Luftwegen, bei Vegetationen der äußeren Haut und äußeren Schleimhaut, der Hornhaut u. s. w. der Fall, sind Conidien beobachtet oder wenigstens möglich. Ebenso hätte man bei der Desinfektion infizierter Objekte stets an die Dauerformen zu denken.

Eine weitere Frage war die nach Gewinnung zweckdienlichen Materials von möglichst hoher Widerstandskraft. Zu diesem Behufe wurde eine Anzahl von Nährböden mit Schimmelreinkulturen beschickt und mit diesen Materialien Desinfektionsversuche unter gleichen Bedingungen angestellt. Als Aussaatmaterial diente hauptsächlich *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger*. An Nährböden wurden verwendet: die Kartoffel, Bierwürzeagar und Bierwürzegeatine, Traubenmostagar bis zur nurmehr schwach-sauren Reaktion mit Sodalösung versetzt, Ra u l i n s c h e Flüssigkeit mit $1\frac{1}{2}\%$ Agar versetzt, Fleischwasserpeptonagar, Fleischwasserpeptongeatine, Schwarzbrot, Brotbrei und Weizenagar. Die Agar- und Kartoffelnährböden wurden sowohl bei Zimmertemperatur

als auch bei 30° und 37° C. wachsen gelassen; die Gelatine bei ca. 20° C. gehalten.

Ebenso wurde bezüglich des Nährbodens, in welchem die mit Agentien behandelten Sporen ausgesät wurden, vielfach variiert und sowohl die oben genannten festen als auch flüssigen Nährböden (Weinmost, Bierwürze, Peptonbouillon, Peptonwasser, Raulinsche Flüssigkeit) versucht. Bei der Prüfung chemischer Agentien wurden stets zwei Verdünnungen angelegt und hierbei auch die Anordnung ausprobiert, die erste Verdünnung in flüssige, die zweite auf einem festen Nährboden anzulegen, wobei die Besorgnis maßgebend war, bei Anlegung der ersten Aussaat auf den festen Nährboden etwas vom Antiseptikum zu übertragen und so erst auf der Kulturoberfläche Abtötung zu erzielen. Auch ist die Gefahr naheliegend, selbst durch die kleinen Mengen des übertragenen Antiseptikums auf die Kulturfläche den Nährboden so zu verändern, daß nur Entwicklungshemmung besteht, wo aus dem negativen Ausfall der Kultur Abtötung angenommen würde.

Die Gefahr der Übertragung die Entwicklung beeinflussenden Mengen des Antiseptikums auf den festen Nährboden besteht bei der zweiten Verdünnung nicht mehr. Doch erwies sich diese, die Technik der Versuche erschwerende Anordnung als unnötig, ja sogar minder zuverlässig, so daß in der Folge beide Verdünnungen in flüssige Nährböden angelegt wurden.

Als Beispiel dieser Kontrollversuche gebe ich hier einige Versuchsprotokolle.

Versuch Nr. 2.

Aussaatmaterial: *Aspergillus niger*, reichlich versport, auf Würzeagar gewachsen. Antisepticum 1¼ proz. Carbonsäure.

Tabelle I.

Zeitdauer der Einwirkung	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.	60 Min.	3 St.	17 St.	42 St.
	1. Übertragung in Bierwürze	+	+	+	+	+	+	—	—
2. Übertragung in Bierwürze	+	+	+	+	+	—	—	—	—
2. Übertragung auf schräg erstarrtes Würzeagar	+	+	+	+	+	—	—	—	—

Bei diesen Versuche¹⁾ wurde aus der Mischung der Sporenemulsion und 2¹/₂proz. Carbolsäure zu gleichen Teilen eine 1¹/₄proz. Carbolsäure-Sporenmischung erhalten und aus dieser nach gemessenen Zeiten mit der Öse in Bierwürze eine kleine Quantität übertragen. Dieses Würzeröhrchen wurde gut geschüttelt und diente zwei weiteren Aussaaten als Ausgangsmaterial. Einerseits wurde mit 3 Ösen je ein zweites Röhrchen Bierwürze, andererseits ebenfalls mit 3 Ösen ein schräg erstarrtes Bierwürzeagaröhrchen beschickt.

In beiden letzteren Röhrchen wuchsen die Aussaaten bis zur Einwirkungszeit von 30 Minuten, während Röhrchen 1 noch nach der Einwirkungszeit von 1 Stunde Wachstum erkennen liefs.

In diesem Falle war also das Resultat für die Würze und das Würzeagar gleichmäfsig.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch der

Versuch Nr. 5.

Aussaatmaterial und Konzentration der Carbolsäure wie bei Versuch Nr. 2.

Tabelle II.

Zeitdauer der Einwirkung	1 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 St.	18 St.
1. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	+	+	—
2. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	—	—	—
2. Übertragung auf Bierwürzenagar	+	+	+	—	—	—

Auch hier war die zweite Verdünnung nach der gleichen Einwirkungszeit steril geblieben und zwar sowohl bei flüssiger Würze als auch bei Würzeagar.

In den beiden folgenden Versuchen erwies sich jedoch die flüssige Würze entschieden überlegen.

Versuch Nr. 8.

Anordnung und Konzentration wie bei Versuch Nr. 2 und 5.

Tabelle III.

Zeitdauer der Einwirkung	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.
1. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	+	—	—
2. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	—	—	—
2. Übertragung auf Bierwürzenagar	+	+	—	—	—	—

und ähnlich

1) Das +-Zeichen bedeutet Wachstum, also negativen, das —-Zeichen Ausbleiben des Wachstums, also positiven Desinfektionserfolg.

Versuch Nr. 11.

Tabelle IV.

Zeitdauer der Einwirkung	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.
1. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	+	+	—
2. Übertragung in Bierwürze . . .	+	+	+	+	—	—
3. Übertragung auf Bierwürzenagar	+	+	+	—	—	—

Ähnliche Erfahrungen machten wir auch dann, wenn die erste Verdünnung in Peptonbouillon, die zweite auf Fleischwasser-peptonagar gemacht wurde.

Versuch Nr. 3.

Anordnung hinsichtlich Material und Konzentration der Carbonsäure wie bei den vorigen Versuchen.

Tabelle V.

Zeitdauer der Einwirkung	1 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	45 Min.	1 St.	16 St.
1. Aussaat in leichtalkal. Peptonbouillon	+	+	+	+	+	+	—
2. Verdünnung in Bouillon	+	+	+	+	—	—	—
2. Verdünnung auf gewöhnl. Nähragar .	+	+	+	—	—	—	—

In manchen Versuchen erwies sich überhaupt die gewöhnliche Nährbouillon als minder geeignet; in einem Falle war nach 10 Minuten langer Einwirkung der Nährboden steril geblieben, während der gleichzeitig angelegte Kontrollversuch mit Würze noch nach 1 Stunde Kulturen ergab.

Von den anderen Nährböden erwies sich sterilisierter Traubenmost als ebenbürtig der Bierwürze. Diesen Nährboden haben wir jedoch ausgeschaltet, da er nicht während das ganzen Jahres zur Verfügung steht und hinsichtlich seiner Zusammensetzung starken Schwankungen unterworfen ist.

Gegen die Kartoffel, das Brot und den Brei gelten die Einwände, wie hinsichtlich aller festen Nährböden. Wir haben sie daher trotz nicht ungünstiger orientierender Versuche in der Folge nicht mehr verwendet.

Der Weizenagar gibt überdies zu dürftige Kulturen. Gelatine-nährböden waren ausgeschlossen, wenn wir der berechtigten Forderung, das Wachstum der beschickten Nährböden bei den

optimalen Temperaturen vor sich gehen zu lassen, genügen wollten.

Die von französischen Autoren so empfohlene Raulinsche Flüssigkeit erwies sich dagegen für die Aufzucht von durch ein Antiseptikum geschädigten Sporen als minder geeignet, obwohl sie wenigstens bei *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger* bei Verwendung guten Ausgangsmaterials üppige und schnell wachsende Kulturen lieferte. *Aspergillus flavescens* wuchs dagegen nur kümmerlich; *Aspergillus clavatus* in einigen Fällen gar nicht, in anderen erst nach mehrtägigem Stehen und auch dann nur dürrtig.

Unsere Raulinsche Flüssigkeit bestand nach der Angabe von Siebenmann¹⁾ aus folgenden Bestandteilen:

Wasser	1500
Kandiszucker	70
Weinsteinsäure	4,0
phosphorsaures Ammon	0,6
Kaliumcarbonat	0,6
Magnesiumcarbonat	0,4
schwefelsaures Ammon	0,25
Eisensulfat (Ferrosulfat)	0,07
Zinksulfat	0,07
kieselsaures Kalium	0,07
essigsäures Ammon	4,00.

Ich bemerke, daß die Zusammensetzung der Raulinschen Flüssigkeit, die Obici²⁾ angibt, insofern von der oben citierten abweicht, als an Stelle des essigsauren Ammons salpetersaures Ammon angegeben ist. Doch auch diese Modifikation lieferte uns keine besseren Resultate. Wir blieben daher bei der erprobten, aus einem hiesigen Brauhause stets in vorzüglicher Qualität erhältlichen Bierwürze, die noch zur Hälfte mit Wasser verdünnt und nicht neutralisiert wurde.

1) Siebenmann, Die Schimmelmikosen des menschlichen Ohres. a. a. O., S. 16.

2) Obici, Zieglers Beiträge zur pathol. Anat., 1898, S. 205.

Wir haben auch zur Gewinnung der Sporensorten wegen des üppigen Wachstums und der Möglichkeit reinlicher Gewinnung des Materials in der Folge nur Bierwürzeagar verwendet und von der anfänglich auch verwendeten Kartoffel und dem Brotbrei, die ohne Beimengung von Nährbodenteilen schwer vollständig ausgenutzt werden konnten, abgesehen.

Einige Versuche sollten auch die Frage entscheiden, ob junges oder älteres, ob bei niedriger oder optimaler Temperatur gezogenes Material den Vorzug verdiene. Hierbei konnte festgestellt werden, daß, reichliches Wachstum vorausgesetzt, jüngere und ältere Kulturen (bis 8 Wochen alte wurden geprüft) keinen gesetzmäßigen Unterschied hinsichtlich ihrer Widerstandskraft erkennen lassen; ebenso war es gleichgültig, ob die zur Sporengewinnung gezogenen Vegetationen, z. B. *Aspergillus niger*, bei Zimmertemperatur, bei 30° C. oder bei 37° C. gezogen worden waren.

I. Prüfung chemischer Agentien.

Hinsichtlich der Technik der Versuche wurde im allgemeinen nach dem im hiesigen Institute üblichen Verfahren, das den von M. Gruber¹⁾ auf dem VII. internationalen Kongresse für Hygiene und Demographie in London 1891 hinsichtlich der Prüfung von Antiseptics angegebenen Forderungen Rechnung trägt, gearbeitet.

Es wurden nur wässrige Emulsionen von Sporen verwendet. Diese Emulsionen wurden durch Abkratzen der auf schräg erstarrter Bierwürze gewachsenen Kulturen oder Aufnahme derselben mit feuchtem sterilen Pinsel in wenigen Kubikcentimetern sterilen Wassers gesammelt. Die gewonnene Emulsion wurde behufs Abscheidung gröberer Partikelchen, insbesondere von Mycelstücken, durch sterile Leinwandfleckchen filtriert und in den Fällen, wo dies anging, die Konzentration des Desinfektionsmittels so gewählt, daß zu gleichen Teilen Sporenemulsion und Desinfektionsmittel zusammengebracht werden konnten. Selbstver-

1) M. Gruber, Über die Methoden der Prüfung von Desinfektionsmitteln. Vierteljahrsh. f. Gesundheitspflege, Bd. 24, S. 199.

ständiglich wurde die Zeit auf das Genaueste registriert. Die Sporenemulsionen wurden möglichst dicht hergestellt. Bei dem üppigen Wachstum der Sporen bei geeigneten Kulturmedien war die Ausbeute von 1—2 Röhrrchen für etwa 5—10 ccm Flüssigkeit ausreichend. Die filtrierte Emulsion war sehr stark getrübt und wies mikroskopisch eine Unmasse Sporen auf. Um dies Ziel zu erreichen, darf nicht mit zu jungen Kulturen gearbeitet werden; ein bis zwei Wochen alte Kulturen lieferten stets die gewünschte hohe Ausbeute.

In einigen Fällen, in welchen das Infektionsmittel unverdünnt zur Anwendung kommen sollte, z. B. bei Verwendung von absolutem Alkohol wurde die Sporenmasse mit einem trockenen sterilen Pinsel aufgenommen; der Pinsel wurde hierauf unter Kontrolle der Uhr in das zu prüfende Antisepticum eingebracht, gut umhergeschwenkt und hierauf zur Vermeidung allenfalls unbenetzter, z. B. schwimmender Sporen, filtriert und vom Filtrate die Aussaaten mit Bezug auf die vorhin notierte Zeit angestellt. Die Filtration erwies sich auch bei dieser Anordnung zur Erzielung gleichmäßiger Resultate unbedingt notwendig.

Die Aussaaten wurden, wie früher erwähnt, in Bierwürze und zwar mittels einer mittelgroßen Platinöse übertragen. In das erste Röhrrchen wurde eine, in das Verdünnungsröhrrchen je drei Ösen gegeben.

Von Wichtigkeit ist es, die Röhrrchen durch genügend lange Zeit zu beobachten. Während ohne Schädigung eingesäte Sporen in 2—3 Tagen einen üppigen Rasen an der Oberfläche der Würze bilden und meist schon stark versport sind, erfolgte bei den durch Antiseptica geschädigten Sporen häufig eine beträchtliche Verzögerung des Wachstums, das nicht selten erst am 8.—12. Tage sichtbar war. Nach der Aussaat wurden die Kulturröhrrchen sobald als möglich in optimale Temperaturen gebracht und zwar bei *Aspergillus fumigatus*, *niger* und *flavescens* in den auf 37° C., bei *Aspergillus clavatus* in den auf 30° C. erwärmten Brutofen.

Große Sorgfalt wurde der Herstellung der Lösungen der Antiseptica gewidmet. Wo irgend angängig, wurde der Titre der Lösung ermittelt; in Fällen, wo dies nicht geschah, von den

128 Studien üb. d. Absterbebedingungen d. Sporen einiger Aspergillusarten.
reinsten, vielfach neuerdings gereinigten (unkrystallisierten) Präparaten ausgegangen.

Metallsalze.

In sehr zahlreichen Versuchen wurde das Quecksilbersublimat in wässriger Lösung ohne Zusatz von Kochsalz oder Weinsäure geprüft. Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen für die vier geprüften Schimmelpilzsporen zusammengestellt.

Tabelle VI.
Sporen des *Aspergillus fumigatus*.

Vers.-Nr.	Konzentration	30 Sek.	1 Min.	1 1/2 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	1 St. 40 Min.	2 St.
178	1 ‰	+	+	+	+	-						
169	1 ‰				+	-	-					
174	1/2 ‰				+	-	-	-				
176	1/4 ‰				+	-	-	-				
187	1/8 ‰				+	-	-	-				
189	1 ‰					+	+	+	+	-		
192	1/2 ‰					+	+	+	+	+		
195	1/4 ‰					+	+	+	+	+	-	
200	1/8 ‰					+	+	+	+	+	+	+

Tabelle VII.
Sporen des *Aspergillus niger*.

Versuchs-Nr.	Konzentration	15 Sek.	45 Sek.	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
185	1 ‰	+	+	-	-	-					
173	1 ‰				+	-	-	-	-		
170	0,5 ‰				+	-	-	-	-		
190	0,5 ‰					+	-	-	-	-	
180	1/4 ‰				+	+	-	-	-	-	
182	1/8 ‰				+	+	+	+	-	-	
202	1 ‰					+	+	+	+	-	
110	1/2 ‰					+	+	+	+	-	
42	1/4 ‰					+	+	+	+	+	
20	1/4 ‰					+	+	+	+	+	
198	1/8 ‰					+	+	+	+	+	+

Tabelle VIII.
Sporen des Aspergillus flavescens.

Versuchs-Nr.	Konzentration	15 Sek.	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
184	1 ‰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
204(u.172)	1 ‰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
171	1/3 ‰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
181	1/4 ‰	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
183	1/8 ‰	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
203	1 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—
191	1/2 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
195	1/4 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—
199	1/8 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Tabelle IX.
Sporen des Aspergillus clavatus.

Versuchs-Nr.	Konzentration	15 Sek.	30 Sek.	1 Min.	2 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
179(u.168)	1 ‰	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
175	1/2 ‰	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
177	1/4 ‰	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
186	1/8 ‰	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
188	1 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
193	1/2 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—
197	1/4 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—
201	1/8 ‰ ₀₀	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—

Wie aus den Tabellen hervorgeht, erwies sich das Sublimat, wenigstens in den höher konzentrierten Lösungen (bis etwa 1/4 ‰), als ein wirksames Antisepticum. Die in der Regel verwendete 1 ‰₀₀ Lösung erfordert dagegen bei *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger* 1 Stunde; bei *Aspergillus flavescens* 1/4 Stunde, bei *Aspergillus clavatus* 10 Minuten Abtötungszeit. Noch niederere Konzentrationen sind wegen ihrer unverlässlichen Wirkung kaum empfehlenswert.

Das Silbernitrat wurde in 4 Konzentrationen geprüft und zwar als 1/20-Normallösung (0,85 ‰₀), ferner in einer weiteren Versuchsreihe in 1 ‰₀, 1/2 ‰₀ und 1 ‰₀₀ Lösung.

Die Resultate ergibt die nachfolgende Tabelle auszugsweise.

Tabelle X.
Silbernitrat.

Material	Konzentration	Einwirkungszeit				
		2 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 St.
Aspergillus fumigatus	1 ‰	+	+	—	—	—
	1/2 ‰	+	+	—	—	—
Aspergillus niger	1 ‰	+	—	—	—	—
	1/100	—	—	+	—	—
Aspergillus clavatus	1 ‰	+	—	—	—	—
	1/3 ‰	+	+	—	—	—
	1/100	—	—	+	—	—
Aspergillus flavescens	1 ‰	—	—	—	—	—
	1/3 ‰	—	—	—	—	—
	1/100	—	—	—	—	—

Es erwies sich demnach dieses Salz dem Sublimate in 1 ‰-Lösung als gleichwertig, in 1/100 sogar um ein Geringes überlegen.

Ähnliche Ergebnisse wie die 1 ‰-Lösung lieferte auch die 1/20-Normallösung.

Von anderen Metallsalzen wurden Zinksulfat, Zinkchlorid und Kupfersulfat in 10 ‰-Lösungen bis zu einer Einwirkungszeit von 6 Tagen geprüft.

In allen Fällen erfolgte, selbst bei den weniger widerstandsfähigeren *Aspergillus flavescens* und *clavatus*, ein nicht verzögertes üppiges Wachstum.

Die genannten Körper sind daher selbst in den hohen angewendeten Konzentrationen nicht als Antiseptica zu betrachten, eine Thatsache, die verwunderlich erscheint, nachdem speziell das Kupfersulfat bei der Bekämpfung mancher pilzlichen Erkrankungen des Weinstockes und des Obstbaumes, z. B. *Pero-nospora*, eine bewährte Rolle spielt, und u. a. im Handbuch der Ohrenheilkunde von Schwartz 1893, II, S. 66 eine 2proz. Lösung von *Cupr. sulfuricum* bei mycotischen Erkrankungen des Trommelfelles empfohlen wird.

Ebensowenig günstige Resultate erzielten wir mit einigen anderen Neutralsalzen, z. B. Kochsalz in 50%, Calciumchlorid in 30%, Natriumsulfat in kaltgesättigter Lösung.

Säuren und Alkalien.

Mit Rücksicht darauf, daß vielfach bei Schimmelmikroskopen des äußeren Gehörganges Säuren in schwachen Lösungen sowohl in Wasser als in Alkohol empfohlen wurden, haben wir viele Säuren, sowohl anorganische als organische, hinsichtlich ihrer baktericiden Fähigkeit eingehend geprüft.

Mit Rücksicht auf das unter Behrings Leitung von Lingelheim aufgefundene Gesetz, wonach bei Säuren die besondere Natur der Säure nicht, wohl aber der Titre der Lösung in Frage kommt, haben wir zunächst eine Anzahl Säuren vom gleichen Gehalt hergestellt. Bereitet wurden doppelt Normalsäuren der Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, ferner der Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure und Weinsteinsäure; verwendet wurden die Säuren, nachdem je die gleiche Menge der Emulsion von Sporen zugesetzt worden war, als einfache Normalsäuren.

Ferner wurde eine Reihe kalt gesättigter Säurelösungen von im Wasser schwerlöslichen Säuren hergestellt; letzteres mit Rücksicht darauf, daß eine Reihe der hier anzuführenden therapeutisch empfohlen werden. Solche Lösungen wurden hergestellt mit Borsäure, Salicylsäure, Benzoesäure, Pikrinsäure, Gallussäure, Pyrogallussäure.

Die antiseptischen Erfolge sind mit diesen Konzentrationen außerordentlich geringfügig.

In Normalschwefelsäure war der *Aspergillus niger* nach 4 Tagen noch lebensfähig¹⁾; in der gleichen Säurelösung war ein kräftiger *Staphylococcus aureus* nach 4 Stunden vernichtet worden.

In Normalsalpetersäure war in einem Falle nach 4, im anderen nach 6¹⁾ Tagen *Aspergillus niger* lebensfähig.

In Normalsalzsäure wurde der *Aspergillus fumigatus* nach 4, der *Aspergillus niger* nach 6 Tagen wachstumsfähig gefunden.

1) Längere Zeiträume wurden nicht geprüft.

Gleiche Ergebnisse mit den Sporen des *Aspergillus niger* lieferte die Normalphosphorsäure nach 6 Tagen (*Staphylococcus aureus* ging nach 3 Stunden zu Grunde), die Chromsäure nach 4 und 6 Tagen, die Ameisensäure nach 4 und 6 Tagen (*Staphylococcus aureus* war nach 2 Stunden abgetötet), die Essigsäure nach 4 und 6 Tagen (Kontroll-Aureus in 2 Stunden vernichtet), Citronensäure und Milchsäure nach 4 und 6 Tagen (letztere tötete den Aureus nach 3 Stunden).

Es hatte also keine einzige Normalsäure die Sporen des geprüften Schimmelpilzes, selbst nach 6 Tagen, abgetötet.

Von den kaltgesättigten, oben angeführten Säuren wurde die Borsäure, die Salicylsäure, die Pikrinsäure, die Benzoesäure und die Gallussäure bis zu 7 Tagen, die Pyrogallussäure bis zu 4 Tagen geprüft. Keiner der Versuche zeigte Abtötung, noch erhebliche Entwicklungshemmung. Das gleiche Resultat ergaben 3 Versuche mit 5proz. Lösungen von *Acidum tannicum*. In allen ausgesäten Röhrrchen wuchs, ebenso auch bei den vorzitierten Versuchen mit Normalsäure, auch das Röhrrchen zweiter Verdünnung, zum Beweise, daß es nicht einmal zu einer starken Herabsetzung der Zahl der keimfähigen Sporen gekommen war.

Höher konzentrierte Säuren scheinen auch außerordentlich lange Zeiträume zur Abtötung zu erfordern, sofern nicht die Konzentration, z. B. bei der Schwefelsäure, eine so hohe ist, daß es einfach zur Verkohlung des organischen Materiales kommt. Aus 27,93% Schwefelsäure wuchs der *Aspergillus niger* noch nach 5 Tagen, und selbst der sonst verhältnismäßig leicht abzutötende *Aspergillus clavatus* nach 3 Tagen. Eine große Anzahl einschlägiger Versuche erscheint wertlos, da nur Zeiträume bis zu einer Stunde geprüft wurden.

Eine recht hohe Wirksamkeit entfaltete dagegen in wässriger Lösung die schwefelige Säure; wir stellten sie her, indem unter einer Glocke Schwefelfäden verbrannt und die Verbrennungsgase in einer Gaswaschflasche durch Wasser geleitet wurden. Der Titre, mit Jod gestellt, ergab einen Wirkungswert von 0,732% SO_2 .

Mit der halb verdünnten Lösung mit einem Prozentgehalt von 0,366 wurden die Sporen aller unserer Schimmelpilze geprüft

(Tab. XI); es ergab sich, daß die Sporen des *Aspergillus niger* und *flavescens* eine Einwirkungszeit von 1 Stunde, die des *Aspergillus fumigatus* und *clavatus* von einer halben Stunde zur Abtötung erforderten.

Tabelle XI.
SO₂ 0,366 %.

Versuchs-Nr.	Material: Sporen von Aspergillen	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
306	niger	+	+	—	—
305	flavescens	+	+	—	—
307	clavatus	+	—	—	—
308	fumigatus	+	—	—	—

Von Alkalien wurde Natronlauge, kohlensaures Natron, Ammoniak und Kalkmilch geprüft.

Die Natronlauge wurde zunächst als ungefähr 5fache Normallösung verwendet. Ihre Wirksamkeit ist sehr groß.

In ungefähr 5facher Normallösung (20proz. Lösung¹⁾ waren die Sporen des *fumigatus*, *flavescens* und *clavatus* nach 5 Minuten getötet worden. Nur die Sporen des *Aspergillus niger* benötigten 15 Minuten.

In Lösungen von geringerem Prozentgehalte ergab sich folgendes:

Tabelle XII.
NaOH.

Materialie Aspergillus:	Konzentration der NaHO-Lösg.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	4 St.
niger	10 % ²⁾	+		+	—	—	
fumigatus	10 %	+		—	—	—	
flavescens	10 %	+		—	—	—	
clavatus	10 %	+		—	—	—	
niger	5 % ³⁾	+	+	+	+	—	
fumigatus	5 %	+	+	+	—	—	
flavescens	5 %	+	+	+	+	—	
clavatus	5 %	+	+	+	—	—	
niger	2½ % ⁴⁾	+	+	+	+	+	—
fumigatus	2½ %	+	+	+	+	—	—
flavescens	2½ %	+	+	+	+	+	—
clavatus	2½ %	+	+	+	+	—	—

- 1) Genauer 5,37 fache Normallösung, entsprechend 21,5 %.
- 2) Genauer 2,68 fache Normallösung, entsprechend 10,75 %.
- 3) 1,34 fache Normallösung, entsprechend 5,32 %.
- 4) 0,67 fache Normallösung, entsprechend 2,66 %.

Obwohl wir bezüglich der Wirksamkeit des kohlensauren Natrons nach den bisher bekannten Thatsachen nicht allzuviel vorausgesetzt hatten, waren wir von der völligen Unwirksamkeit der 15 proz. und 10 proz. Lösung selbst nach 3 tägiger Einwirkung überrascht.

Erstaunlich energisch wirkte auch Ammoniak, das in annähernd gleich konzentrierten Lösungen wie die Natronlauge zur Anwendung kam und eine Wirkung entfaltete, welche der des Natriumoxydhydrates gleich zu stellen ist. Der Wirkungswert wurde mit Normalschwefelsäure ermittelt bezw. gestellt.

Tabelle XIII.

Ammoniakflüssigkeit.

Material Aspergillus:	Konzentration der NH ₃ -Lsg.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
fumigatus	21,5 %	—	—	—	—	—	—
niger	21,5 %	—	—	—	—	—	—
fumigatus	10,75 %	+	+	—	—	—	—
niger	10,75 %	+	+	+	—	—	—
flavescens	10,75 %	—	—	—	—	—	—
clavatus	10,75 %	—	—	—	—	—	—
fumigatus	5 %	+	+	+	—	—	—
niger	5 %	+	+	+	—	—	—
flavescens	5 %	+	+	+	—	—	—
clavatus	5 %	+	+	+	—	—	—
fumigatus	2 $\frac{1}{2}$ %		+	+	+	+	+
niger	2 $\frac{1}{2}$ %		+	+	+	+	+
flavescens	2 $\frac{1}{2}$ %		+	+	+	+	+

Auffallend war, daß bei Verwendung von NH₃ die Sporenemulsion sich stark färbte. Die Aufschwemmung des Aspergillus niger war dunkelbraunschwarz, die des flavescens grüngelb geworden. Vielleicht erklärt sich die hohe Wirkung des Ammoniaks dadurch, daß von demselben ein die Spore schützender Körper gelöst wird. Wir kommen auf eine ähnliche Erscheinung noch

unten zu sprechen. Gegenüber reinem Ammoniak zeigte auch die geprüfte Lösung von frisch bereitetem Kupferoxydammon, von welcher ein besonderer Desinfektionseffekt wegen seiner celluloselösenden Eigenschaft erwartet wurde, keine erheblichere Wirkung.

Kalkmilch, die nach der bekannten für die Desinfektionspraxis empfohlenen Konzentration von 1% frisch hergestellt wurde, zeigte selbst nach 6- und 12tägiger Einwirkung keine Beeinflussung der Lebensfähigkeit unserer Sporen. 10proz. Kalkmilch war dem *Aspergillus fumigatus* und *niger* gegenüber nach 10 Tagen noch wirkungslos. Die Sporen des *Aspergillus flavescens* und *clavatus* waren zwar nach 4 Tagen noch lebend; nach 8 tägiger Einwirkungszeit jedoch tot.

Chlor, Jod, Brom.

Mit Rücksicht auf die leichte Anwendbarkeit in der Desinfektionspraxis wurde Chlorkalk, der sich vegetativen Bakterien gegenüber so wirksam zeigt, in drei Versuchsreihen und in niedrigen Konzentrationen geprüft. Besonderes Vertrauen hatte ich von vornherein dem Chlorkalk gegenüber nicht, nachdem in früheren Versuchen anlässlich der Nachprüfung des Wassersterilisierungsverfahrens nach Traube oftmals Schimmelpilze gewachsen waren¹⁾, nach Einwirkungszeiten, die zur Abtötung von Spaltpilzkeimen genügt hatten. Doch war damals die Bestimmung der Schimmelpilzarten unterlassen worden.

Der Wirkungswert der geprüften Chlorkalklösungen wurde durch Titrierung mit $\frac{1}{10}$ Normal-Arseniklösung unter Verwendung von Jodkalistärkekleister als Indikator ermittelt. Die Angaben beziehen sich daher auf den Gehalt an wirksamem Chlor. Da der verwendete Chlorkalk ungefähr 20% war, so ergibt sich der Gehalt an Chlorkalk, indem man die angegebenen Zahlen mit 5 multipliziert.

1) *Hygienische Rundschau*, 1899, Nr. 17.

Tabelle XIV.

Chlorkalk.

Sporenmateriäl	Konzentration wirksames Chlor	1/2 Min.	1 Min.	2 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.
Asp. fumigatus	0,67 % ¹⁾	+	+	+	+	—	—	—	—
› niger	0,67 %	+	+	+	+	—	—	—	—
› flavescens	0,67 %	+	+	—	—	—	—	—	—
› clavatus	0,67 %	+	+	+	+	+	—	—	—
› fumigatus	0,1145 % ²⁾				+	+	+	—	—
› ,	0,1145 %	+	+	+	+	+	—	—	—
› niger	0,1145 %				+	+	+	+	—
› flavescens	0,1145 %	+	+	+	+	+	—	—	—
› clavatus	0,1145 %				—	+	—	—	—
› fumigatus	0,067 % ³⁾						—	—	—
› niger	0,067 %						+	—	—
› flavescens	0,067 %						—	—	—
› clavatus	0,067 %						—	—	—

Die Lösung mit einem Chlorgehalt von 0,67% wirksamem Chlor, entsprechend einer 3,4proz. Chlorkalklösung, hatte ein der 1proz. Sublimatlösung nicht um Vieles nachstehendes Desinfektionsergebnis geliefert, selbst die 0,34proz. Chlorkalklösung hatte nach 10 Minuten alle Sporen mit Ausnahme der des Aspergillus niger getötet.

Das Jod wurde nur in 1‰ Lösung geprüft; ausgegangen wurde von einer Stammlösung, bestehend aus 0,2 Jod, 0,4 Jodkalium, 100 Wasser.

Das Resultat ergibt

Tabelle XV.

Jod-Jodkalium.

Sporenmateriäl	3 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.
Asp. fumigatus	+	+	+		—	—
› niger	+	+	+	+	+	+
› flavescens	+	—	—	—	—	—
› clavatus	+	+	—	—	—	—

1) ca. 3,34% Chlorkalk. — 2) ca. 0,6% Chlorkalk. — 3) ca. 0,34% Chlorkalk.

Der *Aspergillus niger* hatte selbst nach einer Stunde Widerstand geleistet, während bei den übrigen Sporen befriedigende Resultate erzielt wurden.

Auch das von Riedel geprüfte und von Behring warm empfohlene Jodtrichlorid zeigte eine erstaunlich hohe Wirksamkeit. Ausgegangen wurde von einer frisch bereiteten 5proz. Lösung des von der Firma Merk in Darmstadt gelieferten Präparates. Der die Schleimhäute reizende Geruch erschwert übrigens das Arbeiten mit diesem Präparate außerordentlich.

Tabelle XVI.
Jodtrichlorid.

Sporenmateriäl	Konzentration	Einwirkungszeit								
		1/2 Min.	1 Min.	2 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.
Asp. flavescens	1 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—
› clavatus	1 %	—	—	—	—	—	—	—	—	—
› fumigatus	1 ‰					+	+	—	—	—
› ›	1/2 ‰							+	—	—
› niger	1/2 ‰							+	+	—
› ›	1 ‰					+	—	—	—	—

Mit Brom wurde zuerst der Versuch in der von Schumburg für die Wassersterilisierung angegebenen Konzentration von 0,2 : 1000 gemacht. Nach zweistündiger Einwirkung war kein Erfolg hinsichtlich Abtötung eingetreten. Dagegen lieferte die 1proz. und 2proz. Brom-Bromkalilösung günstige Ergebnisse.

Tabelle XVII.
Brom-Bromkalium.

Material	Konzentration	Einwirkungszeit			
		2 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.
Aspergillus } fumigatus }	2 %	+	—	—	—
	1 %	+	+	—	—
Aspergillus } niger }	2 %	—	—	—	—
	1 %	+	—	—	—

Kaliumpermanganat wurde in zwei Konzentrationen zum Versuche verwendet: 1. als 1,75 ‰, 2. als doppelt normale Lösung.

Erstere erwies sich selbst nach mehrtägiger Einwirkung machtlos, letztere gab hinsichtlich des *Aspergillus flavescens* und *clavatus* gute, hinsichtlich des praktisch bedeutungsvolleren *Aspergillus fumigatus* schlechte Resultate.

Tabelle XVIII.
Kallum hypermanganicum. 2fache Normallösung.

	15 Min.	30 Min.	1 St.	4 St.	6 St.	24 St.
<i>Asp. fumigatus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>clavatus</i>	+	—	—	—	—	—
<i>flavescens</i>	+	+	—	—	—	—

Körper aus der Benzolgruppe.

Von den organischen Desinfektionsmitteln wurde die größte Anzahl der Versuche mit dem Phenol angestellt, welches in 1¼ und 2½ proz. Lösung zur Verwendung kam.

Aspergillus niger allein wurde bei einer Konzentration von 1,25 % 24 mal geprüft und gab im ganzen recht konstante Resultate. In 16 Fällen wuchsen die Proben noch nach 1 Stunde; nicht mehr nach 2 Stunden; in 2 Fällen nach 2 Stunden und nicht mehr nach 3 Stunden. In 6 Fällen wuchsen die Proben nicht mehr nach 1 Stunde, wohl aber nach 45 Minuten. Nachdem die Versuchsanordnung, die Nährlösungen u. s. w. stets gleich waren, ergibt sich aus dem Ausfalle der Versuche, daß auch hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit ein und derselbe Stamm zu verschiedenen Zeiten Schwankungen aufweist, ein Verhalten, das uns für Bakterien geläufig ist.

Ähnlich wie *Aspergillus niger*, verhielten sich bei gleicher Konzentration der Phenollösung auch die übrigen geprüften Sporen der Schimmelpilze.

Tabelle XIX.
Phenol 1,25 %.

Einwirkungszeit	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
<i>Asp. niger</i>	+	+	+	+	—
<i>fumigatus</i>	+	+	+	+	—
<i>flavescens</i>	+	+	+	+	—
<i>clavatus</i>	+	+	+	+	+

Außerordentlich energischer wirkte das Phenol in 2¹/₂proz. Lösung.

Tabelle XX.

Phenol 2,5 ‰.

Einwirkungszeit	2 Min.	3 Min.	5 Min.	10 Min.	30 Min.
Asp. niger	+	+	—	—	—
› fumigatus	+	+	+	—	—
› flavescens	+	—	—	—	—
› clavatus	+	+	—	—	—

In 5proz. Phenollösung waren alle genannten Schimmelsporen nach 1 Minute Einwirkungszeit nicht mehr gewachsen.

Lysol prüften wir, indem von einer 4proz. Stammlösung des Originalpräparates in destilliertem Wasser ausgegangen wurde, in 2proz. und 1proz. Lösung.

Tabelle XXI.

Lysol.

Material	Konzentration	Einwirkungszeit				
		5 Min.	10 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.
Asp. fumigatus	2 ‰	—	—	—	—	—
› niger	2 ‰	—	—	—	—	—
› flavescens	2 ‰	—	—	—	—	—
› clavatus	2 ‰	+	—	—	—	—
› fumigatus	1 ‰	+	+	+	—	—
› niger	1 ‰	+	+	+	+	—
› flavescens	1 ‰	+	+	+	—	—
› clavatus	1 ‰	+	+	+	—	—

Wie die Tabelle lehrt, kommt der 2proz. Lösung des Lysols eine beträchtliche Wirkung zu. Bei Verwendung einer 1proz. Lösung sinkt der Desinfektionswert des Lysols ganz außerordentlich und unverhältnismäßig herab, ein Verhalten, das wir auch bei Verwendung des Staphylococcus pyogenes aureus gesehen haben.

Im auffallenden Gegensatz zu diesen günstigen Ergebnissen mit Lysol stehen die Resultate mit wässrigen Lösungen der reinen Kresole. Es wurden alle drei isomeren Kresole in 1/2 und 1proz. Lösung geprüft, allerdings nur dem Aspergillus niger

gegenüber. Aus Ortho-, Para- und Metakresollösungen mit einem Gehalte von 1% trat nach eintägiger Einwirkungszeit noch Wachstum auf. Hierbei ist allerdings hervorzuheben, daß wir nur schon seit 2 Jahren im Laboratorium bewahrte Präparate zur Verfügung hatten.

2,5 proz. Creolin tötete in 4 Tagen noch nicht, wohl aber in 7 Tagen den *Aspergillus fumigatus*.

1 proz. Saprolextrakt von Nördlinger hatte selbst nach 6 Tagen keine merkliche Wirkung.

Anschließend sei auch erwähnt, daß Thymol in $\frac{1}{2}$ ‰- und 1‰-Lösung und Aceton in 10 proz. Lösung keine Wirkung entfaltet hatten.

Äthylalkohol.

Mit Rücksicht darauf, daß therapeutisch Eingießungen von Alkohol oder alkoholischer Lösungen von organischen Säuren wie Salicylsäure, Borsäure bei Schimmelmikroskopen als wirksam bezeichnet werden, haben wir der Erforschung der desinfizierenden Kraft der Alkohole eine größere Zahl von Versuchen gewidmet. Von den Alkoholen erwies sich der Methylalkohol und der Amylalkohol als wenig wertvoll¹⁾. Staunenswert hoch ist hingegen die Wirkung des Äthylalkohols, selbst in geringeren Konzentrationen. Auch bei diesen Versuchen scheint die intensive Färbung der Alkoholsporenmischungen darauf hinzudeuten, daß Bestandteile der Sporenmembran (harzartige Körper) in Lösung übergehen. Daß wirklich ein Lösungsprozess und nicht eine dichte Verteilung der gefärbten Sporen in Frage kommt, ergibt sich daraus, daß auch die sorgfältig mit mehrfachen Filterlagen gewonnenen Filtrate sich noch intensiv gefärbt erweisen, obwohl höchstens vereinzelte Sporen in der Flüssigkeit mikroskopisch nachgewiesen werden können.

Die gewonnenen Resultate ergeben die nachfolgenden Tabellen, wobei der Einfachheit halber, dort wo eine Anzahl gleicher Versuche nicht völlige Übereinstimmung gab, die Durchschnittsergebnisse eingetragen wurden.

1) 50 proz. Methyl- und Amylalkohol tötete *Aspergillus niger* und *fumigatus* selbst nach 1 tägiger Einwirkung nicht.

Tabelle XXII.
Äthylalkohol. Material: *Aspergillus fumigatus*.

Konzentration	Einwirkungszeit								
	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.	1 Tag
100 %		—		—	—	—	—	—	
96 %	+	—	—	—	—	—	—	—	
80 %				—	—	—	—	—	
60 %				—	—	—	—	—	
48 %		+	+	—	—	—	—	—	
40 %				+	—	—	—	—	
20 %				+	+	+	—	+	+
10 %				+	+	+	—	+	+

Tabelle XXIII.
Äthylalkohol. Material: *Aspergillus niger*.

Konzentration	Einwirkungszeit								
	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.	1 Tag
100 %	—	—	—		—	—			
96 %	—	—	—		—	—			
80 %		+	—		—	—			
60 %			—	—	—	—	—		
48 %		+	+	—	—	—	—		
40 %			+	+	—	—	—	—	
20 %				+	+	+	+	+	+
10 %				+	+	+	+	+	+

Tabelle XXIV.
Äthylalkohol. Material: *Aspergillus flavescens*.

Konzentration	Einwirkungszeit								
	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.	1 Tag
100 %	—	—	—	—	—	—			
96 %	—	—	—	—	—	—			
80 %		—	—	—	—	—	—		
60 %		—	—	—	—	—	—		
48 %		+	—	—	—	—	—		
40 %			+	+	—	—	—		
20 %				+	+	+	+	+	+
10 %				+	+	+	+	+	+

Tabelle XXV.

Äthylalkohol. Material: *Aspergillus clavatus*.

Konzentration	Einwirkungszeit									
	1 Min.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	5 St.	1 Tag
100 %		—	—	—	—	—				
96 %	+	—	—	—	—	—	—			
80 %			—	—	—	—	—	—		
60 %			—	—	—	—	—	—		
48 %			+	—	—	—	—			
40 %				+	—	—	—			
20 %						+	+	+	+	+
10 %						+	+	+	+	+

Aus der Betrachtung der Tabellen ergibt sich die verblüffend energische Einwirkung des Alkohols in Form von 96 proz. und absolutem Alkohol. Vergleicht man die Wirksamkeit des Alkohols mit der des Sublimats, so findet man, daß der Wirkung der angegebenen Konzentrationen eine $\frac{1}{2}$ proz. Quecksilberchloridlösung erst gleichkommt, und daß die Wirksamkeit der in der chirurgischen und Desinfektions-Praxis zumeist verwendeten 1 %₀₀-Sublimatlösung hinter der Wirkung selbst des 80proz. und 60proz. Alkohols zurückbleibt.

Erst Alkoholkonzentrationen unter 50 % und 40 % werden, und zwar wie die Tabelle ergibt, rasch nach abwärts unwirksam, ein Umstand, der auch die Annahme zu stützen scheint, daß die Hauptwirkung des Alkohols seiner lösenden Eigenschaft hinsichtlich gewisser in Wasser und wässerigen Lösungen unlöslicher, das Protoplasma schützender Substanzen zu danken ist. Wird der das Protoplasma schützende Körper durch Lösung entfernt, so genügt eine geringfügige Schädigung¹⁾, um einen namhaften Desinfektionserfolg zu erzielen.

1) Xylol, welches, wie aus der Verfärbung der Flüssigkeit zu ersehen ist, ebenfalls den (harz? artigen) Körper löst, wirkt als vermutlich indifferentere Körper trotz seines Lösungsvermögens fast gar nicht im Sinne eines Antisepticums.

Tabelle XXVI.
Formaldehyd in Gasform.

Material	Die Sporenfäden waren während des Versuches	Einwirkungszeit					
		5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	3 St.
Aspergillus fumigatus	frei	+	+	+	+	-	-
	in einer Papierkapsel	+	+	+	+	+	-
Aspergillus niger	frei	+	+	+	+	-	-
	in einer Papierkapsel	+	+	+	+	+	-
Aspergillus flavescens	frei	+	+	+	-	-	-
	in einer Papierkapsel	+	+	+	+	+	-
Aspergillus clavatus	frei	+	+	+	+	-	-
	in einer Papierkapsel	+	+	+	+	+	-

Wie man ersieht, sind selbst in jenen Fällen, in welchen die Sporenfäden der Einwirkung des Gases frei preisgegeben waren, die Erfolge mäßige und geringfügig im Vergleich mit der Wirkung anderer bequemerer und billigerer Antiseptica.

Von Anilinfarben haben wir nur das Methylviolett geprüft. Da dieses unter den Anilinfarbstoffen hervorragend wirkende Präparat (Stilling¹⁾) selbst nach mehrtägiger Einwirkung in 1proz. Lösung keine Abtötung, noch merkbare Verzögerung des Wachstums hervorgebracht hatte, selbst den empfindlicheren Sporen des *Aspergillus flavescens* und *clavatus* gegenüber, wurden weitere Versuche mit dieser Körpergruppe unterlassen.

II. Einwirkung der trockenen und feuchten Hitze.

Mit Rücksicht auf die übereinstimmenden und erfolglosen Versuche von Renon und Lucet wurde es unterlassen, Pilzsporen hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit niederen Temperaturen gegenüber zu prüfen.

Dagegen bemühten wir uns, die Leistungsfähigkeit trockener und feuchter Hitze festzustellen.

Für die Prüfung der Einwirkung trockener Hitze diente ein Trockenschrank, der, mit Asbestpappe verkleidet und mit einem

1) Lancet, XI, 965, cit. nach Flügge, Mikroorganismen, I, S. 474.

Thermoregulator versehen, leicht auf eine beliebige Temperatur eingestellt werden konnte. Die Sporen waren wie bei den Formaldehydversuchen auf Sporenfäden angetrocknet. Die Fäden kamen zu bestimmten Zeiten in den Trockenschrank, der einige Stunden vor dem Beginn des Versuches hinsichtlich der Gleichförmigkeit seiner Wärme kontrolliert worden war. Und zwar wurden die Fäden ohne Papierhülle in im Schranke befindliche Petrischalen gelegt. Macht man diese Einbringung nicht schnell genug, so fällt das Thermometer im Schranke beträchtlich. Hat man jedoch eine Übung im raschen Öffnen und Schließen des Kastens erlangt, vielleicht auch die Verschlussvorrichtung durch Ölen oder Ausfeilen, Ausbiegen vervollkommenet, so ist man leicht imstande, für das Einbringen kaum mehr als eine Sekunde Zeit zu beanspruchen, in welcher Zeit das Thermometer nicht merkbar absinkt.

Die Versuche wurden bei 135° C., 125° C., 110° C., 100° C. und 80° C. angestellt und keine Versuchszeit unter 15 Min. gewählt. Letzteres geschah, um den Versuchsfehler möglichst zu verkleinern, der durch den schwankenden und unbestimmbaren Zeitverlust bis zur vollständigen Durchhitzung des Fadeninnern gegeben ist.

Die Resultate ergaben, daß alle vier Sporengattungen, sowohl bei 135° als bei 125° C. in 15 Min. abgestorben waren. Bei 110° und 15 Min. Einwirkungszeit blieb nur der *Aspergillus fumigatus* lebensfähig, nach 30 Min. war auch dieser abgestorben.

Einer Temperatur von 100° C. widerstand *Aspergillus fumigatus*, *niger* und *flavescens* durch 1 Stunde und 15 Minuten. *Aspergillus clavatus* war hingegen in dieser Zeit bereits abgestorben, während er 45 Minuten nach Beginn des Versuches sich noch züchtungsfähig erwies. Nach 2 Stunden 30 Minuten waren alle Sporen abgetötet worden.

Die trockene Hitze von 80° C. tötete selbst nach siebenstündiger Einwirkung keine Sporenart.¹⁾

1) Unsere Versuche zeigen mit einigen aus der Litteratur erhobenen Daten eine leidliche Übereinstimmung.

Cramer erwähnt Arch. f. Hyg. XIII, 105, daß die Conidien des Brotschimmels nach Versuchen von Pasteur erst bei 127—132° C. absterben: nach Hofmann ertrugen die Sporen von *Ustilago carbo* und *destruens*

Wie zu erwarten stand, war feuchte Hitze ungleich wirksamer. Die höchste Temperatur, die wir prüften, war die des strömenden ungespannten Wasserdampfes, welche übrigens infolge der hohen Lage Innsbrucks (ca. 580 m über dem Meere) nur 97° bis 98° C. betrug. Um ganz kurze Zeiträume in den Versuchen zur Anwendung bringen zu können, bedienten wir uns des im Institute üblichen Verfahrens. An das Dampfventil eines ca. 10 l Wasser fassenden Autoclaven ist mittels Schlauch, Glasrohr und Kautschukstopfels ein ziemlich weiter Glascylinder geschaltet, so daß, durch das Ventil regulierbar, Dampf in den Cylinder eingeleitet werden kann. Die vom Autoclaven abgewendete Seite des Cylinders ist mit einem leicht aufsteckbaren und abnehmbaren Stopfel verschlossen, der 2 Bohrungen trägt, von denen die eine für ein feines Thermometer, die andere für ein ca. 1 cm im Durchmesser fassendes rechtwinkelig nach abwärts gebogenes Glasrohr bestimmt ist. Das Thermometer trägt in unmittelbarer Nähe seines Quecksilbergefäßes ein Körbchen aus Messingdrahtnetz, welches leicht die Aufnahme mehrerer Sporenfäden ermöglicht. Der Cylinder, welcher mittels des Schlauches am Ventilansatz des Autoclaven befestigt ist, wird mittels Stativ leicht geneigt fixiert, damit das sich bildende Kondenswasser beim Abnehmen des Stopfels sofort ausfließen kann. Bei länger dauernden Versuchen fließt der Überschuss an Kondenswasser durch das Dampfausströmungsrohr aus.

Temperaturen von 104—128° C. Leider fehlen in dieser Litteraturangabe die Einwirkungszeiten.

Koch und G. Wolffhügel (Mitteilungen aus dem Reichs-Gesundheitsamte, Bd. I, S. 301) berichten über Desinfektionsversuche im Trockenschranke, angestellt an Sporen des *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*. Der letztere ertrug eine 1½ stündige Erhitzung, bei welcher durch länger als eine Stunde die Temperatur über 100° C. (im Maximum 128° C.) betragen hatte.

In einem zweiten Versuche wirkte eine Temperatur von 120—128° C. durch 1½ Stunden ein; es erwiesen sich als getötet die Sporen von *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger* und *Botrytis vulgaris*.

Unter den Schlußsätzen der Arbeit findet sich: Schimmelpilze erfordern zur Abtötung ungefähr eine 1½ stündige Erhitzung auf 110—115° C.

Den Beginn der Einwirkung der Siedehitze rechnet man von jenem Momente, in welchem das Thermometer die für den Versuchstag geltende maximale Temperatur erreicht hat. Dieser Wert wird durch einen blinden Versuch vorher ermittelt. Bei Verwendung eines dünnen Quecksilbergefäßes und eines empfindlichen Thermometers ist die Differenz zwischen dem Einfügen des Stopfels und dem Zeitpunkte, an welchem die gewünschte Temperatur erreicht ist bei einiger Übung kaum mehr als zwei Sekunden. Nachdem man diese Differenz außerdem bestimmen und durch Subtraktion eliminieren kann, lassen sich kleine Zeiträume für den Versuch heranziehen.

Die geringsten Zeiten, die wir verwendeten, waren 15 Sekunden. In keinem einzigen Falle gelang es, selbst nach dieser Zeit, die Sporen einer der geprüften Aspergillusarten lebend zu finden, so daß wir annehmen können, daß die Einwirkung des strömenden Wasserdampfes bei 100° C. eine momentane Abtötung bewirkt.

Es entfiel somit die Notwendigkeit, den abtötenden Einfluss gespannten Wasserdampfes zu prüfen.

Weiterhin wurde die Wirksamkeit der Temperaturen von 80, 70 und 60° C. geprüft; hierbei wurde so vorgegangen, daß kleine Wassermengen (ca. 2 ccm) in sterilen Eprouvetten in konstant temperiert gehaltenen Wasserbade durch etwa ½ Stunde vorgewärmt und zu gemessenen Zeiten mittels der Pipette mit einem Tropfen der dichten Sporenaufschwemmung beschickt wurden. Die Eintragung des Tropfens geschah, so wie die Aussaat, zu gemessenen Zeiten, ohne daß die Eprouvetten aus dem Wasserbade entfernt wurden, so daß die Temperatur des Wassers als konstant angenommen werden konnte. Die Probenentnahme geschah mittels einer Platinöse.

Die zahlreichen Versuche ergaben folgendes Durchschnittsergebnis:

Tabelle XXVII.

Temp.	Sporengattung	Einwirkungszeit									
		5 Min.	10 Min.	15 Min.	30 Min.	1 St.	2 St.	4 St.	7 St.	15 St.	
80° C.	Asp. fumigatus										
	» niger	+									
	» flavescens	+									
	» clavatus										
70° C.	» fumigatus				+	+	+	+	-	-	
	» niger				+	+	+	-	-	-	
	» flavescens				+	+	+	-	-	-	
	» clavatus				+	+	+	+	-	-	
60° C.	» fumigatus				+	+	+	+	+	-	
	» niger				+	+	+	+	+	-	
	» flavescens				+	+	+	+	+	-	
	» clavatus				+	+	+	+	+	-	

Die verschieden energische Einwirkung trockener und feuchter Hitze hat übrigens Cramer²⁾ schon gekannt und eingehender studiert.

Bei dem relativ hohen Wassergehalte der Schimmelsporen erscheint diese Thatsache auffallend. Cramer zeigte in seinen unter Rubners Leitung angestellten Versuchen, dafs der Wassergehalt der Schimmelsporen als hygroskopisches und nicht die Gewebe durchsetzendes und benetzendes Wasser vorhanden sei. Der Nachweis wurde dadurch erbracht, dafs feuchte Sporen getrocknet und abermals in feuchte Luft gebracht wurden. Die Wägungen zeigten, dafs so wie andere hygroskopische Substanzen auch die Sporen in vollkommen mit Wasserdampf gesättigter Luft unabhängig von der Temperatur gleichviel Wasser aufnehmen, als sie bei 100° wieder abgeben, während Substanzen, die mit tropfbar flüssigem Wasser durchsetzt und benetzt sind, nach dem Trocknen weit weniger Wasser aufnehmen.

Wenn also Sporen in hohe trockene Temperaturen gebracht werden, so entweicht rasch das hygroskopisch gebundene Wasser,

1) + = Wachstum, - = gelungene Abtötung, ± = inkonstantes Resultat.

2) Archiv f. Hygiene, Bd. XIII.

und es resultiert ein wasserfreier Eiweißkörper, dessen Widerstandsfähigkeit gegen das Coagulieren verständlich und bekannt ist. In feuchter Luft, also auch im Wasserdampf oder im Wasser, kann das hygroskopische Wasser nicht abgegeben werden und der leicht gerinnbare Eiweißkörper fällt rasch der Abtötung anheim.

Überblickt man die Ergebnisse, welche in den vorstehenden Tabellen und Angaben zum Ausdrucke gebracht sind, so ist man über die geringe Widerstandsfähigkeit der Aspergillussporen einigermaßen überrascht. Insbesondere ihre Empfindlichkeit der feuchten Hitze, Alkalien und starkem Alkohol gegenüber zeigt uns, daß sie hinsichtlich ihrer Abtötung nicht wesentlich schwierigere Bedingungen stellen als resistenterer vegetative Formen.

Starkem Alkohole gegenüber zeigen sie sich besonders hin-fällig, so daß sie als beträchtlich weniger widerstandsfähig diesem Reagens gegenüber sich erwiesen, als z. B. in den Versuchen Minervini¹⁾ der *Micrococcus tetragenus*, der *Bacillus pyocyaneus*, der *Micrococcus prodigiosus*, der *Aureus* und das Bakterium *coli commune*, von dem geprüften sporentragenden *Anthraxbacillus* und dem *Heubacillus* nicht zu reden. Hierbei handelt es sich nicht um unerhebliche Zeitdifferenzen, sondern um außerordentliche Unterschiede. Nach Minervini erhielten sich *B. pyocyaneus*, *M. prodigiosus* durch 12 und 24 Stunden im 99% Alkohol lebend, *Staphylococcus pyogenes aureus* sogar durch drei Tage; unsere Schimmelpilzsporen waren fast ausnahmslos nach 2 Minuten nicht mehr lebensfähig. Neben der quantitativ ungleichen Wirkung ist es befremdend, daß hinsichtlich der Konzentration und bactericiden Fähigkeit ein Parallelismus besteht, der wie Epstein²⁾ und Minervini³⁾ feststellten, hinsichtlich der Bakterien sich nicht findet. Bei diesen hatte 50% — 70% Alkohol annähernd die höchste Wirkung entfaltet; war die Konzentration

1) Minervini, Über die bactericide Wirkung des Alkohols. *Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten*, Bd. 29, S. 117.

2) Epstein, *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskr.*, 1897, Bd. XXIV

3) Minervini, ebendb, Bd. XXIX, S. 117.

höher oder geringer, so fiel die desinfektorische Wirkung. 25% Alkohol übertraf noch etwas die Wirkung des 80%.

Die wasserentziehende Fähigkeit des starken Alkohols für dies Verhalten den Schimmelpilzsporen gegenüber verantwortlich zu machen, geht nicht an, da ja die Schimmelpilzsporen die Eintrocknung, also die Wasserverarmung, durch lange Zeiträume schadlos ertragen.

Ungezwungener erscheint uns die Annahme einer durch Alkohol leicht lösbaren, schützenden Hülle, nach deren Beseitigung das Sporenprotoplasma der antiseptischen Einwirkung des Äthylalkohols bedingungslos ausgeliefert ist, eine Hypothese, welche bereits oben erwähnt wurde¹⁾.

Gegenüber diesem eigentümlichen Verhalten erscheint es befremdend, daß selbst die stärksten Mineralsäuren in hohen Konzentrationen die Sporen nicht zu vernichten vermochten.

Besondere Erwähnung verdient hier nochmals der Versuch mit der fast 28%, also ca. fast 5½ fach normalen Schwefelsäure. Nach fünf Tagen wuchs noch der *Aspergillus niger*. Vergleicht man die Widerstandsfähigkeit dieser Sporen mit den vegetativen Formen, so fällt der gewaltige Unterschied leicht in die Augen. Unser Aureus vertrug Normalschwefelsäure, also eine 4,9% Lösung durch 2—3 Stunden; v. Wunschheim²⁾ fand Aurei, die eine ½% Lösung nicht durch 5 Minuten aushielten.

Allerdings wirkt nach den Versuchen von Krönig und Paul³⁾ die Schwefelsäure entsprechend ihrem geringeren Dis-

1) Für *Penicillium glaucum* wies Cramer (Arch. f. Hyg., Bd. XX S. 197: Die Zusammensetzung der Sporen von *Penicillium glaucum* und ihre Beziehung zu der Widerstandsfähigkeit derselben gegen äußere Einflüsse, aus dem hygienischen Institute zu Heidelberg) in Analysen mit verhältnismäßig viel Untersuchungsmaterial Alkoholextrakte von rund 30% des Gesamtgewichtes nach. Der Alkoholextrakt stellte eine harzige, braune Masse dar. Dafs den fettartigen Körpern der Spore, welche auch durch einen hohen Ätherextrakt von mehr als 7% zum Ausdrucke kommen, eine Bedeutung hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber wasserlöslicher Desinficientien zukomme, welche auch in der schweren Benetzbarkeit Wasser gegenüber in Erscheinung tritt, hebt ebenfalls Cramer a. a. O. S. 205 hervor.

2) Archiv f. Hygiene, XXXIX, 2. Heft.

3) Krönig und Paul, Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. XXV, S. 1.

sociationsgrade, etwas schwächer als einige andere Mineralsäuren, Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Überchlorsäure. Immerhin gehört diese Säure zur Gruppe der starken Säuren im Sinne der vorgenannten Autoren und der Schluss erscheint gerechtfertigt, daß in praktischer Hinsicht, Säuren bei der Abtötung von Schimmelpilzen außer Erwägung zu bleiben haben.

Wenn also die günstige Einwirkung von stark verdünnten Säuren, wie 1—2proz. Borsäure, Benzoesäure, z. B. bei mykotischen Ohraffektionen hervorgehoben wird, so dürfte dies zumeist auf einen Irrtum beruhen. In Fällen, und dies geschieht wohl meist, wo die Säure in Alkohol gelöst, dispensiert wird, ist die günstige Beeinflussung sicher dem Alkohol zuzuschreiben.

Bei den Alkalien fiel die energische Einwirkung des Ammoniaks, die hinter der des Natriumoxydhydrates nicht zurückblieb, auf. Krönig und Paul fanden in Versuchen mit dem *Staphylococcus pyogenes aureus* selbst dann ganz außerordentliche Unterschiede zu Gunsten der Desinfektionskraft des Natriumoxydhydrates, wenn eine 3,5% $\text{NH}_4\text{-OH}$ -Lösung gegenüber einer 1% NaHO -Lösung geprüft wurde. Nach 10 Minuten langer Einwirkung waren im ersten Falle alle Keime abgestorben, beim Ammoniumhydroxyd hingegen unzählbare Keime auf der Platte zur Entwicklung gekommen.

Von dem Gesetze, daß die Basen im Verhältnisse ihres Dissociationsgrades, d. h. entsprechend der Konzentration der in der Lösung enthaltenen Hydroxylionen desinfizieren, haben wir hier eine scheinbare Ausnahme vor uns, die sich vermutlich auf das verschiedene Verhalten der beiden Basen gegenüber der harzreichen schützenden Hülle der Sporen zurückführen läßt.

Die tüchtige Wirkung der Halogenen: Chlor, Brom, Jod wurde früher gewürdigt, ebenso wie die Unverlässlichkeit der Sodalösungen und des Kaliumpermanganates besonders dem *Aspergillus fumigatus* gegenüber hervorgehoben wurde.

Wenn wir mit Rücksicht auf praktische Verhältnisse auf Grund unserer Versuche Ratschläge erteilen wollten, so wäre folgendes zu bemerken:

Handelt es sich um die Abtötung von Pilzen außerhalb des tierischen Organismus, z. B. um die Desinfektion von Ställen von Geflügel, oder Gebrauchsgegenständen, so würde in Betracht kommen:

die Desinfektion im strömenden Wasserdampfe durch mindestens eine Viertelstunde,

die ausgiebige Benetzung mit 2‰ Sublimatlösung, mit 5% Phenollösung, mit 2% Lysollösung oder mit etwa 3% Chlorkalklösung. Das harmloseste und, zweckmäÙsig bewahrten, Chlorkalk vorausgesetzt, billigste und am leichtesten zu beschaffende Mittel ist das letztgenannte, dem wir pro praxi den Vorrang einräumen würden.

Bei Affektionen des äußeren Gehörganges scheint Alkohol allein zur Abtötung der Vegetationen auszureichen. Sind zarte Schleimhäute befallen, z. B. die Schleimhaut der Conjunctiva, wird man durch wiederholte Anwendung von $\frac{1}{2}$ ‰ — 1‰ Sublimatlösung oder noch besser von $\frac{1}{2}$ — 1% Silbernitratlösung zum Ziele kommen.

Für die Therapie der Pneumomykosen haben wir keinen Anhaltspunkt gewonnen, da man kaum eines der als wirksam gefundenen Mittel in genügender Dosis an die erkrankten Stellen wird bringen können.

Prophylaktisch wird man hingegen, insbesondere bei den eingangs erwähnten Gewerben der Haarkämmer und der Taubenmäster vorgehen können. Die zu sortierenden Haare müÙten statt mit Mehl in anderer Weise, etwa mit Alkohol oder Benzin, gereinigt werden. Würde dies aus technischen Gründen unzulässig oder minder geeignet sein, müÙte man Arbeitstische mit Staubabsaugung vorschreiben und auf jeden Fall für strengste Reinlichkeit in solchen Betrieben, die keinesfalls als Hausindustrie geduldet werden dürften, sorgen.

Den Taubenmäuatern sollte die Fütterung von Mund zu Mund untersagt werden. Es scheint mir ein Leichtes zu sein, eine Vorrichtung, etwa einen mit einem geeigneten Mundstücke versehenen Kautschukballon zu konstruieren, mittels welchem der Mehlbrei ebenso schnell den Tauben eingespritzt werden könnte, als dies mit dem Munde möglich ist.

Anhang.

Die vorliegenden Ergebnisse sind die wenigen positiven Resultate von ursprünglich gröfser angelegten Untersuchungen über die Pathologie der Aspergillusmykosen. Insbesondere sollte auch die Frage geprüft werden, ob nicht auf dem Wege der Schutzimpfung der Erkrankung beizukommen wäre. Gearbeitet wurde nur mit dem mir zur Verfügung stehenden, stark virulenten *Aspergillus fumigatus*. Zuerst wurde die Immunisierung versucht, indem die in Bouillon oder Bierwürze nach längerem Wachstum entstandenen Stoffwechselprodukte Tauben in kleinen, dann ansteigenden Mengen subcutan einverleibt wurden. Wurden die Tiere nach 1—2 monatlicher Behandlung zugleich mit frischen Kontrolltauben durch Inhalation infiziert, war weder hinsichtlich Dauer, Schwere, noch Eintritt der Erkrankung ein Unterschied zu bemerken.

Ab und zu war eine Versuchstaube bei nasser oder trockener Versprayung nach deutlichem Kranksein am Leben geblieben; wir hofften bei solchen Tieren eine Immunität konstatieren zu können. Wurden sie nebst Kontrolltieren einer zweiten Inhalation ausgesetzt, so war ebenfalls kein erworbener Schutz zu bemerken. Ebenso wenig hatte ein Schutz sich nach subcutaner Einverleibung von auf 70° C. durch 1/2 Stunde erhitzten Kulturen ausgebildet.

Auch die Frage wurde zu beantworten gesucht, ob die Ursache des Todes eine Intoxikation der Körpers mit einem Gifte sei. Stoffwechselprodukte aus Würze und Bouillon erwiesen sich, selbst wenn die Kulturen mehrere Monate alt waren, als wirkungslos oder riefen höchstens eine leichte Fieberbewegung hervor. Die Berkefeldfiltrate aus Leber und Lunge von Tauben, die der Infektion erlegen waren, zeigten sich ebenfalls als unschädlich, wenigstens für das Leben des Versuchstieres. Wir sind also zur Annahme gelangt, dafs die Gesundheitsstörung nicht in erster Linie auf die Ausscheidung chemischer Gifte, als vielmehr in mechanischen Störungen, die durch die reichlich wuchernden Mycelien hervorgerufen werden, zurückzuführen sind.

Über die Verunreinigung des städtischen Hafens und des Flusses Akerselven durch die Abwässer der Stadt Christiania.

Von

Dr. **Axel Holst**,
o. ö. Professor.

Dr. **Magnus Geirsvold**,
Assistent am hygien. Institute.

und

Sigval Schmidt-Nielsen,
Chem.-Ingenieur.

(Aus dem hygienischen Institute der Universität Christiania.)

(Mit Tafel II—IV.)

I. Einleitung.

Zur Geographie Christianias. — Über die Ursachen der Verunreinigung des städtischen Hafens und des Flusses Akerselven.

— Zusammensetzung der städtischen Abwässer. —

Untersuchungsmethoden.

Christiania, die Hauptstadt Norwegens, zählt zur Zeit ziemlich genau 220000 Einwohner. Sie liegt am nördlichsten Ende des etwa 100 km langen Christianiafjords, von dem sich bei der Stadt ein blind endender, schmaler, ca. 20 km langer Arm, der Bundefjord, in südlicher Richtung abzweigt; dieser ist durch eine entsprechend lange Landzunge, Näsodden, deren nördlichste Spitze etwa 6 km von der Stadt entfernt ist, vom Hauptfjorde getrennt. Letzterer ist zwischen Christiania und dem Städtchen Dröbak (2200 Einwohner), d. h. auf eine Strecke von ca. 35 km, bis etwa 8 km breit; bei Dröbak wird er dagegen auf die Breite von 1½ km eingeengt, um sich dann südlich von diesem Punkte bis zum Skagerack mehr und mehr zu erweitern. — Ferner sei hervorgehoben, daß die Stadt durch

den kleinen Fluß Akerselven, der aus dem ca. 10 km nördlich von der Stadt gelegenen Maridalssee entspringt, durchflossen wird; die Wassermenge des Flusses ist auf ca. 5 cbm pro Sekunde, d. h. 432 000 cbm pro Tag geregelt. Akerselven läuft in den östlichen Hafen der Stadt, »Björviken«¹⁾ aus; letzterer wird durch eine kleine Landzunge, auf der die alte Festung Akershus gebaut ist, vom westlichen Hafen, »Piperviken«, getrennt. An Piperviken schließt sich wieder eine flache Bucht, »Frognerkilen«²⁾, in westlicher Richtung an; dieselbe ist etwa 2 km lang und bis ca. 1 km breit. Am nördlichen Ufer des Frognerkilen verläuft die Promenade »Drammensweg«, die nebst den anstossenden Strafsen als Villenquartier benutzt wird; die andere Seite der Bucht wird durch die Halbinsel »Bygdö« begrenzt. Bygdö ist ziemlich dicht mit Sommervillen bebaut; zwischen ihrem nordöstlichen Ufer und den kleinen Inseln »Hovedøen«, »Lindøen« und »Nakholmen« ist die sog. »westliche Einfahrt« zum Hafen; hier befindet sich, in der Entfernung von ca. 3 km vom Pipervikens-Quai, der Leuchtturm »Dyna«. — Zwischen den Inseln Hovedøen und Lindøen auf der einen und »Blegøen« und »Gräsholmen« auf der andern Seite findet sich die »östliche Einfahrt« des Hafens mit dem etwas mehr als 3 km von dem innersten Quai Björvikens entfernten Leuchtturm »Hägsholmen«.

Zur Orientierung über diese Verhältnisse dienen die umstehenden Karten; die kleinere (Karte I) derselben gibt eine Übersicht über den Fjord bis Drøbak, während die größere Karte einen genaueren Einblick in die örtlichen Verhältnisse der nächsten Umgebungen Christianias gestattet.

Gehen wir nach dieser Besprechung zur Verunreinigung des genannten Flusses und des Hafens über, so sei zunächst hervorgehoben, daß dieselbe fast ausschließlich von den städtischen Abwässern bedingt wird. Zwar betrug die Zahl der Schiffe, die während des Jahres 1900 in den Hafen einliefen, im ganzen 10 850, von denen 2350 aus- und 8500 inländische waren; im

1) Vik = Bucht. 2) Kil = langgestreckte Bucht.

Durchschnitt wird die Besatzung dieser auf 12 Mann pro Schiff vom Auslande und 6 Mann pro Schiff von norwegischen Häfen geschätzt, was zusammen etwa 80000 Seeleute jährlich gibt. Selbst wenn man aber rechnet, daß jedes Schiff einen ganzen Monat im Hafen verweilt — eine Angabe, welche selbstverständlich viel zu hoch gegriffen ist — muß man, um sich die Anzahl Seeleute zu vergegenwärtigen, die sich pro Tag im Hafen aufhalten, 80000 durch die Zahl der Monate dividieren. Daß die Verunreinigung, die von der so gewonnenen Zahl von etwa 6—7000 Seeleuten herrührt, im Vergleich mit den Abwässern einer Bevölkerung von 220000 Menschen keine größere Rolle spielt, ist einleuchtend. Insofern ist es auch nicht von größerer Bedeutung, daß die Zahl der Schiffe während der letzten Jahre vor 1900 etwas größer wie die oben erwähnte war (z. B. war der Verkehr anno 1899 um etwa 400 aus- wie inländische Schiffe größer). Ebensowenig hat auf die Verunreinigung des Hafens der Umstand einen erheblichen Einfluß, daß der Hafen von Christiania zu gewissen Jahreszeiten von norwegischen und fremden Kriegsschiffen und Yachten angefahren wird.

Im großen Ganzen stammt, wie gesagt, die Verunreinigung des Flusses und Hafens von den städtischen Sielen. (Letztere nehmen in Christiania keine Fäkalien auf, da die Stadt seit einigen Jahren ihre früheren Abtrittsgruben durch Kübelsystem zu ersetzen im Begriffe steht.) Die Hauptsiele sind auf der größeren der beigegebenen Karten mit blauer Farbe eingezeichnet; sie ergießen sich an zahlreichen Mündungen teils in den genannten Fluß, teils in den Hafen oder in Frognerkilen. Außerdem gibt es aber auch im südöstlichen Teile der Stadt einige Häuserreihen, deren Abwässer sich in den kleinen Bach Loelven entleeren.

Kurz oberhalb dieser Mündungen entnommene Proben des Sielwassers haben eine gelbliche oder graue Farbe und gewöhnlich eine neutrale, mitunter schwach alkalische Reaktion. Nur ausnahmsweise haben sie einen auffallenden Geruch; das spezifische Gewicht ist nach unseren Untersuchungen ca. 1003—1012 (mittels

Westphalscher Wage bestimmt) und unterscheidet sich somit in Christiania, wie man auch anderswo gefunden hat, sehr wenig von demjenigen des reinen Süßwassers. Die Flüssigkeit ist trübe, was von verschiedenen Mengen von mehr oder weniger voluminösen Schwebestoffen herrührt, die sich zum Teil als Futterreste, Pferdemist u. dergl. identifizieren lassen; zum Teil sieht man auch zahlreiche kleinste suspendierte Flöckchen.

Bei ruhigem Stehen, z. B. in einem hohen Glase, setzen sich die gröbereren Schwebestoffe und ein Teil der Flöckchen recht schnell als ein Bodensatz ab; mit den übrigen Flöckchen geschieht dies dagegen erst allmählich, und selbst nach mehreren Tagen — wenn die Flüssigkeit meist nach Schwefelwasserstoff zu riechen angefangen hat — behält sie eine Trübung, die auch nicht beim Filtrieren durch Fliespapier gänzlich verschwindet, und die sich bei mikroskopischer Untersuchung als durch Mikroorganismen (Bakterien, Infusorien) verursacht zeigt.

Wir haben von diesem Sielwasser zu verschiedenen Jahreszeiten eine Reihe von Analysen ausgeführt, deren Resultate in Tabelle I pag. 158 dargestellt sind. Zur Ausführung dieser Bestimmung haben wir jedesmal 2 bis ca. 13,5 l Wasser in Arbeit genommen; die größeren Portionen repräsentieren eine Mischung der Vor- und Nachmittagsproben von verschiedenen Sielen (bis 6); die kleineren Portionen sind zum Teil nur Vor- oder Nachmittagsproben von einem oder mehreren Sielen. Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Gesamtgehalt des Sielwassers an sog. Schwebestoffen durchschnittlich 0,45 g pro Liter ausmachte; es läßt sich ferner aus den angeführten Zahlen leicht berechnen, daß der Glühverlust dieser Stoffe durchschnittlich ca. 60% derselben entspricht; diesen Verlust haben wir in der Tabelle als »organische Bestandteile« aufgeführt. Ferner sei bezüglich der Schwebestoffe erwähnt, daß sie durchschnittlich ca. 3% organischen Stickstoff enthielten (Kjeldahls Verfahren).

(Siehe Tabelle I auf S. 158 u. 159.)

Nach Entfernung der Schwebestoffe wurden im Filtrat — wie ebenfalls aus der Tabelle ersichtlich — durchschnittlich ca. 0,64 g gelöster Stoffe pro Liter nachgewiesen; ihr Glühverlust war im Durchschnitt 38% und ihr Gehalt an organischem Stickstoff gleichfalls ca. 3%. Zur letzteren Zahl — die allerdings bedeutenden Schwankungen unterlag — kommt noch etwas Stickstoff, der als freies Ammoniak oder Ammoniakderivate vorhanden war. Die Menge dieser freien und flüchtigen Verbindungen haben wir jedoch nur in Einzelfällen bestimmt; als Durchschnitt fanden wir ca. 23 mg Ammoniak pro Liter Sielwasser (entsprechend ca. 19 mg Stickstoff). Ferner war der durchschnittliche Chlorgehalt des Filtrats 167 mg und der Sauerstoffverbrauch bei den wenigen Untersuchungen, die nach dieser Richtung vorgenommen wurden, 62 mg pro Liter. Schliesslich mag hier noch erwähnt sein, daß die Zahl der Bakterien im Sielwasser von einigen Hunderttausenden bis 50 Millionen pro Kubikmeter schwankte.

Weil unter anderem das Sielwasser nur während des Tages und nicht auch während der Nacht untersucht worden ist, können diese Ergebnisse keineswegs auf Vollständigkeit Anspruch machen. Im grossen Ganzen stimmen sie jedoch einigermaßen mit verschiedenen Analysen derselben Art, die an anderen Orten vorgenommen sind, überein; auf der anderen Seite gibt es zwar Städte, bei denen sowohl der Gehalt des Sielwassers an Schwebestoffen wie an gelösten Bestandteilen erheblich höher gefunden wurde. Zum Vergleiche dient die Tabelle 2, die nach König zusammengestellt ist.

(Siehe Tabelle II auf S. 160.)

Aus diesen Zahlen läßt sich leicht berechnen, daß die städtischen Siele dem Flusse und Hafen allmählich Verunreinigungen beträchtlicher Art zuführen müssen. Nach den diesbezüglichen Erfahrungen ist die Menge Sielwassers, die pro Tag auf jeden Einwohner einer Stadt die Siele verläßt, ungefähr dem

(Fortsetzung des Textes auf S. 161.)

Tabelle I.

Zusammensetzung des

Datum der Probenentnahme	Entnahmestelle	Aussehen, Reaktion u. s. w.	Anzahl Keime pro ccm
1900.			
21. VI. Vorm.	Sophienbergbach am Auslauf in Akerselven.	Bräunlich-grau, schwacher eigentümlicher Geruch, neutrale Reaktion, bildet einen spärlichen, feinflockigen, grauen Bodensatz (ca. 2 l).	54 400 000 (3 500 000 Schimmel,
—	Bisletsiel: Ecke Storthings- u. Tordenskjoldsstraße.	Grau, trübe, bildet schnell einen grauen, etwas grobflockigen Bodensatz, neutrale Reaktion, schwacher Geruch (ca. 2 l).	ca. 30 000 000
20. XII. Nachm. 5 h	Ecke Svolders- und Leif Eriksensstraße (Skillebæk, Frognerkilen).	Hellgrau, fader Geruch, neutrale Reaktion, bleibt trübe beim Stehen (ca. 2 l).	—
22. XII. Vorm. 9 h	Ecke Munkedamsweg u. Nils Juellsstraße (Skillebæk, Frognerkilen).	Schwärzlich-grau, fauler Geruch, schwach alkalische Reaktion, wird beim Stehen fast klar (ca. 2 l).	—
Nachm. 1 h	Ecke Munkedamsweg u. Drammensweg (Skillebæk, Frognerkilen).	Grau-gelblich, fader Geruch, neutrale Reaktion, bildet einen erheblichen Bodensatz (ca. 2 l).	—
1901.			
7. I. Vorm. 11 h Nachm. 5 h	Bisletsiel: Ecke Tordenskjolds- u. Storthingsstr. Ecke Reichweins- u. Hansteensstraße (mündet bei Filipstad, Piperviken)	Schmutzig-grau mit spärlichem Bodensatz, ohne Geruch, neutrale Reaktion. Die Analyse bezieht sich auf ein Gemisch von je 1 l von jeder Entnahmestelle.	Vrm. { 9550 000 8655 000 Nm. { 5385 000 10615 000
21. I. Vorm. 11 h Nachm. 5 h	Ecke Rödfyld- u. Karl XII.-Strafse. Ecke Rathaus- u. Königsstraße. Ecke Neue Strafse u. Gunnerusstr. Hauptziel bei Neue Brücke. (Die Siele münden in Akerselven)	Mittlerer Bodensatz, sonst wie die vorigen. Von den Entnahmestellen werden gleich grofse Proben, im ganzen 13.6 l, gemischt und analysiert.	Vorm. 300 000 (in 2 Proben
28. I. Vor- und Nachm.	do.	Aussehen u. s. w. ungefähr wie vorige Probe; wurde auf dieselbe Weise behandelt. Im ganzen 10 l wurden analysiert.	—
15. II. Vor- und Nachm.	do.	do. do. Im ganzen 8 l.	Vorm. 300 000 (1 Probe)
27. III. Vor- und Nachm.	Bisletsiel: Storthingsstr. (Vor- und Nachm.) Hauptziel: Rödfyldstr. (Vor- u. Nachm.); das Ziel mündet in Akerselven	a) Storthingsstraße. Vorm. Grau, ohne Geruch, geringer Bodensatz. b) Rödfyldstraße. Vorm. Bräunlich, fader, salzartiger Geruch, geringer Bodensatz. c) Storthingsstraße. Nachm. Grau, fader Geruch, mehr Bodensatz als Vorm. d) Rödfyldstraße. Nachm. Grau, ohne Geruch, Bodensatz wie Vorm.	Vm. { a) 2950 000 b) 2700 000 Nm. { c) 3550 000 d) 3800 000
16. IV. Vor- und Nachm.	do.	Wie vorige.	Vorm. . — Nachm. . —
21. IV. Vor- und Nachm.	do.	do. do.	Vorm. . — Nachm. . —

Durchschnitt

1) Im Trockenrückstande nach Kjeldahls Verfahren bestimmt. 2) Während des Ein- und des Entweichen möglicherweise vorhandenen freien Ammoniaks zu verhindern.

Schwebestoffe pro Liter					Gelöste Stoffe pro Liter							
Trocken-Rückstand in g pro Lit.	Glühverlust des Trock-Rückst.	Asche	Stickstoff pro Liter ¹⁾	Stickstoff % auf Trock-Rückst. ber.	Trocken-Rückst. l. ganz. in g pro Liter	Glühverlust (organ. Stoffe)	Asche	Chlor pro Liter	Sauerstoffverbrauch pro Liter	Stickstoff ²⁾ pro Liter	Stickst. % auf den Trock-Rückst. ber.	Freies Ammoniak pro Lit.
	g	g	g		g	g	g	g	g	g		g
0,484	—	—	—	—	0,716	0,278	0,438	0,137	—	—	—	—
—	—	—	—	—	0,516	0,132	0,384	0,096	—	—	—	—
0,388	—	—	0,0069	1,78	—	—	—	0,113	—	—	—	—
0,293	0,130	0,163	0,0102	3,48	0,560	0,093	0,467	0,135	—	—	—	—
0,334	0,183	0,151	0,0110	3,29	0,706	0,148	0,558	0,218	—	—	—	—
0,463	0,275	0,188	0,0128	2,76	0,315	0,086	0,229	0,188	—	—	—	—
0,448	0,348	0,100	0,0112	2,50	1,080	0,376	0,704	0,281	—	0,0442	—	—
0,443	0,256	0,187	0,0111	2,50	1,026	0,357	0,669	—	—	0,0158	1,54	—
0,477	—	—	—	—	0,452	—	—	—	—	—	—	—
0,429	0,348	0,061	0,0115	2,68	0,565	0,339	0,226	0,120	0,0678	0,0182	3,22	—
1,524	1,140	0,384	0,0439	2,88	0,959	0,310	0,649	0,286	0,0910	0,0173	1,80	—
0,340	0,070	0,270	0,0060	1,77	0,519	0,342	0,770	—	—	0,0161	3,10	0,0381
0,214	0,074	0,140	0,0054	2,52	0,471	0,173	0,298	—	—	0,0377	8,00	—
0,284	0,201	0,083	0,0104	3,66	0,499	0,348	0,121	0,126	0,0355	0,0095	1,90	0,0218
0,295	0,129	0,166	0,0189	6,40	0,560	0,199	0,361	0,133	0,0560	0,0100	1,79	0,0097
0,458	0,286	0,172	0,0133	3,02	0,639	0,245	0,437	0,167	0,0626	0,0178	3,05	0,0232

2 1 jeder Probe wurden zur Analyse herausgenommen (4 1 Vorm. u. 4 1 Nachm.)

Wie vorige.

D. Vorm.-Proben wurden vermischt, dav. 3 l zur Analyse genom. Nelm. ebenso.

dampfens mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure (bis zur schwach sauren Reaktion) versetzt,

Tabelle II.
Zusammensetzung des Sielwassers einiger europäischer Städte. Nach König, Verunreinigung der Gewässer, II, S. 8—9.

	Schwebstoffe			Gelöste Stoffe			Stickstoff	
	Asche	Organische Bestandteile	Stickstoff	Organische Bestandteile	Asche	Chlor	in den organ. Stoffen	als Ammoniak
I. Städte mit Waterclosets.								
16 engl. Städte (50 Analysen)	0,4469	0,2418	0,2051	0,722	—	0,1066	0,0221	0,0552
Berlin (30 Analysen)	1,0845	0,3826	0,7019	1,0882	0,3132	0,2646	0,1088	—
Breslau (72 Analysen)	0,4047	0,2047	0,200	0,7228	0,2427	0,1828	0,018	0,0735
Halle a/S. (3 Analysen)	0,5940	0,1888	0,3052	2,7944	0,5897	0,7150	0,0591	0,0891
Frankfurt a/M.	1,1980	0,3870	0,8060	0,8980	0,5170	0,0980	0,011	0,063
II, Städte ohne Waterclosets.								
16 engl. Städte (50 Analysen)	0,3911	0,1781	0,213	0,824	—	0,1154	0,0197	0,0448
Zürich (4 Analysen)	0,1277	0,0361	0,0916	0,4800	0,1822	0,0927	0,0185	0,0088
Breslau	0,2108	—	—	0,7292	0,3388	0,3954	0,0787	0,0247
Dortmund (7 Analysen)	0,4298	0,1865	0,2443	0,9659	0,2838	0,6821	0,1346	0,0272
Ottensen	0,6608	0,2188	0,4420	1,8172	0,3672	1,4500	0,6381	0,0476
Kronenberg, Arbeiterkolonie bei Essen (2 Analysen)	2,4466	0,9610	1,4866	0,7961	0,306	0,4901	0,1527	0,0295
Halle a/S. (5 Analysen)	0,8254	0,4020	0,4234	1,6380	0,329	1,3040	0,2091	0,0678

täglichen Wasserverbrauch pro Kopf gleich. Dieser ist in Christiania ca. 130 l; man wird deshalb kaum zu hoch greifen, wenn man in Übereinstimmung mit den besprochenen Zahlen die Schweb- und gelösten Stoffe, die sich pro Kopf und Tag (ca. 24 Stunden) durch die Siele Christianias entleeren, etwa auf $130 \times 0,4 = 52$ g und $130 \times 0,6 = 78$ g veranschlagt. Dies gibt für die erwähnte Bevölkerung von 220 000 Seelen ca. 28 000 cbm Sielwasser mit ca. 11 000 kg (11 Tonnen) Schweb- und ca. 17 000 kg gelösten Stoffen in 24 Stunden, d. h. ca. 4000 Tonnen der ersteren und 6000 Tonnen der letzteren Art pro Jahr. Hierzu kommen noch enorme Mengen von Mikroorganismen.

Von besonderer Wichtigkeit ist aber nun die Beantwortung der Frage, in welcher Ausdehnung diese Schmutzstoffe sich im Flusse und Hafen nachweisen lassen. Bevor wir zu den diesbezüglichen Untersuchungen übergehen, sei in Kürze folgendes hervorgehoben:

Während verschiedene Verfahren, die bezüglich der Untersuchung von verunreinigtem Süßwasser uns zur Verfügung stehen, durchaus brauchbare Resultate ergeben, sind die entsprechenden Methoden, die sich auf die Verunreinigung des Salzwassers beziehen, noch sehr wenig ausgearbeitet, da diese Verunreinigung bei den verhältnismäßig wenigen Untersuchungen, die bisher vorliegen, meistens allein vermittelt Bakterienzählungen festgestellt wurde. Indem wir bezüglich der einschlägigen Litteratur (Russell¹⁾, de Giaxa²⁾, Cassedebat³⁾, Alessi⁴⁾, Schierbeck⁵⁾ u. a.) auf die Originalarbeiten und hauptsächlich auf die umfassenden Arbeiten Fischers⁶⁾ verweisen, sei als Ursache dieser Erscheinung erwähnt, daß weder der Sauerstoffverbrauch, noch der Glühverlust oder der Chlor- und Stickstoffgehalt, wie dies so sorgfältig von Fischer untersucht worden ist, Anhaltspunkte in Bezug auf die Verunreinigung des Salzwassers geben.

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XI.

2) Ebenda, Bd. VI

3) Revue d'Hygiène, 1894.

4) Referiert von Fischer, S. 112—116.

5) Hospitalstidende (Dänisch), 1899.

6) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. XXIII.

Bei den Untersuchungen des Hafenwassers zu Christiania haben wir deshalb von diesen Verfahren abgesehen. Dasselbe gilt für die von Fischer u. a. (z. B. Schierbeck) benutzten Bestimmungen des Gehaltes an Schwebestoffen, zumal da es im Hafen von Christiania häufig vorkommt, daß das Wasser während und nach südlichen Stürmen stark getrübt wird, ohne daß dies auf eine Verunreinigung mit Sielwasser zurückzuführen ist. Dagegen bezogen sich unsere Untersuchungen erstens auf den an Grunde des Flusses Akerselven und des Hafens befindlichen Schlamm; dieser wurde meistens nur chemisch analysiert. Zweitens untersuchten wir das Flufs- und Hafenwasser, das erstere nach dem sonst üblichen Verfahren, das letztere teils mittels Bakterienzählungen, teils aber auch vermittelt Bestimmung seines Salzgehaltes. Zwar gibt der letztere, wie erwähnt, bezüglich der Verunreinigung keinen direkten Anhaltspunkt; nach den Untersuchungen, die während der späteren Jahre von skandinavischen Hydrographen ausgeführt sind, konnten wir indessen hoffen, durch derartige Bestimmungen, in Verbindung mit Beobachtungen der Strömungs- und Temperaturverhältnisse des Hafens, uns darüber ein Urteil zu bilden, in welcher Ausdehnung das Hafenwasser als stillstehend angenommen werden muß, oder umgekehrt, in welcher Ausdehnung es regelmäfsig gegen nicht verunreinigtes Wasser vom äufseren Teile des Fjords ausgetauscht wird — ein Unterschied, der natürlich für die Verunreinigung des Hafens von grösster Bedeutung sein wird.

2. Über die Verunreinigung des Grundes des Akerselven und des Hafens.

Wie oben besprochen, setzt sich ein wesentlicher Teil der im Sielwasser aufgeschwemmten Schwebestoffe bei Versuchen im Laboratorium ziemlich schnell als Bodensatz ab. Es ist daher a priori nicht unwahrscheinlich, daß derselbe Vorgang sich auch nach Entleerung der Abwässer in den Flufs (d. h. Akerselven) und den Hafen statthaben wird. Um so wahrscheinlicher ist dies gerade in Bezug auf den Hafen, als es sich bekanntlich ergeben hat, daß die Sedimentierung von Schwebestoffen durch

Vermischen mit Meerwasser erheblich beschleunigt wird. (Diese u. a. von Fischer besprochene Thatsache haben auch wir durch Versuche mit Sielwasser konstatieren können.)

Falls aber ein großer Teil der Schwebestoffe sich schon im Flusse und in der nächsten Umgebung der Sielmündungen am Hafen u. s. w. absetzt, muß diesem Umstande eine große Bedeutung beigemessen werden. Denn wie wir bereits angedeutet haben, gehen diese Stoffe leicht in Fäulnis über unter Bildung von Schwefelwasserstoff. Dies ist ja auch leicht zu erklären, wenn man daran erinnert, daß ihr Glühverlust und ihr durchschnittlicher Gehalt an organischem Stickstoff im Durchschnitt zu 60% bzw. 3% bestimmt wurde, welche letzter Zahl nach der üblichen Berechnung etwa 19% Eiweißstoffen entspricht. Falls sich deshalb ein größerer Teil der Schwebestoffe schon im Flusse, bzw. im innersten Teile des Hafens u. s. w. absetzt, werden diese Bestandteile des Sielwassers mitten in der Stadt und in der nächsten Umgebung derselben eine erhebliche Verunreinigung der Luft veranlassen können.

Diese Vermutungen werden auch durch die tägliche Erfahrung bestätigt. Fortwährend müssen diese Stoffe durch ausgedehntes Baggern vom Flusse und Hafen entfernt werden. So lagert sich nach gütiger Mitteilung seitens des Herrn Hafeningenieurs Schiøtz fortwährend eine bedeutende Menge eines losen schwärzlichen Schlammes, des sog. »Schlick«, am Boden des inneren Hafens ab. Diese Ablagerung nimmt um so mehr an Mächtigkeit zu, je mehr man sich den Mündungen der Siele nähert. Aber noch in einer Entfernung von 150 m von der Stelle, wo sich durch das »Bisletsiel« die Abwässer von ca. 40 bis 50 000 Einwohnern in den westlichen Hafen (Piperviken) entleeren, kann dieser Schlamm so tief sein, daß die Taucher bis zur Achselhöhle einsinken. (An dieser Stelle hat bisher kein Baggern stattfinden können; die Konstruktion der hierzu bisher benutzten Maschinen läßt nämlich das Ausbaggern nur bis zu einer Wassertiefe von 10 m zu.) Derselbe »Schlick« deckt auch den Grund des ganzen Bootshafen in Filipstad (an der Westseite

von Piperviken); in einer Entfernung von 15 m von dem dort mündenden größeren Siele wurde z. B. während dieses Frühlings eine meterhohe Schicht des genannten Schlammes angetroffen, obwohl daselbst im Mai 1900, also erst vor einem Jahre, gebaggert worden war. Der »Schlick« deckt aber nach der Mitteilung des Herrn Schiötz auch den Grund des ganzen östlichen Hafens (Björviken), wo derselbe ebenfalls in großer Ausdehnung eine Tiefe von ca. 1 m erreicht. Diese Verschlammlung Björvikens geht teils von der Mündung des Akerselven aus, teils und hauptsächlich nimmt sie an einer Schleuse, durch welche der Fluß kurz oberhalb der Mündung mit dem Hafen kommuniziert, ihren Ausgangspunkt.

Aber auch im Flusse Akerselven läßt sich fortwährend eine Verschlammlung derselben Art nachweisen. So finden sich immer große Massen des losen schwärzlichen »Schlicks« beim Baggern, das allerdings nur von der Mündung und bis zur sog. Schweigaardsbrücke, d. h. auf einer Strecke von ca. 800 m flussaufwärts, vorgenommen wird. Zum selben Resultat sind wir auch durch unsere Versuche gekommen. Oberhalb der erwähnten Brücke fanden wir dagegen Verhältnisse anderer Natur. So war der Grund des Flusses bei Vaterlandsbrücke (1030 m flussaufwärts von der Mündung des Akerselven) von einer kompakten Masse von Futterresten, Pferdemist u. dergl. bedeckt; dieselbe hatte allerdings noch eine schwärzliche Farbe; aber die erwähnte lose Konsistenz, wie auch der unten zu besprechende Schwefelwasserstoffgeruch ging ihr ab. Oberhalb dieser Stelle war dagegen der Grund des Flusses überall von einem grauen Schlamme bedeckt, welcher zwar ebenfalls etwas Futterreste u. ä. enthielt, aber überwiegend aus Sand und Lehm bestand. Obwohl also auch der Grund des oberen Teiles des Flusses mit dem unbewaffneten Auge sich als verunreinigt erwies, scheinen schon diese Beobachtungen darauf zu deuten, daß die Hauptmasse sowohl der im Sielwasser enthaltenen schwereren Sinkstoffe, wie die erwähnten leichteren Flöckchen, erst eine verhältnismäßig kurze Strecke oberhalb der Mündung des Flusses Gelegenheit dazu finden, sich als Bodensatz abzulagern — eine

Erscheinung, die auch durch andere Beobachtungen, die unten zu erwähnen sind, bestätigt wird. In diesem Schlamme spielen sich aber ferner ausgedehnte Gärungsprozesse ab. So ist es leicht zu beobachten, daß in der Umgebung der Mündungen der Siele an den Hafenuais und in Frognerkilen kontinuierlich zahlreiche Gasblasen durchs Wasser emporsteigen. Dasselbe ist ferner in dem unteren Teile des Akerselven der Fall; aber auch in oberen Teile desselben kann dieselbe Erscheinung, wenn auch in viel geringerer Masse, bis an die nördliche Grenze der Stadt beobachtet werden. Außerdem sei erwähnt, daß diese Gasblasen um so zahlreicher sind, je wärmer die Jahreszeit ist, und je mehr man sich den Mündungen der Siele nähert; besonders während des Sommers und auf der untersten Strecke des Flusses geben sie dem Wasser das Aussehen, als ob es fortwährend regne. Nicht selten ist ihr Umfang ein recht beträchtlicher; so erzählt ein Gewährsmann, er habe solche von der Größe eines »Tellers« gesehen, und vor dem erwähnten Siele in Filipstad (westlicher Hafen) will man sogar Blasen von dem Durchschnitte eines ganzen Meters beobachtet haben, d. h. von derselben Größe wie die in der unten citierten Arbeit der Pariser Kommission erwähnten. Diese Gase haben einmal die Eigenschaft, brennbar zu sein — eine Erscheinung, die ja auch sonst häufiger zu beobachten ist überall da, wo organische Stoffe unter Wasser vergären. Es ist auch ein von der Jugend des Hafens oft geübter Sport, ein brennendes Zündholz an die Oberfläche des Wassers hinzuhalten, wodurch man dieselbe ganz wie ein Sprühmännchen anzünden kann. Auch läßt sich die Brennbarkeit dieser Gase dadurch nachweisen, daß man Schlamm vom Hafen oder Flusse in Gärungskölbehen bringt; es bilden sich dann allmählich bedeutende Mengen von Gasen, welche, angezündet, kleine Explosionen hervorrufen.

Bei dieser Gärung bilden sich aber aufer den brennbaren zweitens erhebliche Mengen von übelriechenden Fäulnisgasen. Hierauf deuten schon die verbreiteten Klagen seitens der Bewohner von Piperviken und am Frognerkilen über »Ge-stank nach Kanalgasen«; es ist auch allgemein bekannt, daß in

der Nähe des Akerselven die Luft zeitweise sehr übelriechend sein kann. Um uns über diesen Punkt näher zu orientieren, haben wir durch die Freundlichkeit des Herrn Ingenieurs Salicaths Assistance dazu erhalten, Umfrage über Gestank in verschiedenen Strafsen abzuhalten, die den Mündungen einiger Siele in und um den Hafen benachbart sind. Diese Untersuchungen beziehen sich auf 128 Familien in Piperviken (westlicher Hafen), am Drammenswege und der nächsten Umgebung desselben (bei Frognerkilen). Im ganzen klagten 69, d. h. ca. 53% der Familien, mehr oder weniger über lästigen Gestank, der — wie zu erwarten war — als besonders unangenehm im Sommer und bei südlichem Winde empfunden wurde. Die Klagen waren um so häufiger und stärker, je näher die Häuser der See lagen, und wurden unter anderem sehr laut in der Sögade (d. h. Seestraße) Pipervikens, wo 30 von 48, d. h. 62% der gefragten Familien, sich beschwerten. Da der Gestank längs des Akerselven von allen Seiten anerkannt wird, und wir wiederholt auch denselben selbst festgestellt haben, konnten wir eine entsprechende Untersuchung daselbst als überflüssig unterlassen. Wie nach dem schon Angeführten zu erwarten ist, ist der Gestank auf der unteren Strecke des Flusses — von der Mündung aufwärts bis zur erwähnten Vaterlandsbrücke — weit aus am schlimmsten. Aber auch oberhalb dieser Stelle spürt man bisweilen, besonders im Sommer und bei niedrigem Wasserstande, einen üblen Geruch; vor allem ist dies dort der Fall, wo die Ufer nicht gepfählt sind.

Dafs diese Klagen im wesentlichen berechtigt sind, davon kann man sich leicht überzeugen. Erstens verspürt man meistens sofort einen starken Gestank an den Mündungen der gröfseren Siele. Zweitens verbreitet der Schlamm, der durch das Baggern im inneren Hafen, bezw. auf der unteren Strecke des Akerselven an den Tag befördert wird, oder den man sich selbst leicht mittels eines Schleppnetzes oder schweren Eimers verschaffen kann, fast immer einen sehr üblen Geruch. Letzterer wird ohne Zweifel durch verschiedene Gase verursacht; wir möchten nur hervorheben, dafs im beschriebenen losen »Schlick« fast immer

sowohl durch den Geruch als durch einen mit Bleiacetat getränkten Papierstreifen beträchtliche Quantitäten von freiem Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden können, das ist eben das giftige Fäulnisgas, welches sich auch im Laboratorium beim Stehenlassen der im Sielwasser enthaltenen Schwebestoffe bildet. Dagegen beobachteten wir keinen Geruch nach diesem Gase in den mehr kompakten Schichten von Futterresten u. a., die, wie erwähnt, den Grund des Flusses (Akerselven) bei Vaterlandsbrücke bedeckten. Auch entwickelte der sand- oder lehmartige Schlamm, der an verschiedenen Stellen des Flusses oberhalb dieser Brücke untersucht wurde, keinen Geruch nach Schwefelwasserstoff. Wie diese Schlammproben, verhielten sich auch diejenigen vom äußeren Teile des Hafens (Kavringen, Dyna u. s. w.). Schliesslich sei auch hervorgehoben, dass der Geruch dieses Gases auffallend oft in dem Schlamm fehlte, der in den unmittelbaren Umgebungen der Sielmündungen des Hafens und Frognerkilens entnommen worden ist; trotzdem die besprochene Gasbildung eben hier sehr reichlich stattfindet, und die Luft sehr übel riecht, zeigen diejenigen Schlammproben, die wir an diesen Stellen wiederholt entnommen haben, nur denselben muffigen Geruch, den der Schlamm von Vaterlandsbrücke verbreitete. Indessen gilt dies, wie gesagt, nur für die unmittelbare Umgebung der Sielmündungen, indem wir z. B. stark schwefelwasserstoffhaltigen »Schlick« schon in 4—5 m Entfernung von der Mündung des erwähnten Bisletsieles in Piper-viken gefunden haben.

Man darf von vornherein annehmen, dass diese Erscheinungen durch mikroskopische Organismen verursacht werden; dies wird auch dadurch bestätigt, dass Kolben mit Schlamm, die durch starkes Erhitzen sterilisiert waren, nicht mehr in Gärung gerieten, während eine solche dagegen eintrat, wenn die gekochten Schlammproben mit einer geringen Menge frisch entnommenen Schlammes geimpft wurden. Wahrscheinlich wird die Gärung durch verschiedene Mikroorganismen verursacht. Wir haben indessen bisher nur zwei Arten derselben isoliert. Diese waren in zwei verschiedenen Proben frisch entnommenen

Schlammes zugegen. Beide waren Stäbchenbakterien; der eine gehört zur Gruppe des *Bacillus coli*; der andere ist ein sporenbildendes Bakterium, das fakultativ anaërob wächst und etwas kleiner als der Milzbrandbacillus ist. Beide bilden bedeutende Mengen von brennbaren Gasen, die reichlichen Schwefelwasserstoff enthalten.

Wir haben aber auch vermittelst anderer Verfahren versucht, ein Urteil darüber zu gewinnen, in welcher Ausdehnung die ungelösten Stoffe des Sielwassers sich im Akerselven und Hafen zu Boden setzen. Da es nicht möglich war, z. B. direkt die Höhe zu messen, in welcher sich der »Schlick« daselbst abgelagert hat, haben wir uns darauf beschränken müssen, zu untersuchen, ob und wo sich mittels chemischer Analysen (quantitativer Art) eine bedeutende Verunreinigung des Grundes des Flusses und Hafens nachweisen läßt. Bezüglich dieser Untersuchungen sei zunächst folgendes erwähnt:

Es ist eine wohlbekannte Erscheinung, dafs der Grund verschiedener untiefen Fjordbuchten zum grofsen Teil von einem Schlamm gedeckt wird — »Gytje« —, der aus Tangresten u. dergl. besteht und deshalb schon an und für sich viel organischen Stoff enthalten kann. Eine Gasbildung, wie die erwähnte, kann daher — wenn zwar in geringerem Grade — auch an Stellen stattfinden, die mit Sielinhalt nicht verunreinigt sind; im Gegenteil sammeln sich im Winter an den verschiedensten Stellen Gase unter dem Eise der Fjorde (wie auch der Flüsse), und es ist nicht nur am Hafen Christianias, sondern auch anderswo ein beliebtes Vergnügen, Löcher durchs Eis zu bohren, um durch ein brennendes Zündhölzchen das ausströmende Gas zum Explodieren zu bringen.

Schon wegen dieser Thatsachen, die es unseres Erachtens zweifelhaft lassen, in welcher Ausdehnung die erwähnten Gärungserscheinungen im oberen Teile des Akerselven dem Inhalte der Siele zuzuschreiben sind, mußten vergleichende Analysen des Schlammes von verschiedenen Lokalitäten vorgenommen werden.

Um den Grad dieser Verunreinigung zu bestimmen, untersuchten wir den Glühverlust und Stickstoffgehalt, wie dies wohl sonst üblich ist.¹⁾

A. Bestimmungen des Glühverlustes des Schlammes.

Der Glühverlust wurde als Prozent der Trockensubstanz berechnet; wie von vornherein zu erwarten war, scheint er nicht ein ganz zuverlässiger Mafsstab der Verunreinigung zu sein. Zwar entsprechen unsere Resultate, die in der Tabelle 3 angegeben sind, insofern den Verhältnissen, die a priori zu erwarten sind, als der Glühverlust des Schlammes am Akerselven nach oberhalb von der besprochenen Vaterlandsbrücke (ca. 1030 m oberhalb der Mündung gelegen) sehr schnell abnimmt, indem die Zahlen, z. B. an Hausmanns- und Treschows Brücke (resp. 1200 m und 5200 m von der Mündung des Flusses) um die Hälfte, bezw. zwei Drittel der an dem erstgenannten Orte gefundenen Werte abgenommen haben. Und zwar ist der Glühverlust des Schlammes in der Umgebung einiger Sielmündungen des westlichen Hafens (Bisletsiel, Siel bei Filipstad) und Frognerkilen (Skillebäk) ca. $2\frac{1}{2}$ — $4\frac{1}{2}$ mal gröfser als bei dem Leuchtturm Dyna (der wie oben erwähnt, ca. 3 km von Piperviken entfernt ist), und zwischen Blegöen und Kongshavn, welcher Punkt ca. 1,5 km südöstlich von der Mündung des Akerselven liegt. Zur gleichen Zeit war aber der Glühverlust an den beiden letzteren Stellen ebenso grofs wie mitten auf dem östlichen Hafen (Björoiken), wo doch die Verunreinigung a priori bedeutend gröfser anzunehmen ist; schliesslich ist es auch etwas befremdend, dafs die Zahlen von dem westlichen Hafen nicht wesentlich den Wert überschreiten, den wir bei der Untersuchung einer Probe »Gytje« (Schlamm) von Christiania, Süfswasserbadeanstalt (von Laroik am südlichen Ende des Christianiafjords bezogen) ermittelt haben.

1) Siehe z. B. Ohlmüller (Arbeiten aus d. Kais. Gesundheitsamte, Bd. XIV, 1898); Wolffhügel (citiert von Emmerich und Brunner, Zeitschrift f. Biologie, 1878); Reports of the English rivers pollution commission (1868).

Tabelle III.
Glühverlust des Schlammes. (Siehe die Karte.)

Entnahmestelle	Zeit der Entnahme	Glühverlust
An der Sielmündung, Filipstad (Westlicher Hafen) Probe Nr. 1	März 1901	45,2 %
An der Sielmündung, Filipstad (Westlicher Hafen) Probe Nr. 2	April 1901	29,6 „
An der Sielmündung, Piperviken (Bisletsiel)	„ „	25,7 „
Westlicher Hafen, 200 m südlich von letzterem Östlicher Hafen, Mitten auf Björviken	Novbr. 1900	15,5 „ 10,5 „
An der Sielmündung, Skillebäk in Frognerkilen Am Leuchtturm Dyna, Bygdø (3 km südwestl. vom Bisletsiele)	„ „	33,2 „ 10,4 „
Zwischen Blegöen und Kongshavn (1,5 km südl. von der Mündung Akerselvens)	„ „	9,9 „
Im Hafen, 200 m südwestlich von der Mündung des Akerselven	„ „	16,4 „
An der Mündung des Akerselven (Nylands Werk- stätte)	„ „	48,9 „
Im Akerselven, Bischofsbrücke Nr. 1 (400 m fluss- aufwärts von der Mündung)	März 1901	33,1 „
Im Akerselven, Bischofsbrücke Nr. 2	Mai 1901	45,4 „
Im Akerselven, Vaterlandsbrücke (1030 m flussauf- wärts von der Mündung)	„ „	34,2 „
Im Akerselven, Hausmannsbrücke (1200 m fluss- aufwärts von der Mündung)	„ „	14,5 „
Im Akerselven, Neue Brücke (1500 m flussaufwärts von der Mündung)	„ „	16,9 „
Im Akerselven, Bentsebrücke (4500 m flussaufwärts von der Mündung)	„ „	11,6 „
Im Akerselven, Treschowbrücke (5200 m flussauf- wärts von der Mündung)	„ „	9,6 „
(Gytje ¹⁾ (Schlamm) von Christiania Stufwasser- Badeanstalt	März 1901	23,0 „

B. Stickstoffgehalt des Schlammes.

Wir haben ferner den Stickstoffgehalt des Schlammes nach dem Kjeldahl-Verfahren bestimmt. Diese Untersuchungen zerfallen in zwei Reihen; in der einen Versuchsreihe schlemmten wir den Schlamm durch ein Sieb mit 1 mm Maschenweite

1) Aus Larvik, am Südende des Christianiafjords, bezogen.

(um gröfsere Tiere, Steine und dergl. zurückzuhalten) und analysierten nur, was durch das Sieb ging; in der anderen Versuchsreihe wurde das Sieb weggelassen.

a) Analysen von gesiebttem Schlamme.

Die Resultate dieser Analysen sind in Tabelle 4a wiedergegeben; es ist aus dieser ersichtlich, daß der Stickstoffgehalt des Schlammes in der Umgebung des Bisletsieles in Piperviken, welches, wie früher erwähnt, die Abwässer von ca. 40—50000 Einwohnern aufnimmt, und in der Umgebung der Sielmündung in Filipstad (ebenfalls in Piperviken) wie auch der Stickstoffgehalt des Schlammes vom unteren Teile des Akerselven ungefähr doppelt so groß gefunden wurde wie zwischen Hovedøen und Blegøen und wie in der einen Probe von Herbern an der Ostseite Bygdøs; von letzteren Punkten ist der erstere ca. 1,5 km von der Mündung Akerselvens, der letztere ca. 2 km von der genannten Sielmündung entfernt. In der anderen Probe von Herbern — welche Entnahmestelle von vornherein als verhältnismäßig wenig verunreinigt angenommen werden mußte — wurde dagegen ein wenig mehr Stickstoff als in der nächsten Umgebung der erwähnten Sielmündungen u. s. w. gefunden.

Wie nähere Untersuchungen ergeben haben, ist dies Resultat dadurch zu erklären, daß die Futterreste u. ä., die eben viel Stickstoff enthalten, auf einem Siebe wie dem besprochenen zurückgehalten werden. Wir haben deshalb, wie erwähnt, in der zweiten Versuchsreihe das Sieb weggelassen, der frisch entnommene Schlamm wurde sorgfältig gemischt, ein Teil davon von mikroskopisch sichtbaren Steinen, Holzstückchen, Seesternen, Anneliden u. dergl. befreit, und davon wieder eine Probe zur Analyse verwendet.

(Siehe Tabelle IV a und IV b auf S. 172 und 173.)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4b zusammengestellt, wegen des etwas schwankenden Wassergehaltes des Schlammes ist der Stickstoff in dieser Tabelle als Promille der in parallelen Proben des Schlammes bestimmten Trockensubstanz berechnet.

Tabelle IVa. Stickstoffanalysen des Schlammes.

Gesiebter Schlamm (Feinerde). Mai und Juni 1900. Über die Entfernungen vom Hafen bzw. von der Mündung Akerselvns siehe auch Tab. III.)

Entnahmestelle	1 kg feuchter Schlamm enthält				1 kg lufttrockener Schlamm enthält von Stickstoff	
	lufttrockene Feinerde	Rückstand a. d. Sieb (über 1mm Maschenweite)	Stickstoff			
	g	κ	κ	κ		
Vor der Sielemündung Filipstad	340	120	1,56	4,6	} Schwarz, übelriechend, alkal. Reakt. Die Probe von Filipstad enthält in dem auf d. Siebe zurückgeblieben. Pferdemist: die anderen Proben sind zugleich reich an Pflanzenresten, besonders Futterstoffen.	
Vor der Mündung des Bisletsieles, Piperviken	350	55	1,54	4,4		
Im Akerselven, an der Bischofsbrücke	320	50	1,44	4,5		
Rodelökkens Landungsbrücke, Frognerkilen	450	10	1,31	2,9	} Schwärzlich grau, enthält nicht Tiere, ohne Geruch, lehmartig.	
An der Sielemündung, Skillebak, Frognerkilen	365	90	1,16	3,2	} Alkal. Reakt. m. Kohlenpartikeln, Schlacken u. lebend. Schlangensterne zugemischt; grau, ohne Geruch, lehmartig.	
Herbern, Ostseite Bygdös (2 km vom Quai d. westl. Hafens, (Piperviken))	a) 275	a) 80	a) 1,29	a) 4,7	} a) Schwärzlich grau, neutrale Reakt., m. Muschelkalk, Kohlen- u. Schlackenpartik. vermischt; ohne Geruch, lehmartig. b) Schwärz. grau, neutrale Reakt., enthält Anneliden, ohne Geruch, wie vorige.	
	b) 450	b) 50	b) 1,04	b) 2,3		
Zwischen Hovedøen u. Blegøen	410	150	0,98	2,4	} Grau, lehmartig, ohne Geruch, enthält kleine Steine.	
Vippetangen (an der Halbinsel zwischen westl. und östl. Hafen)	620	2	0,49	0,8	} Reiner blauer Lehm, die oberflächlich. Schichten waren b. vorausgegangen. Baggern entfernt. (Die Probe wurde von einem Moderprahme genom.)	

Tabelle IVb. **Analysen des nichtgesiebten Schlammes.**

(Steine, Muscheln und Tierchen sind entfernt.) November 1900 bis Mai 1901.

Entnahmestelle	Zeit der Proben-entnahme	Stickstoff pro kg getrockneten Schlammes	Bemerkungen
Vor dem Siele in Filipstad	Nov. 1900	10,8	Schwarzer Schlamm, starker Gestank nach Schwefelwasserstoff
Vor d. Bisletsiele, Piperviken	» »	8,0	do. do. enthält w. d. vorig. Probe zahlreiche Reste von Futter u. Pferdemit
Vor dem Bisletsiele (200 m südwestl. von demselben)	April 1901	6,24	Schwarz, starker Gestank n. Schwefelwasserstoff, Reste v. Futterstoffen etc.
Vor dem Bisletsiele (400 m südwestl. von demselben)	Nov. 1900	5,17	(Grau, ohne merkbaren Geruch)
Mitten auf Björviken	» »	2,97	Grau, lehmartig, ohne Geruch
Zwischen Skillebäk und Skarpsno, Frognerkilen	» »	2,43	do.
Kavringen (1200 m südwestl. vom Piperviksquai)	» »	2,95	do.
Herbern, Bygdö (2 km südwestl. vom Piperviksquai)	» »	4,65	do.
Leuchtturm Dyna (3 km südwestl. vom Piperviksquai)	» »	2,99	do.
Zwischen Hovedöen und Blegöen (1,5 km südl. von d. Mündung Akerselvens)	» »	3,12	do.
Akerselven (200 m süd-südwestlich von der Mündung)	April 1901	6,76	Schwarz, starker Gestank n. Schwefelwasserstoff, zahlreiche Futterreste
Akerselven a. d. Münd. (Nyland)	Nov. 1900	10,15	wie vorige
Akerselven, an der Bischofsbrücke (400 m flusaufw. v. d. Mündung) Probe 1	» »	6,73	do.
Akerselven, an der Bischofsbrücke, Probe 2	Mai 1901	10,80	do.
Akerselven, an d. Vaterlandsbrücke (1030 m flusaufw. v. d. Mündung)	» »	13,60	Schwarz, modriger Geruch, kompakte Massen v. Futterrest, Pferdemit etc.
Akerselven, an d. Hausmannsbrücke (1200 m flusaufw. v. d. Mündung)	» »	4,85	Schmutziggrau, m. Sand u. Lehm stark verm., etwas Futterreste, ohne Geruch
Akerselven, a. d. Neuen Brücke (1500 m flusaufw. v. d. Mündg.)	» »	5,49	wie vorige
Akerselven, a. d. Bentse-Brücke (4500 m flusaufw. v. d. Mündg.)	» »	5,17	do.
Akerselven, an der Treschowsbrücke (5200 m flusaufw. v. d. Mündung)	» »	4,23	do.
Gytje (Schlamm) v. Sandefjord, Seebad	Nov. 1900	5,20	Schmutzig grau, wie Lehm, ohne Geruch
Gytje von Christiania Süßwasserbade-Anstalt von Larvik	» »	4,90	do.
Gytje von Hallangspollen bei Dröbak	» »	3,40	do.
Gytje v. Sandefjord Bad (Analyse v. Dr. E. Böttker 1893/94)	» »	10,2	do.

Aus den Zahlen geht hervor, daß der Stickstoffgehalt im Schlamm vom inneren Teil des Hafens und vom unteren Abschnitt des Akerselven durchgehends größer ist, als wir ihn anderswo gefunden haben. Was den Hafen betrifft, wurde z. B. der Gehalt in der Umgebung der Mündung des Bisletsieles in Piperviken zu 8‰ bestimmt; in 200 m Entfernung von dieser Mündung war er dagegen $6,24\text{‰}$, d. h. er war um 22% geringer, während er in 400 m Entfernung $5,17\text{‰}$ betrug, also um 35% abgenommen hatte. Schliesslich war der Gehalt bei Kavringen (1200 m von der Mündung des Bisletsieles) auf $2,95\text{‰}$ gesunken, d. h. er hatte mehr als 60% abgenommen. Ähnliche niedrige Werte wie die letztgenannten, fanden wir auch bei Düna (3 km von Bisletsiele) und zwischen Hovedøen und Blegøen ($1\frac{1}{2}$ km von der Mündung Akerselvens).

Was ferner den Fluß Akerselven betrifft, haben wir (vgl. Tabelle 4 b) von der Mündung bei Nyland und bis Vaterlands-Brücke (ca. 1030 m flussaufwärts) dreimal einen Stickstoffgehalt von ca. $10\text{—}16,8\text{‰}$ und einmal $6,73\text{‰}$ gefunden, während der oberhalb Vaterlands-Brücke nur zwischen $4,23\text{‰}$ (Treschows-Brücke, 5 km flussaufwärts) und $5,49\text{‰}$ (Neue Brücke, 1,5 km flussaufwärts) schwankte.

Die höheren dieser Zahlen entsprechen u. a. dem Stickstoffgehalt, den die englische Flußverunreinigungskommission im Schlamm des Flusses Irwells fand¹⁾ ($2,9\text{‰}$ im feuchten, $10,5\text{‰}$ im getrockneten Schlamm). Eine weitere Untersuchung unserer Tabelle 4 b ergibt indessen, daß eine Verunreinigung des Schlammes sich kaum immer durch einen besonders hohen Stickstoffgehalt desselben zu erkennen geben braucht. Dies ist z. B. nicht unwahrscheinlich, weil der Stickstoffgehalt des Schlammes mitten auf Björviken (östlicher Hafen) und bei Skillebäk in Frognerkilen ungefähr derselbe oder sogar viel kleiner war, als wir bei Kavringen, Dyna, Herbern und an anderen Orten gefunden haben; und doch

1) Rivers pollution commission (1868). Report on the Mersey and Ribble Basins. Vol. I, p. 22.

spricht alle Wahrscheinlichkeit für eine bedeutend gröfsere Verunreinigung an den erstgenannten Stellen (vgl. z. B. die früher besprochenen Gärungserscheinungen bei Skillebäk). Kommt hierzu, dafs der Stickstoffgehalt der »Gytje« von Sandefjord — der zwar in der von uns untersuchten Probe nur ca. 5%₀₀ war — im Jahre 1893/94 von Herrn Dr. E. Bødtker zu ca. 10%₀₀ bestimmt wurde (d. i. dieselbe Zahl, die wir an stark verunreinigten Stellen gefunden haben), so ziehen wir den Schlufs, dafs auch der Stickstoffgehalt nicht als ein absoluter Mafsstab für die Verunreinigung des Schlammes mit Sielinhalt benutzt werden kann, wenn er auch in den meisten Fällen als wertvolle Richtschnur für die Beurteilung desselben gelten mag.

C. Schwefelwasserstoffanalysen.

Da also die bisher erwähnten Ergebnisse nicht ganz befriedigten, haben wir uns nach einem anderen Mafsstabe für den Grad der Verunreinigung des Schlammes seitens der Siele umgesehen. Mit Rücksicht auf die Fäulnisprozesse, die sich, wie erwähnt, im Schlamme des Hafens und Flusses abspielen, haben wir versucht, einen solchen Mafsstab für den gröfseren oder kleineren Gehalt des Schlammes an Fäulnisprodukten zu finden.

Zu dem Zwecke haben wir quantitative Bestimmungen des im Schlamme enthaltenen Schwefelwasserstoffes vorgenommen, d. h. das giftige Gas, das in dem früher besprochenen »Schlick« fast immer schon durch den Geruch nachweisbar ist, und welches sehr wesentlich, wenn auch nicht ausschliefslich, den Gestank hervorruft, der sich vor Akerselven und dem Hafen verbreitet. Auf das Vorhandensein desselben in den Fäulnisgasen, die sich im Schlamm, welcher mit Sielinhalt verunreinigt ist, bilden, hat früher die Pariser Kommission aufmerksam gemacht, die anfangs der siebziger Jahre die Verunreinigung der Seine untersuchte; zu Folge des Berichtes der Kommission enthielt das gebildete Gasgemenge 72,88% Kohlenwasserstoff, 12,30% Kohlensäure, 2,54% Kohlenoxyd, 6,70% Schwefelwasserstoff und 4,58% andere Gase. Als Mafsstab der Verunreinigung des

Schlammes selbst wurde indessen das Vorhandensein des Gases damals nicht benutzt.¹⁾

Der Schwefelwasserstoff kam in den untersuchten Schlammproben sowohl frei wie gebunden, d. h. als Sulfid, vor. In der Mehrzahl unserer Versuche haben wir beide Formen derselben zusammen bestimmt. Diese Analysen der totalen Schwefelwasserstoffmenge umfassen zwei Versuchsreihen; in beiden wurden ca. 20 g Schlamm oder mehr (bis 150 g) aus frisch entnommenen Proben in einen Kolben gebracht und mit einem Überschusse verdünnter Salzsäure versetzt. Das gebildete Gas wurde mittels Durchleitung von Kohlensäure oder Wasserstoff ausgetrieben und in Will-Varrentrapsche Absorptions-Röhrchen mit Jodlösung von bekannter Stärke geleitet. Nach beendeter Reaktion wurde die Jodlösung mit Natriumthiosulfat in gewöhnlicher Weise titriert, und die Menge des entwickelten Schwefelwasserstoffes aus dem Titrationsergebnis berechnet. Die gefundenen Mengen wurden theils — wie sonst üblich — pro kg »feuchten«, d. h. frisch entnommenen Schlammes, theils — da die Wassermenge des letzteren öfters schwankte — pro kg Trockensubstanz umgerechnet; bei den letzteren Versuchen wurde der Wassergehalt in parallelen Proben bestimmt.

In der ersten Versuchsreihe (Tabelle 5a), wo nur Kohlensäure zum Durchleiten verwendet wurde, dauerte dies ca. 12 Stunden; um diese Zeit abzukürzen, wurden die Proben der ersten Reihe noch etwa 2 Stunden rasch aufgeköcht, damit die letzten Schwefelwasserstoffspuren ausgetrieben werden konnten. Um zu verhindern, daß die hierbei entwickelten warmen Dämpfe die Jodlösung erhitzen und dadurch ein Entweichen von Jod bewirken sollte, wurde zwischen dem Schlammkolben und der Jodlösung eine Kühlvorrichtung mit Eis eingeschaltet. Dies Verfahren hat indessen etwas zu hohe Werte gegeben, indem

1) Annales d'hygiène publ. et de médecine légale, 2e série, tome 44, 1875, p. 254. Leider sind wir auf diese, soweit uns bekannt alleinstehende Analyse so spät aufmerksam geworden, daß uns die Zeit gefehlt hat, zu untersuchen, ob auch unter den entsprechenden Gasen in Akerselven ein so giftiges Produkt wie Kohlenoxyd vorkommt.

der Schlamm Verbindungen enthält, die nicht als Schwefelwasserstoff präformiert sind, sondern diesen erst durch Kochen abspalten. Obschon wir diesem Umstande keinen besonderen Wert beimessen — indem die genannten Verbindungen wahrscheinlich auch im Schlamm, wie dieser in natura im Wasser vorkommt, Schwefelwasserstoff abspalten können — haben wir in einer anderen Versuchsreihe, deren Resultate in Tabelle 5b wiedergegeben sind, das Kochen weggelassen und nach Zusetzen der Salzsäure die Kohlensäure so lange durch den kalten Schlamm durchgeleitet, bis die aus dem letzteren entweichenden Gase ein mit Bleiacetat getränktes Fließpapier nicht mehr färbten. Dies dauerte bisweilen ca. 18—24 Stunden. Bei den Untersuchungen im April—Mai 1901 haben wir anstatt Kohlensäure Wasserstoff verwendet, ohne daß dies irgend einen Unterschied machte.

Tabelle Va.

Analysen des totalen Schwefelwasserstoffgehaltes des Schlammes.

Am Ende der Analyse wurde der Schlamm kurz aufgeköcht.

(Über die Entfernungen vom Hafen bezw. von der Mündung Akerselvns siehe Tabelle III.)

Entnahmestelle	Zeit der Probenentnahme	Schwefelwasserstoff in Gramm pro 1 kg feuchten Schlammes	Schwefelwasserstoff in Gramm pro 1 kg getrockneten Schlammes
Vor dem Bisletsiele, Piperviken	Juni 1900	2,9	8,3
In Akerselven, Bischofsbrücke	» »	1,95	6,2
In Frognerkilen, Rodeløkquai	» »	0,19	0,37
Herbern, Ostseite Bygdös	» »	0,023	0,052
Zwischen Hovedöen und Blegdöen	» »	Spuren	Spuren
Vippetangen (reiner blauer Thon)	» »	nichts	nichts
Mitten auf Björviken	Sept. 1900	1,3	nicht bestimmt
In Frognerkilen, Skillebäk, an der Sielemündung	» »	0,75	do.
In der Bucht an der N-Seite von Hovedöen	» »	0,28	do.
Zwischen Hovedöen und Vippetangen	» »	0,18	do.
Zwischen Sjørusöen und Blegdöen	» »	0,13	do.
Kavringen	» »	0,10	do.
»Gytje (Schlamm) von Hallangspollen bei Dröbak	» »	0,13	do.
»Gytje (Schlamm) von Larvik	» »	0,04	do.

Tabelle Vb.
Analysen ohne Erhitzen des Schlammes.
 (Über die Entfernungen vom Hafen bezw. von der Mündung Akerselvns siehe
 Tabelle III und IVb.)

Entnahmestelle	Zeit der Probenentnahme	Schwefelwasserstoff		Allgemeines Verhalten, Aussehen, Geruch u. s. w.
		in Gramm pro 1 kg feuchten Schlamm	in Gramm pro 1 kg getrocknet. Schlamm	
Filipstad, in der Umgebung der Sielemündung, Probe Nr. 1	März 1901	0,82	4,0	Schwarzer, loser Schlamm, Geruch nach Schwefelwasserstoff
Filipstad, in der Umgebung der Sielemündung, Probe Nr. 2	April 1901	1,46	6,02	do. do.
Piperviken, in der Umgebung der Sielemündung, Probe Nr. 1	März 1901	0,37	1,32	Schwärzl. grau, modriger Geruch gerade am Sielauslauf genommen
Piperviken, in der Umgebung der Sielemündung, Probe Nr. 2	April 1901	1,19	5,11	Schwarzer, loser Schlamm, Gestank nach Schwefelwasserstoff; wurde in 4—5 m Abstand von der Sielemündung aufgenommen (gleich an dieser wurde dagegen auch nun Schlamm v. demselben Aussehen wie bei der vorigen Untersuchung gefunden)
Piperviken, 200 m südwestl. von der Mündung des Sieles	„ „	0,81	2,85	do.
Frognerkilen, vor der Sielemündung Skillebåk	Nov. 1900	0,125	0,43	Schmutzig grau, lehmartig, etwas modriger Geruch
Mitten auf Björviken (östl. Hafen) Leuchtturm Dyna	„ „	0,36	1,43	Schwärzlich grau — wie vorige
Zwischen Blegøen u. Kongshavn	„ „	0,044	0,11	Grau, ohne Geruch
Björviken, 200 m von der Mündung des Flusses	„ „	0,026	0,073	do.
An der Mündung des Akerselven (Nylands Werk)	April 1901	1,05	3,27	Schwarzer, loser Schlamm, Gestank nach Schwefelwasserstoff
In Akerselven, an der Bischofsbrücke	März 1901	1,25	5,27	do.
In Akerselven, an der Bischofsbrücke	„ „	1,54	5,80	do.
In Akerselven, zw. Bischofsbrücke u. Schweigaardsbrücke	„ „	1,54	5,80	do.
In Akerselven, an der Vaterlandsbrücke	Mai 1901	1,01	6,02	do.
In Akerselven, an der Vaterlandsbrücke	„ „	0,249	1,24	Schwarz, mehr kompakt als die vorigen, besteht beinahe ausschließlich von Futterresten; modriger Geruch
In Akerselven, an der Hausmannsbrücke	„ „	0,135	0,399	Schmutzig grau, wesentl. Sand u. Lehm mit einzelnen Futterresten
In Akerselven, an der Neuen Brücke	„ „	0,29	1,24	Etwas dunkler als vorige Probe, im übrigen ähnlich
In Akerselven, an der Bentsebrücke	„ „	0,041	0,135	Wie Hausmannsbrücke
In Akerselven, an der Tresehowsbrücke	„ „	0,032	0,083	do.; keine deutlichen Futterreste
„Gytje“ von Larvik	März 1901	0,144	0,46	Grau wie Lehm
„Gytje“ von Sandefjord Bad (nach Analysen von Dr. E. Böldtger 1893,94)	„ „	0,083	—	

Aus den Tabellen 5a und b geht hervor, daß der Schwefelwasserstoffgehalt immer erheblich größer im Schlamme aus dem inneren Abschnitte des Hafens und aus dem unteren Teile Akerselvens gefunden wurde, als in dem Schlamme, der in einiger Entfernung von den Hafenuais bzw. weiter flufsaufwärts entnommen worden ist.

Was erstens den Hafen betrifft, so wurde in der ersten Versuchsreihe 160 mal mehr Schwefelwasserstoff in der nächsten Umgebung des Bisletsieles in Piperviken (8,4 g pro kg getrockneten Schlamms) als bei Herbern (Bygdö, ca. 1,5 km von der Sielmündung) gefunden. Und in der zweiten Versuchsreihe war der Gehalt vor der Mündung des genannten Sieles und desjenigen in Filipstad (ebenfalls in Piperviken) zwischen ca. 12 und 80 mal größer als bei Dyna und zwischen Blegöen und Kongshavn, d. h. in einer Entfernung von ca. 3 und 1,5 km von den Sielen bzw. von der Mündung Akerselvens. Und was zweitens Akerselvens betrifft, wurden an der Mündung des Flusses 5,27 g pro kg getrockneten Schlamms, d. h. ca. $4\frac{1}{4}$ mal mehr als bei Vaterlands-Brücke (1,24 g; 1 km flufsaufwärts) und Nybroen [Neue Brücke], 1500 m flufsaufwärts), und bzw. ca. 13, 40 und 63 mal mehr als bei Hausmanns, Bents und Treschows-Brücken gefunden (letztere Stellen liegen bzw. ca. 1200, 4500 und 5200 m flufsaufwärts von der Mündung).

Ferner ist aus der ersten Versuchsreihe ersichtlich, daß der Gehalt auf dem Hafen schon bei Kavringen (1200 m von Bisletsiele), wo er nur pro kg feuchten Schlamms bestimmt wurde, 29 mal kleiner gefunden wurde als in der Umgebung des Bisletsieles in Piperviken. Bei dieser Gelegenheit heben wir auch hervor, daß der Schwefelwasserstoff des Schlamms von der kleinen Bucht an der Nordseite der Insel Hovedöen — die ca. 1200 m südlich von der Mündung Akerselvens liegt, und die wir untersucht haben, weil die Strömung, die von dieser Mündung ausgeht, hier zum Teil einsetzt — und ebenso von Vippetangen (auf der Landzunge zwischen dem westlichen und östlichen Hafen), obgleich etwas höher als bei Kavringen, gleichfalls bedeutend

niedriger als in der Umgebung des Bisletsieles und im unteren Teile des Flusses gefunden wurde. Dagegen näherte sich das Resultat der einen Untersuchung bei Skillebäk in Frognerkilen den Zahlen, die wir an den mehr verunreinigten Stellen gefunden haben; dies Resultat bildet also einen Gegensatz zu demjenigen, welches aus dem oben erwähnten Verfahren hervorging, während es mit dem Ergebnisse, welches man nach den erhobenen Klagen der betreffenden Einwohner erwarten sollte, übereinstimmt. (Bei Skillebäk fanden wir 0,75 g Schwefelwasserstoff pro kg feuchten Schlammes, d. i. zufolge des sonst gefundenen Wassergehaltes ca. 4—5 g pro kg getrockneten Schlammes.) Ferner sei der erhebliche Unterschied hervorgehoben, den diese Analysen — im Gegensatze zu den Stickstoffbestimmungen — zwischen Dr. Bødtkers Untersuchungen von Gytje aus Sandefjord und dem Schlamme aus den verunreinigten Lokalitäten zeigen.

Überhaupt sehen wir bei diesen Schwefelwasserstoffanalysen niemals eine Ausnahme von demjenigen Resultate, welches wir von vornherein erwartet haben, nämlich: dafs der Schlamm eben im innersten Teile des Hafens und untersten Teile des Flusses am meisten verunreinigt war.

Was die Untersuchungen betrifft, bei welchen in der Umgebung des Bisletsieles in Piperviken nur 1,32 g pro 1 kg getrockneten Schlammes gefunden wurden, sei erwähnt, dafs diese Schlammprobe in der unmittelbaren Nähe des Sielauslaufes entnommen wurde, wo der lose ›Schlick‹, in dem sonst fast immer bedeutende Mengen Schwefelwasserstoffs nachgewiesen sind, wie bereits früher besprochen, vollständig fehlte. Dagegen wurde letztere Art Schlamm schon in 4—5 m Entfernung von der Sielemündung angetroffen, und es ist das Resultat einer Analyse an dieser Stelle, welches als Nr. 2 derselben Versuchsreihe aufgeführt worden ist. Einen entsprechenden Unterschied haben wir bei den Stickstoffanalysen nicht beobachtet. Da der Schwefelwasserstoff aus dem Schlamme nur in freiem Zustande entweichen und dadurch die Luft der betreffenden Lokalitäten verunreinigen kann, haben wir z. T. auch die Menge des freien Schwefelwasserstoffes für sich bestimmt. Für diesen Zweck wurden gewogene, mit etwas Wasser vermischte Proben von ›Schlick‹ ohne Säurezusatz in Kolben gebracht und Wasserstoff durchgeleitet; der Schwefelwasserstoff mußte eine Jodlösung passieren etc. wie in den oben besprochenen Versuchen; er wurde nicht erhitzt. Die Menge des freien Gases wurde bei diesen Analysen (April 1901) in bezw. 200 und 4—5 m Entfernung von dem Bisletsiele in Piperviken zu 0,24 und 1,06 g pro 1 kg getrockneten Schlammes bestimmt. Zur gleichen

Zeit war der entsprechende Gehalt einige Meter vor dem Auslaufe des Sieles in Filipstad 0,41 g. Nachdem Salzsäure zugesetzt war, wurde ferner bezw. 2,61, 4,05 und 5,61 g Schwefelwasserstoff in gebundener Form gefunden.

Auf den »feuchten« Schlamm berechnet, entsprechen diese Werte bezw. 0,068, 0,247 und 0,098 g pro 1 kg. Von diesen Zahlen ist die erste kleiner, die zweite ca. dreimal so groß, und die dritte ein wenig größer als die von Dr. Bödtker in Gytje aus Sandefjord gefundene; in letzterer war indessen aller Schwefelwasserstoff in freiem Zustande vorhanden.

Indessen haben diese Untersuchungen u. E. insofern wenig zu bedeuten, als die im Schlamm enthaltenen Gasblasen und dadurch ein Teil des freien Schwefelwasserstoffes beim Aufholen des Schlammes entweichen und deshalb auch nicht durch die Analyse bestimmt werden. Hierzu kommt weiter, daß die bedeutende Menge Schwefelwasserstoff, die in dem Schlamm in gebundener Form zugegen ist, zum großen Teil in so leicht spaltbaren Verbindungen vorkommt, daß sie auch von Kohlensäure, die nach unseren Untersuchungen ebenfalls im Schlamm gebildet zu werden scheint, freigemacht werden kann.¹⁾ In dem »Schlick«, der den Grund des Flusses und des inneren Abschnittes des Hafens bedeckt, wird daher die Entwicklung von freiem Schwefelwasserstoff und dadurch auch eine Verunreinigung der Luft viel erheblicher und kontinuierlicher sein, als wo es sich um die von Dr. Bödtker untersuchte »Gytje« handelt; denn, wie erwähnt, enthält letztere neben dem freien Gase keine Sulfide.

Aus den in diesem Abschnitte besprochenen Untersuchungen geht hervor:

Daß man schon nach dem Verhalten des Sielwassers im Laboratorium annehmen darf, daß sich die Schwebestoffe desselben zum großen Teil schon in verhältnismäßig kurzer Entfernung von den Sielermündungen im Flusse Akerselven und im, bezw. um den Hafen zu Boden schlagen;

daß diese Annahme auch mit den bei den Baggerarbeiten der Hafendirektion gewonnenen Erfahrungen übereinstimmt;

daß sie auch bestätigt wird durch die Gärungsprozesse, die an den erwähnten Lokalitäten unter dem Wasser stattfinden und mit dem unbewaffneten Auge beobachtet werden können; ebenfalls stimmt die erwähnte Annahme mit dem Gestanke, der dem Flusse, dem Hafen und Frognerkilen entlang zu berechtigten Beschwerden Anlaß gibt;

1) Wenn man daher versucht, den Gehalt des Schlammes an freiem Schwefelwasserstoff mittels Durchleiten von Kohlensäure zu bestimmen, bekommt man größere Zahlen, als der Wirklichkeit entspricht. In solchen Versuchen muß man deshalb Wasserstoff zum Durchleiten verwenden.

dafs diese Annahme auch durch den Unterschied bestätigt wird, der in Bezug auf Geruch und chemische Zusammensetzung zwischen Schlammproben besteht, die einerseits aus dem inneren Hafen und dem unteren Teile des Flusses, anderseits in kurzer Entfernung von den Hafenuais und im oberen Laufe des Flusses entnommen sind.

Es würde daher von Interesse sein, während des Sommers auch den Grad der Verunreinigung der Luft in der Umgebung des Flusses und Hafens quantitativ zu bestimmen; vor allem würde es interessieren, den Schwefelwasserstoffgehalt dieser Luft festzustellen. Auf diesem Wege könnte man vielleicht auch einen zahlenmäßigen Beweis dafür leisten, dafs der Gestank längs dem oberen Abschnitte Akerselvens — von Hausmanns-Bücke oder Nybroen und weiter flussaufwärts — weitaus geringer ist, als längs dem unteren Teile des Flusses, ein Verhalten, welches wir bisher nicht endgültig als erwiesen ansehen.

Solche Versuche haben wir indessen aufser Betracht lassen müssen und können uns schon aus diesem Grunde nicht darüber aussprechen, inwiefern die in Frage stehenden, übelriechenden Gase die Gesundheit der umwohnenden Bevölkerung direkt schädlich beeinflussen.

Wir geben daher als eine Möglichkeit zu, was im Jahre 1875 von der erwähnten Pariser Kommission ausgesprochen wurde, nämlich dafs ein solcher schädlicher Einflufs durch die starke Verdünnung der stinkenden Gase mit der umgebenden Luft verhindert wird. Doch ist dies erstens nicht aufser allem Zweifel festgestellt, indem Schwefelwasserstoff selbst in einer Verdünnung von 3—5 auf 10000 »acute« Vergiftungen hervorrufen kann¹⁾, und daher, wenn er durch längere Zeit eingeatmet wird, auch in noch gröfserer Verdünnung vielleicht Vergiftungen mehr chronischer Natur hervorrufen könnte. Und ferner ist der entwickelte Gestank so belästigend, dafs er vollauf den Übelständen gleichgestellt werden mufs, welche durch grofse stinkende industrielle

1) K. B. Lehmann, Experimentelle Studien über den Einflufs technisch und hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Organismus. Teil V. Schwefelwasserstoff. Archiv f. Hygiene, 1892, Bd. 14, S. 176.

Betriebe verursacht werden, Betriebe, die weder die Gesundheitsbehörde noch die Stadtbewohner überhaupt sich gefallen lassen würden, falls sie in privaten Händen wären.

3. Über die Verunreinigung Akerselvns und des Hafens mit den gelösten Stoffen und Bakterien des Sielwassers.

Wir haben im vorigen Abschnitte gesehen, daß die Schwebestoffe der städtischen Abwässer Christianias sich nach Entleerung in den Fluß Akerselven und in den Hafen in großer Ausdehnung mittels Sedimentierung abscheiden — eine »Selbstreinigung«, welche, wie allgemein anerkannt, sehr uneigentlich diesen Namen verdient; denn obwohl das Wasser selbst hierdurch reiner wird, wird anderseits der Grund des Flusses und Hafens zum Nachteil für die Stadt um so unreiner. Die Frage ist nun weiter, ob die Verhältnisse sich günstiger stellen, wo es sich um die »Selbstreinigung« des Fluß- und Hafenwassers von den übrigen Bestandteilen des Sielinhalts handelt. Um dies festzustellen, haben wir das Wasser des Flusses Akerselven und des Hafens untersucht.

Was erstens den Fluß betrifft, haben wir nur wenige Untersuchungen vorgenommen, indem schon das trübe Aussehen des Wassers zu dem Schlusse berechtigt, daß es während des längsten Teiles des Verlaufes durch die Stadt mit den ungelösten Stoffen des Sielinhalts erheblich verunreinigt sein muß. Und wenn dies der Fall, ist es auch nicht wahrscheinlich, daß auf dieser Strecke irgend welche nennenswerte Selbstreinigung von den übrigen Bestandteilen des Sielinhalts eingetreten sei. Unsere diesbezüglichen Untersuchungen des Flußwassers waren teils chemischer, teils bakteriologischer Natur. Von diesen haben die ersteren, wie dies bezüglich des Süßwassers erfahrungsgemäß öfters der Fall ist, nicht immer die erwarteten Resultate gegeben. An einem und demselben Tage (Frühling 1901) war zwar der Sauerstoffverbrauch pro Liter bei Nybroen (1,5 km flufsaufwärts von der Mündung) 10,8, bei Vaterlands-Brücke (1 km) 12,38 und bei Bispebroen (Bischofsbrücke 400 m flufsaufwärts von der Mündung) 11,87 mg — also 5—6 mal mehr als man für »reines« Wasser

rechnet. Dagegen betrug der Chlorgehalt bei Treschows-Brücke (ca. 5 km von der Mündung), bei Myren (ca. 4,1 km), bei Holms Fabrik (ca. 3,6 km) 7,08 und bei Schultzehougens Ziegelbrennerei (3,2 km) 8,58 mg pro Liter. Bei Vaterlands- und Schweigaards-Brücken, von denen letztere 800 m flussaufwärts von der Mündung des Flusses liegt, war letztere Zahl nur bis 14,12 mg gestiegen, um dann allerdings bei Bispebroen und gerade vor der Mündung des Flusses (Nyland) plötzlich zu 142 und 740 mg Chlor pro Liter emporzusteigen. Wenn man bedenkt, das z. B. Flüge 30 mg Chlor pro Liter als die höchste Grenze für brauchbares Trinkwasser anführt, und das gleichzeitig der Fluß auch an denjenigen Punkten seines Verlaufes, wo der Chlorgehalt nur zu ca. 7—9 mg pro Liter bestimmt wurde, immerfort Verunreinigungen von Sielwasser empfängt, kann diesen Chloranalysen keine Bedeutung beigemessen werden. Dagegen stimmt es einigermaßen mit der Verunreinigung, die wir im voraus erwarten durften, das wir z. B. an einem Tage in diesem Frühling bei der soeben erwähnten Treschows-Brücke, oberhalb welcher der Fluß u. a. durch das Schmutzwasser einer großen Weberei verunreinigt wird, 7370 Keime pro ccm fanden (im Wasser des Maridalssees, aus dem der Fluß entspringt, und der ca. 10 km oberhalb der Stadt liegt, hält sich die entsprechende Zahl gewöhnlich unter 100). An demselben Tage wurden an verschiedenen der soeben besprochenen Stellen stromabwärts (nämlich Myren, Holms Fabrik, Schultzehougen, Vaterlands-Brücke und Nyland mechanische Werkstätte) bezw. 2300, 1600, 4250, 106 000 und 208 000 Keime pro ccm gefunden.

Weit umfassendere Untersuchungen haben wir dagegen vorgenommen, um bezüglich der Verunreinigung des Hafenwassers ein Urteil zu gewinnen. Wie in der Einleitung dieser Abhandlung erwähnt, gibt es zur Zeit keine sichere Methode, um den Grad der Verunreinigung, welchen die gelösten Stoffe des Siel-inhalts im Meerwasser verursachen, direkt nachzuweisen. Dagegen haben wir auf indirektem Wege einen Einblick darin zu gewinnen versucht; zu diesem Zwecke verwendeten wir teils hydrographische Untersuchungen, teils Bakterienzählungen, deren

Resultate ja nicht allein den Grad der Verunreinigung mit den Bakterien selbst, sondern auch mit den gelösten Stoffen der Abwässer annähernd angeben.

A. Hydrographische Untersuchungen über das Wasser des Hafens von Christiania.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Beobachtungen über die Bedingungen der Selbstreinigung des Süßwassers sind die entsprechenden Untersuchungen über das Meerwasser bisher sehr sparsam. Es ist indessen von vornherein selbstverständlich, daß die Verunreinigung, die der städtische Sielinhalt im Hafenwasser Christianias verursachen kann, allmählich um so größer werden muß, je unbewegter das Wasser des Hafens ist; und umgekehrt: diese Verunreinigung wird um so weniger auffallend werden, je häufiger das Hafenwasser gegen reines Meerwasser von den äußeren Teilen des Fjordes ausgetauscht wird. Es war uns daher viel daran gelegen festzustellen, in welchem Umfange man annehmen kann, daß ein solcher Austausch stattfindet.

Zur Orientierung sei folgendes vorangestellt:

Wie in der Einleitung erwähnt, nimmt der Christianiafjord bei Dröbak erheblich an Breite ab. Gleichzeitig wird aber auch seine Tiefe geringer, indem der Meeresboden sich wie eine Schwelle quer über den Fjord als ein Rücken erhebt, der sich 60 m und weniger unter der Oberfläche des Wassers befindet, während der Fjord innerhalb Dröbak erstens viel breiter ist, zweitens aber auch eine viel größere Tiefe — bis 100 und 180 m — erreicht. Es ist somit wahrscheinlich, daß diese Verhältnisse dem Austausch der Wassermassen innerhalb Dröbaks Hindernisse in den Weg legen werden. Durch Untersuchungen über den Salzgehalt und die Temperatur des Wassers, wie durch Beobachtungen biologischer Natur haben denn auch Petterson und Ekman für schwedische und Johan Hjort und seine Mitarbeiter für norwegische Muldenfjorde nachgewiesen, daß diejenigen Wassermengen, die an der Innenseite dieser Schwellen unter dem Niveau derselben stehen, während längerer Zeiträume ruhig

stehen bleiben, ohne weder ausströmen resp. einströmen zu können, noch mit den oberhalb der Schwelle stehenden Wasserschichten in Austausch treten zu können. Dies ist auch von Hjort für die innerhalb Dröbak auf einer Tiefe von 60 m und darüber stehenden Wassermengen dargethan. Die natürlichen Verhältnisse bei Dröbak wirken aber wahrscheinlich auch ungünstig auf die Erneuerung derjenigen Wassermassen, die im inneren Fjorde oberhalb des Niveaus der »Schwelle« bei Dröbak stehen.

Erstens haben nämlich Hjort und Gran¹⁾ durch Untersuchungen des äußeren Teiles des Christianiafjordes — welcher durch eine neue Schwelle, die ungefähr in derselben Tiefe wie diejenige bei Dröbak liegt, von Skagerack getrennt wird — nachweisen können, daß dieselben Eigenschaften, welche die tiefsten Wasserschichten des Fjordes charakterisieren, nämlich ein verhältnismäßig hoher Salzgehalt in Verbindung mit einer relativ niedrigen Temperatur bis zu 20—30 m unter der Oberfläche verfolgt werden können — eine Erscheinung, welche in starkem Gegensatz zu den gleichzeitigen Verhältnissen im Skagerack stehen. Dieses Verhalten kann allein in der Weise erklärt werden, daß das Wasser in dieser Tiefe nicht umgetauscht werden kann; und wenn dies der Fall ist, gilt dasselbe wahrscheinlich auch in Bezug auf den Fjord innerhalb der Schwelle bei Dröbak.

Was aber für die vorliegende Frage von der weitaus größten Bedeutung ist, sind die Untersuchungen von Hjort und seinen Mitarbeitern über das Verhalten der oberflächlichen Wasserschichten des Fjordes. Er hat nämlich gefunden, daß dieselben im Sommer um so weniger salzhaltig werden, d. h. daß sie um so mehr Süßwasser enthalten, je weiter man den Fjord hinauf kommt. So war dies der Fall während der Sommer 1897 und 1898, indem Hjort z. B. im September 1897 folgende Salzgehalte der Fjordoberfläche fand: bei Horten (ca. 60 km von

1) Die hierher gehörenden Untersuchungen von Hjort und seinen Mitarbeitern sind unter dem Titel gesammelt: Joh. Hjort, *Report on Norwegian fishery- and marine investigations. Vol. I, 1900. Christiania, 1900.* Ebendasselbst ist auch die übrige Litteratur citiert.

Christiania) 20,94, bei Dröbak (ca. 35 km) 20,34, bei Spro (zwischen Dröbak und Christiania, ca. 20 km von der letzten Stadt) 19,37 und bei dem Leuchtturm Dyna (3 km südlich von Christiania) 17,01 ‰. Im Dezember 1896 war das Verhalten insofern ein anderes, als der Salzgehalt der Oberfläche des ganzen Fjordes etwas höher als im Sommer gefunden wurde; aber auch zu dieser Jahreszeit war er bei Steilene (14 km von Christiania) niedriger als bei Dröbak und — zwar erst in einiger Tiefe — niedriger als bei Horten, indem in bezw. 0 und 30 m Tiefe bei Horten 29,83 und 34,10, bei Dröbak 31,4 und 34,13, aber bei Steilene 30,94 und 32,67 ‰ Salz gefunden wurde.

Ganz anders waren dagegen die Befunde im März 1897, da das Oberflächenwasser des Fjords umgekehrt um so salzhaltiger gefunden wurde, je weiter man den Fjord hinauf kam. Der Salzgehalt der Oberfläche war nämlich: in Skagerack 25,06, bei Färder (südlichster Punkt des Fjords) 25,06, bei Dröbak 29,66, aber bei Steilene 32,03 ‰.

Da die hierher gehörenden Untersuchungen meistens nicht kontinuierlich, sondern mit längeren Zwischenräumen ausgeführt sind, sprechen sich Hjort und Gran etwas reserviert über die Ursachen ihrer Befunde aus; im großen Ganzen nehmen sie aber an, daß dieselben folgendermaßen zu erklären seien:

Wenn das Süßwasser sich im Meer entleert, mischt es sich nach den Untersuchungen der Hydrographen nur sehr langsam mit dem Meerwasser; da es leichter als das letztere ist, mischt es sich während längerer Zeit nur mit den oberflächlichen Schichten desselben, was sich dadurch zu erkennen gibt, daß das spezifische Gewicht und der Salzgehalt dieser Schichten verhältnismäßig gering sind.

Nun haben indessen andere Untersuchungen gezeigt, daß die Richtung der Strömungen in diesen oberflächlichen Schichten des Meeres in wesentlichem Grade von dem Winde bestimmt wird, der, wie von Hjort hervorgehoben, nach den vieljährigen Beobachtungen von Prof. Mohn im Christianiafjorde vom Mai bis September vorherrschend südlich ist, während umgekehrt vom Oktober bis April nördliche Winde daselbst die häufigsten sind.

Die oberflächlichen Wasserschichten mit dem darin enthaltenen Süßwasser müssen daher während des Sommers im Fjorde aufgehäuft werden; während sie im Winter und Frühjahr durchgehends den Fjord hinaus getrieben werden, so daß zuletzt Wasserschichten, die früher verhältnismäßig tief lagen und daher erheblich mehr Salz enthalten, an deren Stelle an die Oberfläche emporrücken.

Diese Annahme stützt Hjort u. a. auch darauf, daß das Plankton, welches sonst in der Oberfläche des ganzen Fjords vorhanden ist, im Frühjahr nicht im inneren Teile des Fjordes (bei Steilene und Dröbak) nachgewiesen werden konnte. Dies stimmt gut mit der Ansicht überein, daß Wasserschichten, die früher tiefer lagen, zu dieser Jahreszeit an die Oberfläche emporgerückt sind; denn die tieferen Wasserschichten sind besonders planktonarm. Hierdurch erklärt es sich auch, daß die Temperatur der oberflächlichen Wasserschichten im März 1897 im inneren Teile des Fjordes höher war als im äußeren Abschnitte desselben, an welcher letzteren Stelle das Oberflächenwasser nach den obenstehenden Voraussetzungen eben am längsten mit der kalten Winterluft in Berührung gewesen sein sollte.

Bevor wir weiter gehen, muß hervorgehoben werden, daß die hier in Frage stehenden Verhältnisse vielleicht auch mit den gleichzeitigen Zuständen des Skageracks in Verbindung stehen. Es ist eine Thatsache, auf die schon Prof. Mohn in den Arbeiten der norwegischen Nordmeeresexpedition aufmerksam gemacht hat, daß sich im Frühjahr und Frühsommer eine recht starke westgehende Oberflächenströmung von dem südlichsten Ende des Christianiafjords der Südküste Norwegens entlang bewegt. Dieser Strom repräsentiert den nördlichen Zweig der Strömung, die durch die Frühlingsflut in der Ostsee durch die nordeuropäischen Flüsse entsteht, und kann möglicherweise dazu beitragen, daß zu dieser Jahreszeit die oberflächlichen Wasserschichten aus dem Christianiafjorde ausgesaugt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen Hjorts sind durch schwedische Beobachtungen bestätigt und vervollständigt worden und haben ferner in den Ergebnissen der biologischen Unter-

suchungen, die er selbst später vorgenommen hat, eine Stütze gefunden. Wenn sie sich auch durch detaillierte Beobachtungen am Hafen Christianias als stichhaltig erweisen, darf man ihnen eine große Bedeutung für die vorliegende Frage beimessen. In diesem Falle muß man nämlich annehmen, daß nicht allein das Süßwasser, sondern auch der Sielinhalt, der direkt oder durch Akerselven dem Hafen zugeführt wird, während langer Zeiten des Jahres im letzteren aufgehäuft wird. Wie in der Einleitung erwähnt, ist das spezifische Gewicht des Sielinhalts nahezu wie dasjenige des Süßwassers, weshalb auch die Verunreinigung, welche der Sielinhalt nach Sedimentierung der Schwebestoffe dem Meere zuführt, vor allem in den oberflächlichen Wasserschichten des letzteren zu suchen ist. Dies Verhalten ist von mehreren Seiten, u. a. von Fischer mittels Bakterienzählungen festgestellt worden; dasselbe haben auch wir, wie später zu besprechen ist, in derselben Weise darthun können. Insofern ist es auch lehrreich, daß das Kanalwasser, welches von dem Oesterbroquartier in Kopenhagen auf 10 Fufs Tiefe in den Oeresund hinausgepumpt wird, nach Schierbecks Untersuchungen (Hospitaltidende 1899) senkrecht bis zur Oberfläche des Meeres emporsteigt, um sich erst an dieser auszubreiten. Nicht unwahrscheinlich würde es in ähnlicher Weise gehen, wenn man, wie von Ingenieuren angedeutet worden ist, durch eine Leitung unter dem Wasser den Sielinhalt Christianias auf größere Tiefen, z. B. außerhalb der Insel Hovedøen, herauspumpen würde.

Die oben besprochenen Verhältnisse sind auch von uns speziell untersucht worden, nämlich erstens mittels

a. Bestimmungen des Salzgehaltes des Hafenwassers.

Unsere diesbezüglichen Untersuchungen sind kontinuierlich vom April 1900 bis Mitte Mai 1901 ausgeführt worden. Die nötigen Wasserproben von der Fjordoberfläche wurden mittels eines Eimers oder mittels Flaschen aufgenommen. Was die tieferen Wasserschichten betrifft, wurden mit Kautschukpfropfen versehene Flaschen von 500 ccm in einem kleinen, zu diesem

Zwecke konstruierten Eimer mit schwerem bleiernem Boden ein geschlossen und zur betreffenden Tiefe hinabgesenkt, worauf mittels einer Schnur der Pfropfen hinausgerissen wurde. Wenn keine Luftblasen mehr durch das Wasser emporstiegen, wurden die Flaschen heraufgeholt. Da sie sich durch Kontrollversuche zuverlässig bis 25 m Tiefe erwiesen, und unsere Untersuchungen sich nur selten auf gröfsere Tiefen erstreckten, wurden nur ausnahmsweise andere »Wasserschöpfer« gebraucht.

Um den Salzgehalt zu bestimmen, titrierten wir das in 10 ccm des Wassers enthaltene Chlor mittels einer Silbernitratlösung von bekannter Stärke. Durch Vergleichen der hierdurch gewonnenen Zahlen mit denjenigen, die man mittels Aräometer erhält (wir benutzten einen Satz von speziell für Seewasser angefertigten Aräometern Kücklers), ergaben die letzteren Resultate, welche einem Fehler von 1‰ Salz nach auf- oder abwärts entsprechen, weshalb wir von deren Benutzung abstanden. Aus der durch Titrieren gefundenen Chlormenge wurde der Salzgehalt nach den von Petterson und Ekman in »Grunddragen af Skageraks och Kattegats Hydrografi« 1891 angegebenen Daten berechnet. Der Salzgehalt ist infolgedessen als Salz pro Mille ausgedrückt, d. h. die Anzahl Gramm Salze, die in einem Kilogramm Meerwasser enthalten sind. Als Grundlage für die Bestimmung des Titors der Silbernitratlösung wählten wir das von Prof. Otto Petterson und Chemiker S. Schmidt-Nielsen im Jahre 1898 in Vorschlag gebrachte »Standardwasser«¹⁾, das ist eine Chloridlösung (Meerwasser), dessen Chlorgehalt durch untereinander unabhängige Gewichtsanalysen von verschiedenen Chemikern bestimmt ist; dagegen ist die Silbernitratlösung nicht wie gewöhnlich auf kleine Portionen Kochsalz eingestellt. Der Vorteil dieses Verfahrens ist darin zu suchen, dafs man die möglichst gröfste Übereinstimmung unter den einzelnen Analysen erhält, und ebenso, dafs diese völlig mit den Untersuchungen anderer Hydrographen verglichen werden können.

1) Vergl. H. H. Gran, Hydrographic-biological studies of the North atlantic Ocean and the coast of Nordland, s. III. Reports on Norwegian Fishery- and marine-investigations. vol. I, 1900, no. 5. Christiania, 1900.

Unsere sämtlichen Analysen beziehen sich auf das in Stockholm 1898 eingeführte »Standard 1899«. Beim Ausrechnen haben wir die Manuskript-Tabellen von Prof. Petterson benutzen können, die nach gegenseitigem Übereinkommen bis auf die letzte Zeit von den gemeinschaftlich arbeitenden skandinavischen Hydrographen gebraucht worden sind.

Wir werden nicht auf alle Details der so ausgeführten Untersuchungen eingehen, indem sie nicht alle für die uns hier interessierenden Fragen von Bedeutung sind. Wir heben nur diejenigen Beobachtungen hervor, die an einem Punkte zwischen Herbern (an der Nordostspitze Bygdös) und Kavringen (an der Nordwestspitze der Insel Hovedöen) kontinuierlich bis zu 25 m Tiefe ausgeführt worden und in der Tabelle 6 wiedergegeben sind. Der Übersicht halber haben wir den Durchschnitt der daselbst angeführten Zahlen berechnet in der Tabelle 7a (S. 194.)

Aus diesen zwei Tabellen geht erstens hervor, daß auch das Meerwasser des Hafens Christianias in Übereinstimmung mit der oben gegebenen Darstellung immer in den oberflächlichen Schichten den niedrigsten Salzgehalt aufweist, d. h. daß eben diese Schichten am meisten mit Süßwasser vermischt sind. Ferner wird man aber sehen, daß der Salzgehalt der oberflächlichen Wasserschichten periodischen Schwankungen unterworfen ist, die von der Jahreszeit abhängig sind und genau den Schlüssen entsprechen, die Hjort in Bezug auf den ganzen Fjord gezogen hat. Insofern muß zwar die Oberfläche selbst außer Betracht gesetzt werden, als ein niedriger Salzgehalt derselben bisweilen nach Regengüssen eintreten kann (3./VII., 2./VIII., 9./VIII. 1900); auf der andern Seite schien ein solcher Gehalt im März 1901 durch einsetzendes Tauwetter mit Schmelzen und Lösen des Eises im und um den Fjord verursacht zu sein; und was den niedrigen Gehalt der Oberfläche am 23./IV. und 2./V. 1901 betrifft, ist derselbe wahrscheinlich mit dem stärkeren Schneeschmelzen in Verbindung zu setzen, das durch eine bedeutende Steigerung der Temperatur während der zweiten Hälfte des Aprils im Niederschlagsdistrikt Akerselvns und in den übrigen Umgebungen des

(Fortsetzung des Textes auf S. 194.)

Tabelle VI.
Bestimmungen der Temperatur nebst des Chlor- und Salzgehaltes des Wassers zwischen Kavrigen und Herbern
(ca. 2 km vom Bisletstol.)

(Der Chlorgehalt ist in Gramm per Liter, der Salzgehalt in Gramm per Kilo Meerwasser angegeben.)

Tiefe in Metern	1900.																							
	9. IV.	18. IV.	23. IV.	29. IV.	5. V.	5. V.	14. V.	19. V.	2. VI.	30. VI.	30. VI.	3. VII.	9. VII.	19. VII.	2. VIII.	6. VIII.	9. VIII.	11. VIII.	18. VIII.	22. VIII.	29. VIII.			
	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	Nm.	° C.	° C.	° C.	Vm.	Nm.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.	° C.		
0	Cl. pr. l	18,61	15,38	13,41	14,44	14,16	11,76	14,33	16,02	17,07	13,18	9,83	9,39	10,97	11,16	9,68	11,24	9,33	10,57	9,76	10,27	10,89		
	Salz o/oo	32,86	27,31	23,92	23,69	25,20	21,03	25,50	28,43	30,22	23,52	17,52	17,60	16,83	19,65	19,27	17,33	20,11	16,81	18,93	17,48	18,40	19,51	
3	° C.	—	5,8	5,95	6,0	6,4	7,1	6,3	—	—	18,2	18,5	—	15,7	—	18,7	—	—	—	—	18,2	17,5		
	Cl. pr. l	—	15,32	14,52	14,28	15,29	14,52	16,33	—	—	9,85	9,98	—	11,16	—	11,05	—	—	—	—	11,20	10,83	11,16	
5	Salz o/oo	—	27,22	25,82	25,42	27,17	25,82	28,95	—	—	17,65	17,79	—	19,87	—	19,77	—	—	—	—	20,04	19,39	19,97	
	° C.	—	5,0	—	—	6,5	—	6,1	—	—	17,3	17,5	—	14,7	20,4	18,0	—	—	—	—	—	—	17,0	
10	Cl. pr. l	18,74	16,48	—	—	15,29	—	16,48	17,33	—	10,89	10,60	—	12,79	10,18	11,90	—	—	—	—	11,41	11,05	11,71	
	Salz o/oo	33,10	29,21	—	—	27,17	—	29,21	30,67	—	19,51	18,97	—	22,83	18,24	21,28	—	—	—	—	20,42	19,77	20,49	
15	° C.	—	4,95	—	4,6	5,15	5,25	5,4	—	8,0	15,0	14,6	16,0	12,0	14,0	13,2	—	—	—	—	—	—	14,9	
	Cl. pr. l	—	16,92	18,18	15,76	17,92	17,22	16,85	17,35	18,18	17,00	14,03	14,34	12,27	15,59	14,86	15,23	—	—	—	—	—	—	12,22
20	Salz o/oo	—	29,96	32,13	27,98	31,69	30,48	29,84	30,72	32,13	30,10	24,98	25,52	21,92	27,68	26,42	27,06	—	—	—	—	—	—	—
	° C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9,2	10,0	14,0	—	8,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20 bis 25	Cl. pr. l	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16,67	16,38	15,42	—	17,07	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Salz o/oo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	23,53	29,04	27,88	—	30,22	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	° C.	—	—	—	5,25	5,8	—	5,7	—	5,9	—	—	—	7,9	7,7	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Cl. pr. l	—	—	—	18,00	18,69	—	18,62	—	18,33	—	—	—	17,49	17,44	—	—	—	—	—	—	—	—	
25	Salz o/oo	—	—	—	31,81	33,01	—	32,89	—	32,39	—	—	—	30,95	30,86	—	—	—	—	—	—	—	—	
	° C.	—	—	5,6	—	—	—	—	—	—	6,7	7,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
25	Cl. pr. l	—	—	18,56	—	—	—	—	—	—	18,51	18,41	—	—	18,41	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Salz o/oo	—	—	32,77	—	—	—	—	—	—	32,70	32,51	—	—	32,51	—	—	—	—	—	—	—	—	

1) D. i. per Kilo (siehe oben).

Fortsetzung zu Tabelle VI.

Tiefe in Metern	1900.												1901.									
	30. VIII	31. VIII	3. IX	4. IX	5. IX	6. IX	7. IX	29. X	1. XI	18. XII	28. XII	11. I	12. III	22. III	16. IV	23. IV	2. V	8. V	10. V	11. V	16. V	
0	° C.	17,1	17,6	16,8	15,8	16,1	14,8	14,4	7,2	6,9	2,3	2,8	0,2	1,5	0,8	3,5	7,9	11,8	9,4	7,5	9,6	11,05
	Cl. pr. 1	10,63	11,05	11,52	11,09	10,96	11,31	11,31	13,66	13,90	15,68	14,49	10,44	12,73	15,38	9,45	11,46	13,52	14,56	13,94	13,24	14,49
	Salz ‰	19,04	19,77	20,63	19,84	19,63	20,24	20,24	24,25	24,34	24,8	27,8	25,77	18,71	22,74	27,32	16,94	20,50	24,11	25,90	24,14	23,62
3	° C.	14,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cl. pr. 1	11,24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Salz ‰	20,11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	° C.	16,6	17,6	16,1	16,4	16,35	15,75	15,9	9,1	9,1	3,1	2,6	2,2	3,5	3,5	3,3	4,6	6,2	5,8	6,3	8,1	9,4
	Cl. pr. 1	11,76	11,52	11,65	11,86	11,86	12,43	12,21	15,24	15,19	15,78	15,68	16,02	17,57	17,26	16,48	15,47	15,30	15,52	15,29	14,43	14,10
	Salz ‰	21,03	20,63	20,83	21,22	21,22	22,21	21,81	27,09	27,00	28,0	27,8	28,42	31,09	30,55	29,22	27,47	27,18	27,56	27,16	25,33	25,10
10	° C.	13,0	14,8	14,6	14,9	12,95	12,3	12,2	9,8	3,3	3,5	3,5	5,2	4,9	4,8	3,4	4,0	4,7	4,4	5,0	6,5	6,7
	Cl. pr. 1	15,20	14,16	14,26	14,13	15,23	15,47	15,69	16,65	16,88	15,88	15,88	16,92	17,97	17,79	17,00	16,47	16,53	16,57	15,96	15,22	15,14
	Salz ‰	27,01	25,20	25,38	25,15	27,06	27,46	27,84	29,94	29,90	29,20	28,2	29,96	31,76	31,46	30,10	29,20	29,29	29,36	28,31	27,05	26,91
15	° C.	10,6	12,4	11,7	11,1	10,7	10,3	9,8	—	—	4,1	4,8	6,7	6,6	6,3	3,9	4,2	4,7	4,5	4,6	4,7	4,9
	Cl. pr. 1	16,31	15,61	15,83	16,10	16,31	16,37	16,63	—	—	16,31	16,41	17,54	18,29	18,43	17,51	17,39	17,48	17,94	16,40	16,33	16,75
	Salz ‰	28,90	27,72	28,10	28,57	28,90	29,02	29,47	—	—	28,9	29,1	31,04	32,32	32,56	30,99	30,77	30,93	30,70	29,07	29,31	29,67
20	° C.	9,0	9,45	—	9,5	8,9	8,5	9,1	—	—	7,4	6,3	7,2	6,8	6,6	5,7	6,0	6,3	5,6	5,7	5,0	5,9
	Cl. pr. 1	17,05	16,67	—	16,74	16,91	17,12	17,17	—	—	17,64	17,46	17,79	18,61	18,57	18,26	18,08	18,40	18,38	18,04	17,72	17,98
	Salz ‰	30,19	29,53	—	29,65	29,93	30,31	30,38	—	—	31,20	30,9	31,51	32,86	32,79	32,37	31,96	32,50	32,47	31,89	31,35	31,78
20 bis 25	° C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cl. pr. 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Salz ‰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Fjords eintrat. Wenn man aber hiervon absieht, geht es aus den Tabellen hervor, daß der Salzgehalt des Hafenwassers, in voller Übereinstimmung mit Hjorts Schlüssen, im Frühling 1900 sehr hoch war, um dann — nach einem Übergange im April und Mai — während des Sommers bedeutend abzunehmen. Darauf ging der Gehalt wieder im Herbst und Winter etwas in die Höhe, um im März 1901 ein neues Maximum zu erreichen. Nach dieser Kulmination trat wieder eine neue Abnahme ein, welche etwas stärker als diejenige der entsprechenden Monate des vorigen Jahres gewesen ist.

Tabelle VIIa.

Tiefe	Salzgehalt im Durchschnitt pro Mille					
	9. IV. 1900	18. IV. bis 2. VI. 1900	3. VI. bis 7. IX. 1900	24 X. bis 11. I. 1901	März 1901	April bis Mai 1901
An d. Oberfläche	32,86	25,6	18,7	25,5	20,8	23,2
5 m	33,10	29,0	20,8	27,7	30,9	27,1
10 m	—	30,5	25,0	29,1	31,6	28,6
20 m	—	32,5	30,3	31,0	32,8	32,1
24—25 m . .	—	32,8 (29. IV.)	32,5	nicht untersucht	nicht untersucht	32,8

Dieser Unterschied ist, wie aus den Tabellen (Tab. 7a) ersichtlich, besonders augenfällig in 5 m Tiefe, wo der Salzgehalt am 9. April 1900 sogar 33,10‰ erreichte — eine Zahl, die wir später erst in 20—25 m Tiefe gefunden haben. Im Laufe der nächsten Monate wurde in derselben Tiefe als Durchschnitt 29‰ gefunden, worauf der Gehalt während des ganzen Sommers bis zum September durchschnittlich auf 21 pro m herunterging, d. h. der Salzgehalt war im Durchschnitt ca. 27‰ niedriger als in den zwei vergangenen Monaten. Gegen das Ende des Jahres wurde er wieder als Durchschnitt zu ca. 27,7‰ bestimmt, erreichte dann im März 1901 sein zweites Maximum mit ca. 31‰ und ist in den paar folgenden Monaten bis ca. 27‰ gesunken.

Wie die Tabelle zeigt, ist dieselbe Erscheinung noch bis 20 m Tiefe sehr deutlich, jedoch in der Weise, daß sie um so weniger hervortritt, je tiefer man kommt, bis der Unterschied zwischen den Jahreszeiten in 20—25 m Tiefe — wo wir zwar wenig Untersuchungen vorgenommen haben — verschwindend ist.

Es ist einleuchtend, daß diese Schwankungen, die wir auch an anderen Punkten des Hafens festgestellt haben, allein dadurch zu erklären sind, daß das den oberflächlichen Wasserschichten beigemengte Süßwasser während des Sommers in größeren Mengen aufgehäuft ist als im Herbst und Winter, und daß diese Mengen während der letztgenannten Jahreszeiten wieder größer sind als im Frühling. Fragt man, wodurch diese Erscheinung hervorgerufen wird, kann sie nicht dadurch zu erklären sein, daß durch den Fluß Akerselven oder durch Niederschläge dem Hafen während gewisser Jahreszeiten mehr Süßwasser zugeführt wird, als während anderer. Wie wir gesehen haben, können zwar solche Schwankungen zum Teil einen vorübergehenden Einfluß auf den Salzgehalt der Oberfläche selbst ausüben; im allgemeinen wird aber dieser Gehalt sowohl, wo es sich um die Oberfläche als um die tieferen Wasserschichten handelt, von ganz anderen Faktoren bestimmt. Sonst könnte nicht der Salzgehalt im Frühjahr, wenn der Schnee schmilzt und damit speziell große Mengen Süßwassers dem Hafen zugeführt werden, um vieles höher als im Sommer sein.

Wir müssen daher mit Hjort die Erklärung darin suchen, daß in den oberflächlichsten und damit süßesten (und damit zu gleicher Zeit auch am meisten verunreinigten) Wasserschichten Strömungen stattfinden, die zu gewissen Jahreszeiten dieselben im Hafen aufstauen, zu anderen Zeiten ihnen dagegen einen leichteren Abfluß aus dem Fjord hinaus gestatten.

Um diesen Fragen näher zu treten, haben wir ferner eine Reihe

b. Untersuchungen über die Strömungsverhältnisse des Hafens

ausgeführt. Es ist ohne weiteres klar, daß solche Untersuchungen ohne Rücksicht auf die obenstehenden Beobachtungen über den Salzgehalt von wesentlicher Bedeutung für die vorliegende Frage sein müßten. Denn falls die Richtung der Strömung der oberflächlichen Schichten des Hafenwassers in größerer Ausdehnung konstant den Fjord hinausgeht, wird das Hafen-

wasser nach dem, was bezüglich der Verunreinigung eben dieser Wasserschichten angeführt worden ist, sich ganz anders rein halten müssen, als wenn es eine solche Strömung nicht gibt und das Hafenwasser im wesentlichen als ein stillstehendes Bassin betrachtet werden muß. Da diese beiden Anschauungen häufig in der täglichen Diskussion der Bewohner von Christiania ausgesprochen werden, ohne daß Beweise für die Richtigkeit der einen oder der andern derselben erbracht sind, haben wir auf verschiedene Weise diesen Punkt selbst aufzuklären versucht.

Leider haben wir diese Untersuchungen wegen fehlender Assistenz auf den Sommer 1900 beschränken müssen. Teils wurden sie während unserer gewöhnlichen Expeditionen auf dem Hafen ausgeführt, teils haben wir spezielle Exkursionen zu diesem Zwecke veranstaltet; sie wurden hauptsächlich vom ca. 18. Juli bis zum 20. August 1900 vorgenommen und wurden gewöhnlich mehrere Tage nacheinander und zu den verschiedensten Tageszeiten ausgeführt; zum Teile fanden sie am Abend und während der Nacht statt.

In allem Wesentlichen haben wir uns auf die Oberfläche des Hafenwassers beschränkt. Teils haben wir die Richtung beobachtet, nach welcher die Schaumblasen, kleinste Holzspäne u. dgl., die überall an der Wasseroberfläche herumschwimmen, hintreiben. Teils haben wir die Ortsveränderungen ausgeworfener hohler Glaskugeln und Holzklötze beobachtet; diese haben wir öfters durch längere Zeit von einem Boote aus beobachten müssen, weil sie sonst von Vorüberrudern aufgefischt wurden. Aus den diesbezüglichen Untersuchungen ergeben sich folgende Schlüsse:

Die Strömungen der oberflächlichen Wasserschichten des Hafens Christiania werden im Sommer zum größten Teile ausschließlich von der Windrichtung bestimmt. Ist der Wind südlich, ist die Richtung der Strömung eine nördliche, d. i. die oberflächlichen Schichten treiben nach den Quais zu; ist der Wind dagegen nördlich, geht die Strömung umgekehrt zum Fjord hinaus. Ein ganz schwacher Wind genügt, um diese Wirkung hervorzubringen; selbst wenn das Wasser ganz still scheint, genügt der schwache, südliche Luftzug, der dennoch während

eines Sommertages gewöhnlich verspürt wird, um alle Schaumblasen u. s. w. an der Oberfläche des Wassers in der Richtung der Quais zu treiben, und umgekehrt vermag der schwache nördliche Zug, der sich während der Sommerabende und -Nächte so oft einstellt, selbst wenn das Wasser spiegelglatt liegt, der Trift eine Richtung den Fjord hinaus zu geben. Schliesslich ist dies Verhalten um so ausgesprochener, je stärker der Wind ist; ist der Wind einigermassen stark, so ist es nicht allein an der Oberfläche, sondern öfters auch bis mehrere Meter Tiefe, dass der Wind nachweisbar diesen Einfluss übt. Unter diesen Umständen muss es aber in Übereinstimmung mit Hjorts Schlüssen eine Folge werden, dass die oberflächlichen Wasserschichten des Hafens im Sommer, wenn südliche Winde vorherherrschend sind, nur zum geringsten Teil den Fjord hinaus Abfluss bekommen können; und ist dies der Fall, muss auch das Süswasser und damit auch der Sielinhalt, der, wie erwähnt, eben diesen Wasserschichten beigemischt ist, zu dieser Jahreszeit im Hafen aufgehäuft werden.

Wir sind demnach auch mit Rücksicht auf die Strömungsverhältnisse im Sommer zum selben Resultat gekommen, welches sich aus den Bestimmungen des Salzgehaltes ergab, nämlich dass der Hafen sehr ungünstige Bedingungen für eine »Selbstreinigung« des Meerwassers darbietet.

Man kann indessen gegen einen solchen Schluss vielleicht erstens einwenden wollen, dass es im Hafen Christianias wenigstens eine konstante auslaufende Strömung gibt, nämlich diejenige, welche die Fortsetzung des Stromes der Mündung von Akerselven bildet. Eine solche Strömung hat u. a. seit lange der Stadtbaurat Andersen beobachtet, wie auch wir dieselbe haben feststellen können; sie setzt von der Mündung Akerselvans schräg¹⁾ über den östlichen Hafen (Björviken) ein und biegt dann in südlicher Richtung um, indem ein Zweig des Stromes in die früher besprochene Bucht an der Nordostseite Hovedøens

1) Diese schräge Richtung wird durch den Auslauf des Baches Loelvans verursacht; letzterer mündet etwas südlich vom Akerselven und senkrecht auf die Richtung der Mündung des letzteren.

einsetzt, während der Hauptstrom um die Nordwestseite dieser Insel umbiegt. An dem südwestlichen Ende der Insel läßt diese Strömung sich aber zufolge unserer Untersuchungen nicht mehr nachweisen, indem Holzspäne u. dgl., die bis hierher geführt sind, teils mit dem Winde zu treiben anfangen, wodurch sie, wenn er südlich ist, gegen die Stadt zu und besonders gegen den westlichen Hafen, Piperviken, getrieben werden; so wird es verständlich, daß Holzklötze, die wir in den Akerselv ausgeworfen haben, bei Filipstad im westlichen Hafen wieder gefunden sind.

Teils kann auch bisweilen im Sunde, welcher das südliche Ende Hovedøens von der Insel Lindøen trennt, eine Strömung auftreten, die vom Bundefjord schräg gegen den nordöstlichen Teil von Bygdø hinübersetzt, wo sie sich verliert, und der Wind für die Richtung der Trift wieder bestimmend wird.

Andere konstante Strömungen der Oberfläche des Hafengewässers haben wir nicht nachweisen können. Indessen wird man einen anderen Einwand gegen unsere Schlüsse erheben können, der auf den ersten Blick von großem Gewicht zu sein scheint, nämlich daß es doch im Hafen von Christiania auch Ebbe und Flut gibt, die durchschnittlich eine Höhe von ca. 30 cm erreichen. Daß dies an und für sich genügt, um große Wassermengen in Bewegung zu setzen, geht aus einer Berechnung hervor, die Herr Ingenieur Salicath gütigst vorgenommen hat.

Der Flächeninhalt desjenigen Abschnittes des Hafengebäudes und dessen Umgebungen, der vom festen Lande und den Inseln Nakholmen, Gräsholmen, Blegøen und Sjursøen eingeschlossen wird, d. h. das gesamte innere Hafenterritorium, beträgt nach Abzug des Areals der Inseln ca. 7,6 qkm, d. h. wenn die Höhe der Ebbe und Flut die eben genannte (30 cm) ist, sollte diesem Teile des Hafens während der Flut ca. $2\frac{1}{4}$ Millionen cbm Wasser aus dem Fjorde zugeführt werden, während umgekehrt bei der Ebbe dieselbe Wassermenge entleert werden sollte. Da nun in 24 Stunden zweimal Flut und Ebbe eintreten sollten, also in diesem Zeitraume durchschnittlich dem genannten Hafenteil

in allem ca. $4\frac{1}{2}$ Million cbm Wasser, welches als sehr rein angenommen werden darf, zugeführt werden. Gleichzeitig muß aber in demselben Zeitraume eine entsprechende Wassermenge den Fjord hinaus Abfluß bekommen haben. Da nun ferner ein solches Wasserquantum dem Zehnfachen der durchschnittlichen Wasserführung von Akerselven in 24 Stunden (ca. 432 000 cbm) entspricht, wird man sich vielleicht vorstellen können, daß, wie es sich auch sonst mit den Strömungen verhält, diese Wassermengen mehr als genügend sein müssen, um den Sielinhalt, der sich in den Hafen entleert, immer stark zu verdünnen. Nach unseren Untersuchungen ist dies aber auch nicht richtig. Wenn Flut und Ebbe für die Verdünnung des Sielinhaltes Bedeutung haben soll, müssen nämlich zufolge der gegebenen Darstellung die daraus bedingten Strömungen die oberflächlichen Wasserschichten des Hafens betreffen; und eben dies ist nach unseren Beobachtungen während der Sommermonate nicht der Fall. Bei südlichen Winden war die Strömung der Oberflächenschichten des Hafenwassers immer nach der Stadt gerichtet, und war der Wind auch noch so schwach, hatte weder Ebbe noch Flut einen Einfluß auf dieses Verhalten. Umgekehrt ging die Strömung bei nördlichem Winde unter denselben Verhältnissen immer den Fjord hinaus.

Um dies näher festzustellen, haben wir erstens einen von Hjort angegebenen »Tiefenflotteur« verwendet; derselbe besteht aus zwei zirkulären Flügeln aus Segeltuch von ca. 1 m Diameter, die in zwei entsprechenden Ringen aus dünnem Kupferdraht befestigt und kreuzweise und senkrecht ineinander angebracht sind. Der Flotteur wird im Wasser zu verschiedenen Tiefen hinuntergesenkt, nachdem er mittels einer dünnen Schnur an eine auf der Oberfläche schwimmende, schmale, hölzerne Stange festgebunden und abbalanciert worden ist. Wenn wir von einem einzigen Male absehen, da ein starker Nordwind eine südwärts gehende Strömung an der Oberfläche hervorrief, während der Flotteur schon in einer Tiefe von einigen Metern sich in nördlicher Richtung bewegte — haben wir sonst regelmäßig gefunden, daß der Flotteur in wenigen Metern Tiefe sich in der-

selben Richtung wie die Schaumblasen u. s. w. an der Oberfläche des Wassers bewegte; Ebbe und Flut waren insofern ohne Einfluß. In größeren Tiefen haben wir dagegen kein überzeugendes Resultat erhalten.

Dafs die oberflächlichen Wasserschichten unter gewöhnlichen Verhältnissen nicht von Ebbe und Flut beeinflusst werden, scheint auch aus einigen am 3.—7. September und 30.—31. August 1900 ausgeführten Untersuchungen über den Salzgehalt hervorzugehen (vgl. Tabelle 6 und 7^b). Obgleich diese teils am Vormittage während der Flut, teils am Nachmittage während der Ebbe vorgenommen wurden, war das Resultat durchgehends ein und dasselbe, welches auch, wenn von der Wasseroberfläche abgesehen wird, bezüglich der Nachmittagsuntersuchungen in der Nacht, die am 10. August 1900 vorgenommen wurden, der Fall war.

(Siehe Tabelle 7 b auf S. 201.)

Möglicherweise wird man imstande sein, diese Verhältnisse mit einem neulich von Prof. Nansen konstruierten Strommesser näher festzustellen. Wir kommen demnach zu dem Resultate, dafs die oberflächlichen und somit am meisten verunreinigten Wasserschichten des Hafens Christiania im Sommer wegen der Windrichtung in der Hauptsache — wenn auch nicht wörtlich — als stillstehend zu betrachten sind; wenn sie z. B. von dem schwachen nördlichen Zuge, der, wie erwähnt, so oft während der Sommerabende und -Nächte verspürt wird, den Fjord hinaus in Trift gesetzt werden, wird der viel stärkere Südwind, der zu dieser Jahreszeit durchgehends am Tage herrscht, sie schnell wieder in den Hafen zurücktreiben.

Bevor wir diesen Abschnitt verlassen, müssen wir wieder betonen, dafs diese Untersuchungen über die Strömungen ausschliesslich dem Sommer gelten, d. h. der Jahreszeit, da die Verunreinigung des Hafens mit Rücksicht auf den Boden die weitaus größte Bedeutung für die Bevölkerung hat. Dafs die Resultate korrekt sind, wird auch durch einige Untersuchungen bestätigt, die Ekman im Monat April 1901 mit dem erwähnten, von Prof.

Tabelle VIIb.
Beobachtungen über Flut und Ebbe.
Salzgehaltbestimmungen.

Datum	Tageszeit	Untersuchungsstation	Tiefe in m	Temp. des Wassers	Salz- gehalt pr. kg	
1900				0° C.		
10./8.	6.30 Nachm. (Ebbe)	Boje westlich von Kavringen	0	—	19,65	
		ca. 1 km von der Sielemündung	3	—	19,99	
		in Piperviken)	5	—	20,42	
		—	10	—	21,92	
	12 Mitter- nacht (Flut)	—	—	0	—	17,86
		—	—	3	—	19,99
		—	—	5	—	20,42
		—	—	10	—	21,97
30./8.	Nachmittag (Ebbe)	Grönlien	0	18,5	16,22	
		Hovedøen, N.-O.-Spitze	0	18,7	19,63	
		Hägholmen	0	17,9	19,63	
		Langø-Malmøkalven	0	18,2	20,17	
		S. Skjærholme	0	17,9	20,69	
		Helvik (Näsodden)	0	17,8	20,62	
		Näsodden-Snarøen	0	17,9	20,29	
		Näsodden	0	17,8	20,42	
31./8.	Vormittag (Flut)	Grönlien	0	16,9	17,93	
		Hovedøen, N.-O.-Spitze	0	17,3	19,51	
		Sjursøen-Kongshavn	0	17,4	20,17	
		Hägholmen	0	17,2	19,37	
		Hägholmen-Näsodden	0	17,3	20,22	
		Näsodden	0	17,6	20,29	
		Näsodden-Snarøen	0	17,6	20,17	
		Snarøen	0	17,6	18,71	
—	Frognerkilen (Insel »Dron- ningen«)	0	17,5	19,42		

Frithjof Nansen konstruierten Strommesser¹⁾ in der Lysakerbucht bei Christiania vorgenommen hat, und die auch zu dieser Jahreszeit den überwiegenden Einfluss des Windes auf die Richtung der Strömung an der Wasseroberfläche zu zeigen scheinen. Schon in Betracht der früher (S. 188) erwähnten Wirkung, welche die Strömung, die im Frühjahr längs der Südküste

1) V. Walfrid Ekman, On a new current-meter, invented by Prof. Frithjof Nansen. Nyt Magazin for Naturvidenskab. Bd. 39, H. 2. Christiania, 1901.

Norwegens westwärts geht, möglicherweise auf das Wasser im Christianiafjorde ausüben kann, möchten wir uns jedoch noch einmal dagegen reservieren wollen, daß die Windrichtung immer oder zu allen Jahreszeiten der einzige Faktor sei, der für die Strömungsverhältnisse des Hafens Christianias bestimmend ist.

Ferner haben wir ein Mafs für die Verunreinigung des Hafenwassers zu gewinnen versucht durch

B. Untersuchungen über den Bakteriengehalt des Hafenwassers.

Wenn Bakterienzählungen in der Methodik der Untersuchungen auf Verunreinigung der Gewässer eine so grofse Rolle spielen, kommt dies daher, daß das Sielwasser so grofse Mengen Keime enthält, daß schon eine geringe Verunreinigung mit demselben genügt, um den Bakteriengehalt des Süßwassers und der See bedeutend zu erhöhen. So schwankt, wie bereits früher erwähnt, der Keimgehalt des Sielwassers zu Christiania zwischen einigen Hunderttausenden und 50 Millionen per Kubikcentimeter. Zum Vergleiche erwähnen wir, daß Fischer bei seinen genannten Untersuchungen in Kiel dreimal zwischen 2 und 4½ Millionen, einmal etwas über 1 Million und zweimal 190 000 bezw. 325 000 per Kubikcentimeter Kanalwasser nachwies.

Für die hier zu besprechenden Untersuchungen wurde uns meistens vom Herrn Hafenkapitän Bassøe in liebenswürdigster Weise ein kleines Dampfboot zur Verfügung gestellt. Nur auf diese Weise konnten wir nämlich die nötigen Apparate, u. a. einen kleinen Eiskühler, zum Erstarren der Gelatineplatten während des Sommers mitführen.

Im übrigen sei nur über das Verfahren bei diesen Untersuchungen erwähnt, daß die aufgehenden Kolonien immer nach 48 Stunden gezählt wurden. Die Ausflüge, die wir zu diesem Zwecke vorgenommen haben, gingen immer von dem Piperviksquai, in der unmittelbaren Nähe des öfter genannten Bisletsieles (westlicher Hafen) aus. Meistens haben wir uns auf folgende Route beschränken müssen: Wir fuhren durch die westliche Einfahrt des Hafens (d. i. längs der Südostseite Bygdøs) bis nach der Spitze Näsoddens, d. h. 6 km in südwestlicher Richtung von

der Stadt; von diesem Punkte kehrten wir zurück durch die östliche Einfahrt, welche am Leuchtturm Hågholmen vorüber zwischen Hovedøen und Blegøen gelegen ist; gewöhnlich nach einem Abstecher nach Sjursøen, Kongshavn und Grønlien, bezw. 1,7, 1,2 und 0,6 km südlich von der Mündung Akerselvans, fuhren wir dann über Bjørviken (östlicher Hafen) zurück zum Piperviksquai¹⁾. In den Sommermonaten untersuchten wir zum Teil auch den Bundefjord, wie wir auch bisweilen die Verhältnisse bei Snarøen (7 km WSW. von der Stadt), bei Bygdø Seebad (ca. 6 km W. von der Stadt, von letzterer durch Bygdø getrennt) und im Frognerkilen u. a. a. O. untersucht haben. Ein einziges Mal, am 29. April 1900, sind wir auch so weit wie bei Drøbak (ca. 35 km) gewesen.

Auf diesen Ausflügen, die mit den verschiedenen Untersuchungsstationen auf der Karte II abgesetzt sind, schöpften wir stets Wasserproben an verschiedenen Punkten des Weges. Gewöhnlich wurden sie allein der Oberfläche des Wassers entnommen; zum Teil wurden sie aber auch aus verschiedenen Tiefen heraufgeholt, wozu die im vorigen Abschnitte beschriebenen Flaschen mit Kautschukpfropfen, die vorher sterilisiert waren, benutzt wurden.

Diese Flaschen bleiben zwar offen von dem Augenblicke an, da der Pfropfen herausgezogen ist; wenn sie sich aber in der betreffenden Tiefe gefüllt haben, was sich dadurch zu erkennen gibt, daß keine Luftblasen mehr durchs Wasser aufsteigen, riskiert man indessen nicht, daß der Inhalt während des Heraufholens mit den mehr oberflächlichen Wasserschichten des Fjordes verunreinigt wird, indem das Wasser unter einem desto größeren Drucke steht, je tiefer man kommt, und daher auch der Inhalt der Flaschen unter einem größeren Drucke steht als die Wasserschichten, durch welche sie aufgeholt werden.

Bevor wir die Ergebnisse dieser Untersuchungen besprechen, muß zuerst abgemacht werden, wie viele Bakterien gewöhnlich im reinen Meerwasser pro Kubikcentimeter vorkommen. Der einschlägigen Litteratur entlehnen wir, daß Fischer in 74% von 121 Untersuchungen an der Oberfläche des Atlantischen Meeres weniger als 250, in 21% mehr wie 500 und im ganzen 5% mehr wie 1000 per Kubikcentimeter fand (vgl.

1) Diese Route ist als »Hauptroute« auf Karte II mit einer roten Linie aufgezogen; die Stationen sind mit römischen Zahlen bezeichnet.

die früher citierte Arbeit in »Zeitschrift für Hygiene«, Bd. 23, S. 57). Um zu untersuchen, ob dieselben Verhältnisse in dem innern Teil des Christianiafjords wiedergefunden werden und dadurch eine Norm dafür zu gewinnen, welcher Gehalt, als auf eine Verunreinigung desselben deutend, angenommen werden mufs, hat der Eine von uns — Schmidt-Nielsen — entsprechende Untersuchungen mitten in Drøbaksund vorgenommen; die Resultate derselben sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Aus dieser ist ersichtlich, dafs der Keimgehalt der Fjordoberfläche bei keiner der 15 Untersuchungen 62 per Kubikcentimeter überstieg; und wenn die Zahlen in der Tiefe — wie dies auch von Anderen beobachtet worden ist — etwas höher gefunden wurden, und der Gehalt hier sogar ein einziges Mal (in 10 m Tiefe) 10 000 erreichte, war es doch trotz zahlreicher Beobachtungen eine reine Ausnahme, dafs die Zahl 240 überschritten wurde. (Aufser den erwähnten 10 000 wurden nur einmal 540 und einmal 900 — in beiden Fällen in 15 m Tiefe — und schliesslich einmal 420 [25 m] gefunden).

Tabelle VIII.

Keimgehalt des Meerwassers per cem in Drøbaksund; Sommer 1900.

Datum	Tiefe in m						
	0	2	3	5	10	15	25
14. Juli 1900	—	54	—	—	45	—	225
19. „ „	10	56	—	—	10 000	—	116
23. „ „	16	113	—	50	172	—	88
24. „ „	24	42	—	60	26	—	110
28. „ „	28	—	31	16	76	—	26
30. „ „	8	—	—	72	187	—	239
4. August „	14	—	—	104	157	—	—
7. „ „	62	—	78	50	48	57	64
10. „ „	60	—	91	100	91	540 ¹⁾	—
18. „ „	6	—	16	—	105	68	233
25. „ „	32	—	—	—	—	—	—
30. „ „	32	—	56	34	—	34	135
31. „ „	20	—	148	130	112	—	163
8. September „	39	—	51	86	104	900	72
22. „ „	47	—	87	96	62	—	420

1) Genau 17 m.

Wir können diese Untersuchungen mit anderen Daten vervollständigen, indem Schmidt-Nielsen¹⁾ im Monat August 1898 an der Meeresoberfläche bei Jäderen (West-Norwegen) 20 bis 30 und im September desselben Jahres bei Frederiksvärn (südliches Ende des Christianiafjords) 20—30—90 Keime per Kubikcentimeter fand; im Oktober ds. Js. fand er an der Mündung des Langesundfjords (südlich vom Christianiafjord) an der Meeresoberfläche 20—30 per Kubikcentimeter. Ferner fand er in demselben Herbst im Dröbaksund mehrmals ca. 50 per Kubikcentimeter, während dagegen der Gehalt bei Dröbak im Herbst 1899 zum Teil etwas höher war, indem am 20. Oktober 361 und am 21. dess. Monats 168 per Kubikcentimeter (am 20. November und 17. Dezember dess. Js. bzw. 39 und 88) gefunden wurden: und am 1. Sept. 1900 wurden an derselben Stelle bzw. 345, 130 und 63 Keime gezählt. Mit Rücksicht auf diese letzteren Untersuchungen muß jedoch hervorgehoben werden, daß sie in der nächsten Nähe der Stadt Dröbak vorgenommen wurden, wo nicht unwahrscheinlich das Wasser mittels des Wellenschlages, durch Abfallstoffe, von der Stadt herrührend, verunreinigt sein kann. (Die in Tabelle 8 referierten, wie die sonst besprochenen Wasserproben wurden stets per Boot mitten im Sunde entnommen.) Schliesslich sei hinzugefügt, daß Schmidt-Nielsen an einem Tage im Oktober 1900 an der Biologischen Station von Drontheim 400 Keime per Kubikcentimeter an der Oberfläche des Meeres fand, während die entsprechenden Zahlen in 3, 4, 10, 15 und 25 m Tiefe bzw. 93, 96, 50, 161 und 20 m waren (am Tage vorher waren heftige Regengüsse eingetreten).

Diese Zahlen stimmen insofern mit den von Fischer und Anderen gefundenen, als sie zeigen, daß ein einmaliger Nachweis eines hohen Keimgehaltes im Meerwasser nicht für eine Verunreinigung desselben zu sprechen braucht. Anders dagegen, wenn ein verhältnismäßig hoher Bakteriengehalt sich durch wiederholte Untersuchungen während längerer Zeit nachweisen läßt; etwas Derartiges kommt nicht vor, wenn das Wasser rein ist, sondern nur, wenn etwas Abnormes, d. i. wenn eine Ver-

1) Vergl. Schmidt-Nielsen, Biologisches Centralblatt, 1901, Nr. 3.

unreinigung dem Wasser zugeführt worden ist; und eine solche kann man sich im Hafen Christianias nur durch Sielinhalt und ähnliche Stoffe entstanden denken. Vor allem wird dies der Fall sein müssen, wenn eine Verunreinigung des Hafenwassers mit Bakterien nachweisbar, um so mehr abnimmt, je mehr man sich von den Mündungen der Siele entfernt.

Wenn man nun fragt, welche Erhöhung des Keimgehaltes man als Ausdruck einer Verunreinigung betrachten soll, hat Fischer in der citierten Arbeit auf Grundlage eigener und Anderer Untersuchungen den Satz aufgestellt, »dafs das nicht verunreinigte Meerwasser an der Oberfläche in der Regel weniger als 500 Keime im Kubikcentimeter enthält, und dafs eine gröfsere Bakterienzahl den Verdacht einer stattgehabten Verunreinigung nahelegt, und zwar um so mehr, je höher sich der Keimgehalt erweist« (a. a. O. S. 59).

Auf unsere erwähnten Untersuchungen gestützt, müssen wir davon ausgehen, dafs diese Zahl, was den inneren Teil des Christianiafjords betrifft, zu hoch ist, indem hier **höchstens** schon ein Keimgehalt von mehr als **250 per Kubikcentimeter** auf eine Verunreinigung sowohl der oberflächlichen Wasserschichten als bis zu 25 m Tiefe herab deuten wird; d. h. unter der Voraussetzung, dafs ein solcher Gehalt sich nicht blofs ein einziges Mal, sondern mittels wiederholter Untersuchungen nachweisen läfst. Wie wir unten sehen werden, spielt doch dieser Unterschied von der Fischer'schen Norm für die Beurteilung der Verunreinigung des Hafens keine Rolle, aufser wo es gilt, einen Einblick darin zu gewinnen, wie sich die tieferen Wasserschichten verhalten.

Um nach dieser Einleitung zu unseren bakteriologischen Analysen des Hafenwassers überzugehen, fangen wir mit dem **Keimgehalte der Oberfläche** desselben an, indem eine Verunreinigung dieser, wie mehrmals früher berührt, in den Hafenstädten sich immer ungleich gröfser zeigt als in verhältnismäfsig geringer Tiefe unter der Oberfläche. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle 9 wiedergegeben; diese ist der Übersicht wegen in

zwei Abschnitte geteilt, von denen der erste die Untersuchungsstationen unserer früher erwähnten Hauptroute umfaßt — von dem Bisletsiele des Piperviksquai (westlicher Hafen) durch die »westliche Einfahrt« des Hafens hinaus nach Näsodden und zum Ausgangspunkte durch die »östliche Einfahrt« über Björviken (östlicher Hafen) zurück. Hierzu kommt als ein zweiter Abschnitt die Untersuchungen an verschiedenen »Nebenstationen«, die teils an die westliche, teils an die östliche Einfahrt stossen, teils im Bundefjorde gelegen sind. (Wenn Kongshavn unter den »Nebenstationen« aufgeführt ist, ist dies insofern fehlerhaft, als wir hier ebenso viele und mehr Untersuchungen als an manchen Stationen der »Hauptroute« vorgenommen haben. Wie die Tabelle geordnet ist, ist sie indessen mit den auf der Karte abgesetzten Stationen übereinstimmend.)

(Tabelle IX siehe Tafel IV.)

Aus der Tabelle geht hervor, daß der untersuchte Zeitraum sich in drei Perioden teilen läßt, von denen die erste den Frühling und Frühsommer 1900, die dritte den entsprechenden Zeitraum 1901, und die zweite Periode die Zeit zwischen den zwei vorigen umfaßt.

In der ersten Periode, d. h. im Frühling und Frühsommer — vom Anfang April bis Anfang Juni 1900 gerechnet — wird man sehen, daß der Keimgehalt der oberflächlichen Wasserschicht, sowohl der westlichen wie der östlichen Einfahrt, durchgehends schon in verhältnismäßig kurzer Entfernung von der Stadt niedrig oder mäßig gewesen ist. Zwischen Kavringen und Herbern (d. h. in einer Entfernung von ca. 1,5 km von der Mündung des Bisletsieles in Piperviken) wurde es z. B. bei 2 von 8, beim Leuchtturm Dyna (ca. 3 km vom selben Siele) bei 3 von 6 und zwischen Dyna und Näsodden (ca. 4,7 km) bei 4 von 6 Untersuchungen niedriger als die aufgestellte Norm für »reines« Meerwasser, d. h. 250 per Kubikcentimeter gefunden. Beim Leuchtturm Hägholmen (ca. 3 km von der Mündung Akerselvens) zeigte sich sogar in 4 von 5 Beobachtungen der Gehalt unter dieser

Norm und was Näsodden und die Strecke zwischen diesem Punkte und Snarøen betrifft (ca. 6,5 km), war dasselbe der Fall in 3 von 4 Untersuchungen, während in der vierten der Gehalt 400 war (Näsodden). Kommt nun hierzu, daß die Zahlen der gesamten Untersuchungsstationen in einer Reihe der übrigen Beobachtungen nur in verhältnismäßig geringem Grade die erwähnten 250 Keime per Kubikcentimeter überschreiten, gibt es einen augenfälligen Unterschied zwischen diesem Zeitraum und dem zweiten.

Periode von Ende Juni 1900 bis ca. Mitte März 1901. Wir finden hier durchgehends auf allen Stationen der westlichen und östlichen Einfahrt weit höhere Zahlen als im vorigen Zeitraum. Zwar können wir kein Gewicht darauf legen, daß im April—Juni 1900 außerhalb des Bisletsieles in Piperviken durchschnittlich allein etwas mehr wie 200,000 Keime per Kubikcentimeter gefunden wurden, während die entsprechenden Zahlen für die hier zu besprechende Periode zwischen ca. $1\frac{1}{3}$ und $19\frac{1}{2}$ Millionen schwankten; bei den wenigen Untersuchungen, die an diesem Orte im April—Juni ausgeführt wurden, gaben wir nämlich nicht darauf acht, die Wasserproben unmittelbar vor der Mündung des Sieles zu entnehmen. Auch wollen wir nicht in Betracht der verhältnismäßig wenigen Beobachtungen bei Kavringen (1,2 km vom genannten Siele entfernt) zu viel Gewicht darauf legen, daß der Keimgehalt daselbst während der vorigen Periode nur bis zu 5050 emporstieg, während er mit einer einzigen Ausnahme (8500) vom Juli an zwischen ca. 28 000 und 81 000 schwankte. Dagegen muß hervorgehoben werden, daß der Gehalt zwischen Kavringen und Herbern (2,5 km vom Bisletsiele entfernt), wo er in der vorigen Periode zum Teil niedriger als die Norm für »reines« Meerwasser gefunden wurde und sonst als Maximum 2054 betrug, in dieser Periode bei 6 von 18 Beobachtungen zwischen 1050 und 8500, in 4 Beobachtungen zwischen ca. 12 000 und 17 000 und bei den übrigen 8 Untersuchungen zwischen 29 500 und ca. 100 000 per Kubikcentimeter schwankte. Ähnliche Verhältnisse zeigen auch die übrigen Untersuchungsstationen der »westlichen« und »östlichen Einfahrt«:

u. a. erhellt aus der Tabelle, daß in diesem Zeitraume zwischen Dyna und Näsodden, wie auch bei Hågholmen nur bei einer einzigen von bezw. 17 und 18 Untersuchungen ein Keimgehalt, welcher der Norm für »reines Wasser« entsprach, gefunden wurde, während sonst zwischen einigen Tausenden bis 80 000 Bakterien per Kubikcentimeter zugegen waren. Ebenfalls ist zu bemerken, daß der Keimgehalt zwischen Näsodden und Snarøen bei 9 von 10 und bei Näsodden bei 7 von 13 Untersuchungen noch auf eine, wenn auch meistens mäßige oder verschwindende Verunreinigung mit Sielwasser deutet. (Diese Punkte sind beide ca. 6—6,5 km von der Stadt entfernt.)

Es läßt sich aber auch ein Unterschied zwischen den zwei Perioden an anderen Stellen des untersuchten Bereiches nachweisen. Man findet z. B. in der Tabelle durchgehends die Untersuchungsstationen Kongshavn Bad und zwischen Sjursøen (weiter südlich) und dem Festlande mit weit niedrigeren Zahlen während des ersten als während des zweiten der hier besprochenen Zeiträume aufgeführt; und was Grønlien (etwas nördlich von Kongshavn) betrifft, zeigt auch diese Station in der zweiten Periode durchwegs hohe Zahlen (bis ca. 220 000), die jedoch, da an diesem Orte in der ersten Periode nur eine einzige Untersuchung ausgeführt ist, keinen direkten Vergleich mit der letzteren erlauben. Bevor wir weiter gehen, sei noch erwähnt, wie weit die Verunreinigung bisweilen zur Sommerzeit den Bundefjord hinaus nachgewiesen werden kann. Aus der Tabelle 9 wird man sehen, daß bei Malmökälven Seebad (ca. 4,5 km von der Stadt) ein einziges Mal, den 20. Juni, 42 000 Keime per Kubikcentimeter nachgewiesen wurden, ein Verhalten, das neben den übrigen hohen Zahlen, die an diesem Tage gefunden wurden (21 500 bei Bydø Seebad, Nordwestseite Bygdøs — ca. 63 000 zwischen Bygdø und Brandskjärene, mitten in der Einfahrt des Frognerkilen — ca. 36 000 bei Kavringen), dazu berechtigt, den 20. Juni zur zweiten Periode zu rechnen, wenn auch sonst eben an diesem Tage nur wenige Beobachtungen vorgenommen wurden. Aber auch sonst wird man aus der Tabelle sehen, daß zur Sommerzeit mehrmals im Bundefjorde eine, zwar in diesen Fällen

sehr oder relativ mäßige Verunreinigung in beträchtlichen Entfernungen von der Stadt beobachtet worden ist (vgl. die Zahlen des 22. August), wie man auch in diesem Teil des Fjords den genannten Unterschied zwischen den zwei Perioden beobachten kann (vgl. den Sund zwischen Rambergö und Langö, Tabelle 9). Überhaupt ist aus der Tabelle ersichtlich, daß der Keimgehalt während des hier besprochenen Zeitraumes in der Nähe der Stadt sehr oft so groß gewesen ist, daß die Verunreinigung als sehr bedeutend bezeichnet werden muß — eine Anschauung, deren Richtigkeit vor allem einleuchten wird, wenn man auf die vielen hohen Zahlen bei Kongshavn und Grönlien mit den daselbst befindlichen städtischen Badeanstalten Rücksicht nimmt. Diese Zahlen entsprechen auch denjenigen bei Kavringen, wo man vor einiger Zeit eine Badeanstalt anlegen wollte, weil das Wasser daselbst als speciell rein vorausgesetzt wurde; hierzu fügen wir noch, daß wir bei den Badeanstalten »Sölyst« und »Svømmeflaaten«, die am Fusse der Festung Akershus zwischen dem westlichen und östlichen Hafen gelegen sind, im vorigen Sommer zwischen 20 000 und 48 000 Keime per Kubikcentimeter gefunden haben.

Gehen wir nun zum dritten Zeitraum über, so entspricht er dem Frühling und Frühsommer 1900, in dem er mit dem 22. März 1901 anfang und noch andauerte, als unsere letzte Untersuchung am 15. Mai d. J., ausgeführt wurde. Aus der Tabelle geht hervor, daß die Zahlen in diesem Zeitraum sich durchschnittlich bedeutend niedriger als in der Periode Juni 1900 bis 12. März 1901 gehalten haben. Wir verweisen insofern auf die Untersuchungen bei Kavringen mit einem Keimgehalte zwischen 1450 und 8450 gegen 8500—28 500 und 75 500 in der vorigen Periode; ferner vergleiche man die Zahlen bei Dyna, wo der Gehalt zwischen 1500 und 6250 gegen 2265—10 600—19 500—38 800—114 500 in der vorigen Periode schwankte; wir verweisen ferner auf die Resultate bei Hågholmen, wo der Keimgehalt in der vorigen Periode zwar einmal nur 60 war, sonst aber zwischen 2550—7900—11 150—38 750—79 500 schwankte,

während er in dem hier besprochenen Zeitraum nur 330—8300 betrug.

Insofern haben sich also die Verhältnisse denjenigen genähert, die zur selben Jahreszeit im Jahre 1900 vorhanden waren; doch sind sie mit letzteren keineswegs identisch gewesen, indem wir in diesem Frühlinge erst (bei 5 von 7 Beobachtungen) bei Näsodden (d. h. 6 km von der Stadt) einen Keimgehalt gefunden haben, der nicht die aufgestellte Norm für »reines Meerwasser« überschreitet; dies war aber im vorigen Frühjahr schon in einer größeren Nähe der Stadt häufig der Fall, wie der Keimgehalt sich damals auch sonst durchgehends viel niedriger hielt.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß auch der Keimgehalt der Oberfläche des Hafenwassers in einer wesentlichen Beziehung den Verhältnissen entspricht, die man zufolge der früheren Abschnitte dieser Darstellung erwarten sollte. Denn wenn der Keimgehalt eben im Frühjahr und Frühsommer am niedrigsten ist, entspricht dies der Jahreszeit, wo ein Steigen des Salzgehaltes darauf deutet, daß die oberflächlichen, mit Süßwasser und daher auch mit Sielinhalt am meisten beigemengten Wasserschichten in der größten Ausdehnung den Fjord hinaus getrieben sind. Und umgekehrt: wenn der Keimgehalt im Sommer sehr hoch ist, entspricht dies eben der Jahreszeit, da eine Abnahme des Salzgehaltes eine Aufstauung derselben Wasserschichten im Hafen zu erkennen gibt. Hierzu ist zwar zu bemerken, daß der Keimgehalt in diesem Frühjahr (1901) erst am 22. März abzunehmen anfing, während die Kulmination des Salzgehaltes schon am 12. desselben Monats eingetreten war (vergl. Tabelle 6, 5 m Tiefe); an letzterem Tage wurde aber der Keimgehalt besonders hoch gefunden. Doch darf dies nicht Wunder nehmen; denn, wie früher erwähnt, war gerade vorher ein Tauwetter eingetreten, welches dem Hafen von den Strafsen der Stadt u. a. eine überaus große Verunreinigung zugeführt haben muß; dies Verhalten kann auch den geringen Salzgehalt, den wir eben am 12. März an der Oberfläche fanden, erklären.

Demnächst war uns auffällig, daß der Keimgehalt in diesem Frühjahr, wie schon oben erwähnt, obschon verhältnismäßig niedrig, doch erheblich höher als zur selben Zeit des Jahres 1900 gewesen ist. Auch dies ist indessen verständlich, indem die Temperatur der Monate April und Mai 1901 in Christiania viel höher war und in viel größerem Umfange von südlichen Winden begleitet wurde als die entsprechenden Monate des Jahres 1900.

Hiermit stimmt ja auch überein, daß der Salzgehalt im Laufe von April und Mai 1901 niedriger wie in den entsprechenden Monaten 1900 gefunden wurde. Was wir dagegen besonders hervorheben wollen, ist die Thatsache, daß der Keimgehalt vom 29. Oktober 1900 bis zum 11. Januar 1901 trotz der Zunahme des Salzgehaltes (vergl. Tabelle 6) ebenso hoch war, als wir im Laufe der Sommermonate beobachteten. Diese beträchtliche Verunreinigung der oberflächlichsten Schichte des Hafenwassers am Ende des vorigen und Anfang dieses Jahres haben wir noch nicht in befriedigender Weise erklären können.

Bevor wir weitergehen, wollen wir von dem Einflusse des **Windes** (sowohl Richtung, als Dauer und Stärke) auf den Keimgehalt noch folgendes bemerken: Wir haben am 29. April 1900 feststellen können, daß ein Nordwind von kurzer Dauer eine augenfällige Wirkung auf den Keimgehalt ausgeübt hat. An diesem Tage machten wir einen Ausflug bis nach Dröbak. Auf der Hinreise, am Vormittage, wehte wie am Tage zuvor ein frischer Südwind; wir fanden dann zwischen Kavringen und Herbern 2054, zwischen den Nordenden von Hovedøen und Bleghøen 2880 und bei Hægholmen 564 Bakterien per Kubikcentimeter. Als wir indessen am Abend um 6—7 Uhr die Untersuchung an denselben Stellen wiederholten, hatten wir in einigen Stunden eine frische Brise von N. gehabt und fanden nun an denselben Stellen allein bezw. 199, 499 und 139 Keime per Kubikcentimeter (Tabelle 9).¹⁾ Daß dies darauf beruhte, daß die oberflächlichen, süßeren und somit mehr verunreinigten Wasserschichten den Fjord hinausgejagt waren, ergibt sich daraus, daß

1) Vergl. auch, daß der Keimgehalt zwischen Herbern und Kavringen in 3 m Tiefe am Vormittage 1392, am Nachmittage aber nur 425 war (Tab. X).

zu gleicher Zeit der Salzgehalt in 10 m Tiefe von 27,98 zu 31,69 ‰ gestiegen war, d. h. die oberflächlichen Schichten von weniger salzhaltigem Wasser hatten an Tiefe abgenommen. Es darf ferner erwähnt werden, daß auch am 4. April und 14. Mai 1900, als der Keimgehalt ebenfalls niedrig gefunden wurde, ein frischer Nordostwind wehte, und daß dasselbe auch ein paar Tage der Fall gewesen war, bevor die merkbare Abnahme des Keimgehaltes am 10. Mai 1901 bei Hågholmen, zwischen Hågholmen und Näsodden und zwischen Näsodden und Dyna beobachtet wurde; diese Brise hatte einige Stunden vor der Untersuchung am 8. Mai angefangen. Bei letzterer Untersuchung war der Bakteriengehalt dagegen höher; schon dies zeigt also, daß ein kurzdauernder Nordwind keineswegs immer einen größeren Einfluß auf den Keimgehalt ausübt, — eine Erscheinung, die wir auch sonst, u. a. während der Sommermonate, öfters nachzuweisen Gelegenheit gehabt haben. Indessen müssen wir zugeben, daß wir niemals bei sehr starkem Winde dieser Art untersucht haben.

Was sonst zu den Schwankungen des Keimgehaltes, die nach Tab. 9 zu allen Zeiten des Jahres beobachtet worden sind, beigetragen haben kann, darüber können wir uns zur Zeit nicht mit Bestimmtheit aussprechen. Vielleicht kommt hier auch die Höhe der Wellen in Betracht. Dieser Faktor war bei den Untersuchungen, die Cassedebat 1894 im Hafen von Oran in Alger ausführte, sehr augenfällig, wie er auch später von Fischer als Erklärung der Schwankungen des Keimgehaltes des Kieler Hafens hervorgehoben worden ist. Die Bedeutung der Wellenhöhe ist darin zu suchen, daß die oberflächlichen und am meisten verunreinigten Wasserschichten mit den tieferen und weniger verunreinigten um so mehr gemischt werden, je höher die Wellen sind.

Unsererseits haben wir nur einmal eine besonders merkbare Wirkung dieser Art beobachtet, nämlich am 19. Juli 1900, den einzigen Tag im Hochsommer, als wir »reines Wasser« so weit nach der Stadt zu als bei Hågholmen und zwischen Dyna und Näsodden gefunden haben; an diesem Tage gingen die Wellen sehr hoch, — höher als wir sie bei unseren Untersuchungen sonst gehabt haben. Auch sonst haben wir hin und wieder geglaubt, einen etwas höheren oder niedrigeren Keimgehalt damit in Verbindung setzen zu können, daß die Oberfläche des Fjords ruhig war oder nicht, ohne daß wir indessen die Wirkung besonders hervortretend gefunden haben. — Schliesslich sei noch erwähnt, daß der verhältnismäßig hohe Keimgehalt, der auch während des Herbstes und Winters gefunden wurde, die Einwendung widerlegt, daß der große Keimgehalt der Sommermonate

nur darauf beruht, daß die hohe Temperatur eine Vermehrung der Bakterien nach Entleerung des Sielinhalts in den Hafen begünstigt. Eine solche Anschauung wird übrigens auch dadurch widerlegt, daß auch die im Seewasser ursprünglich enthaltenen Keime keine Neigung zeigen, sich während des Sommers im Fjorde zu vermehren; vergl. z. B. die niedrigen Zahlen, die wir zu dieser Jahreszeit immer bei Dröbak fanden und öfters im Wasser des Bundefjords nachgewiesen haben.

Bevor wir diesen Abschnitt verlassen, muß noch kurz die Verunreinigung der **tiefereu Wasserschichten** erwähnt werden. Wie mehrmals hervorgehoben, werden diese bei den entsprechenden Untersuchungen anderer Hafenstädte erheblich weniger verunreinigt als die Oberflächenschicht gefunden. Daß dies sich auch bezüglich des Hafens von Christiania wiederholt, geht aus der Tab. 10 S. 216 u. 217 hervor. Diese enthält nur Untersuchungen, die zwischen Herbern und Kavringen ausgeführt wurden; an anderen Punkten haben wir dagegen nur ausnahmsweise Beobachtungen dieser Art vorgenommen¹⁾. Was diese Tabelle betrifft, genüge es, unter Berücksichtigung der entsprechenden Untersuchungen bei Dröbak, darauf aufmerksam zu machen, daß häufig, und besonders während der Sommermonate, in 5 m Tiefe eine mäßige, wenn auch deutliche Verunreinigung nachgewiesen ist. Eine größere Abnahme war in 10—20 m Tiefe zu spüren; im Gegensatz zur Keimzahl der Oberflächenschicht wurde der Keimgehalt in dieser Tiefe schon Anfang November bzw. am Ende des Jahres auffallend kleiner gefunden als während des Sommers. (Zwar überschritt der Gehalt auch im Sommer nur in geringem Grade die 250 Keime pro Kubikcentimeter, die wir als Norm für »reines« Seewasser aufgestellt haben.)

Wie die Bakterien diesen tieferen Schichten zugeführt werden — ob sie z. B. nur durch eine »Sedimentierung« von der keimreicheren Oberfläche heruntergesunken sind —, das müssen wir unentschieden lassen.

1) Von diesen erwähnen wir ein Paar, die in Übereinstimmung mit den Beobachtungen Anderer zeigen, wie stark der Keimgehalt schon unmittelbar vor den Sielermündungen in geringer Tiefe unterhalb der Oberfläche abnimmt. Vor den Sielermündungen in Thingvallaquais und in Filipstad (beide im westlichen Hafen) wurden am 18. April 1900 an der Wasseroberfläche 1 212 000 bzw. 930 000 Keime pro Kubikcentimeter gefunden; aber schon in 2 m bzw. 0,9 m Tiefe hatte der Gehalt auf 6000 und 60 000 per Kubikcentimeter abgenommen.

Tabelle X.
Kehlgchalt und Temperatur des Wassers.

Station	9. IV. 1900	18. IV.	23. IV.	29. IV. Vorm.	29. IV. Nachmittag	14. V.	2. VI.	3. VII.	19. VII.	9. VIII.	18. VIII.	22. VIII.	28. VIII.	30. VIII.	31. VIII.	8. IX. Vorm.	4. IX. Vorm.
0 m	1800	1765	1 100	2 054	199	50	565	65 000	8500	44 000	86 250	12 500	3 750	16 500	3 960	1 700	30 000
1 m	—	—	2 000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 m	—	—	1 700	1 312	425	67	—	—	—	—	3 450	15 400	3 450	5 100	—	—	—
5 m	1650	—	1 800	—	356	48	—	—	6500	—	5 100	7 035	750	900	940	2 885	2 885
10 m	—	870	80	37	36	58	—	—	—	—	3 123	1 410	690	630	1 145	435	785
15 m	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3 123	14,9° C.	13,6° C.	13° C.	14,8° C.	14,6° C.	14,9° C.
20 m	—	—	—	—	—	223	—	—	—	—	1 270	1 710	—	420	1 360	1 985	585
24 bis 25 m	—	—	—	—	91	—	—	—	—	—	—	7,6° C.	—	9° C.	9,45° C.	1 935	9,5° C.
					5,6° C.												

Mitten zwischen Herbern und Kavringen

Fortsetzung zu Tabelle X.

Tiefe in m	5. IX.		6. IX.		7. IX.		29. X.		1. XI.		18. XII.		28. XII.		11. I.		12. III.		22. III.		16. IV.		2. V.		8. V.		10. V.		11. V.		15. V.						
	Nachm.	Nachm.	Nachm.	Nachm.	Nachm.	mittag	Urzeitl.	3 000	14 000	2 300	2 800	0,20° C.	16 750	101 000	25 500	8 200	12 750	6 000	1 000	2 500	1 350	1900	14,8° C.	14,4° C.	7,20° C.	6,90° C.	2,30° C.	2,80° C.	0,20° C.	1,50° C.	0,80° C.	3,50° C.	11,80° C.	9,40° C.	7,50° C.	9,60° C.	11,05° C.
0 m	46 000	81 400	29 500	14,4° C.	7,20° C.	3 200	3 000	14 000	2 300	2 800	0,20° C.	16 750	101 000	25 500	8 200	12 750	6 000	1 000	2 500	1 350	1900	14,8° C.	14,4° C.	7,20° C.	6,90° C.	2,30° C.	2,80° C.	0,20° C.	1,50° C.	0,80° C.	3,50° C.	11,80° C.	9,40° C.	7,50° C.	9,60° C.	11,05° C.	
1 m	—	—	—	—	—	3 200	3 050	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 m	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5 m	4 940	2 200	3 200	16,35° C.	15,75° C.	555	200	1 000	2 050	950	375	290	1 660	930	1 120	490	730	490	730	715	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 m	420	545	360	12,95° C.	12,30° C.	480	215	290	220	255	340	70	185	160	730	330	1 010	305	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15 m	1 160	845	120	10,70° C.	10,30° C.	—	—	1 900	185	210	175	60	220	205	650	285	170	145	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20 m	340	1 120	560	8,90° C.	8,50° C.	—	255	895	95	185	265	85	105	365	1 350	120	175	125	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
24 bis 25 m	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Mitten zwischen Herbern und Kavringen.

Schluss.

Aus den voranstehenden Untersuchungen ziehen wir den Schluss, daß die Verunreinigung, die das Sielwasser Christianias dem Akerselv und Hafen zuführt, bedeutend ist, und daß die Bedingungen einer »Selbstreinigung« des Flufs- wie des Hafenwassers im ganzen sehr wenig günstig sind.

Insofern nämlich die Selbstreinigung in einer Sedimentierung der Schwebestoffe besteht, findet dieselbe im wesentlichen schon im Flusse oder im inneren Hafenabschnitte statt; hierdurch entstehen mitten in der Stadt und in den nächsten Umgebungen derselben ausgedehnte Fäulnisprozesse, die einen lästigen Gestank hervorrufen.

Insofern ferner die Selbstreinigung durch eine Verdünnung der gelösten Stoffe und Bakterien des Sielwassers geschieht, ist diese Verdünnung in Akerselven ganz ungenügend; und wenn man vom Frühling und Frühsommer absieht, findet dieselbe wegen der natürlichen hydrographischen Verhältnisse als Regel auch nicht im Hafenwasser in besonderer Ausdehnung statt.

Über Buttersäuregärung.

(II. Abhandlung.)

Von

Dr. **R. Grafsberger** und Dr. **A. Schattenfroh**.

A. Zur Morphologie des beweglichen Buttersäurebacillus.

Von Dr. **R. Grafsberger**,
Assistent am Institute.

(Mit Tafel V—VIII.)

Die große Verbreitung der zuckervergärenden anaeroben Buttersäurebacillen in der Natur, die umfangreichen Zersetzungen und deren charakteristische Produkte, sowie gewisse höchst auffällige Veränderungen der Bakterienzellen während des Ablaufes der Versporung ließen von vornherein das Auffinden und Bestimmen von anaeroben Buttersäurebacillen nicht allzuschwierig erscheinen. Doch hat sich im Laufe der letzten Jahre herausgestellt, daß einmal die Zersetzungen der zuckerhaltigen Nährmedien durch Buttersäurebacillen auch bei Vorhandensein der gleichen Art durchaus nicht immer gleichartig, und keineswegs im Sinne einer im voraus bestimmten Gleichung ablaufen, — daß ferner die an der Buttersäuregärung der Kohlehydrate beteiligte Bakterienflora anscheinend aus einer, wenn auch kleinen, Zahl von verschiedenen, wohlcharakterisierten Arten besteht. Die Schwierigkeiten der Sichtung dieser Bakterienflora werden aber nicht unbedeutend durch den Umstand vermehrt, daß infolge weitgehender Vielgestaltigkeit der Formen und der kulturellen Erscheinungen einer und derselben Art, — wie sie gerade bei den Buttersäurebacillen angetroffen wird, — die Gefahr sehr nahe

liegt, natürlich Verwandtes zu trennen und dort mehrere Arten aufzustellen, wo es sich in der That nur um verschiedene Erscheinungsformen handelt.

Daraus erhellt bereits, dafs nur auf Grund eines reichhaltigen Materials von Untersuchungen, welche sich sowohl auf die kulturell morphologischen als auch auf die chemisch-biologischen Eigenschaften der Buttersäurebacillen beziehen, eine erfolgreiche Sichtung dieser Bakterienarten angebahnt werden kann.

Schattenfroh und ich haben in unserer ersten ausführlichen Abhandlung (s. d. Archiv Bd. 37) unter dem Namen *granulobacillus saccharob. immob. liquefaciens* (unbeweglicher Buttersäurebacillus) eine sehr weitverbreitete anaërobe Bakterienart beschrieben, deren Stellung im System der Bakterien erst durch eingehende Studien erschlossen werden konnte.

An diese Bakterienart reiht sich ein anderes, lange bekanntes Stäbchen an, das von Gruber im Jahre 1887 zuerst in Reinkultur gezüchtet und beschrieben und später insbesondere von Bejerinck, dann von v. Klecki u. A. studiert wurde. Gruber hat diese Art »Amylobakter«, Bejerinck »Granulobakter *saccharobutyricum*«, v. Klecki »*Bacillus saccharobutyricus*« genannt.

Die vorliegende Arbeit soll nun die Resultate einer vergleichenden Untersuchung wiedergeben, welche mit den Stämmen dieser Autoren, sowie mit einer gröfseren Anzahl von Buttersäurebacillen angestellt wurden, die von Schattenfroh und mir aus verschiedenen Materialien gezüchtet und im Verlaufe der Prüfung als einer Art angehörig erkannt wurden. Und zwar soll es speciell meine Aufgabe sein, die kulturellen Erscheinungen zu schildern, welche dieser Bakterienart zukommen, sowie die morphologischen Bilder genauer zu beschreiben, welche bei dem Studium dieser ungemein pleomorphen Bakterienart zur Beobachtung kommen. Ich will zu diesem Zwecke mit der Schilderung der Kulturen auf den üblichen zuckerhaltigen Nährböden beginnen und erst an diese die mikroskopischen Befunde anschliessen, unter welchen der Darstellung des Versporungsvorganges ein breiterer Raum gewidmet werden soll.

Verhalten auf Gelatine.

Auf gewöhnlicher Nährgelatine ohne Zuckergehalt ist der bewegliche Buttersäurebacillus des Typus »Amylobakter« nicht zum Wachstum zu bringen. Gelatine mit Trauben- oder Rohrzucker bildet hingegen für denselben einen ausgezeichneten Nährboden, der insbesondere mit Vorteil zur sicheren Erzeugung von Sporen (s. w. u.) verwendet werden kann, wie dies bereits von Gruber hervorgehoben worden ist. Das Verhalten des beweglichen Buttersäurebacillus in Zuckergelatine ist insofern ein bemerkenswertes, als auf diesem Nährboden je nach besonderen Umständen ein sehr verschiedenes Aussehen der Vegetation zu beobachten ist.

Dieselbe kommt sowohl im Zuckergelatinestich als auch in Zuckergelatineplatten in dreierlei Typen zur Entwicklung. Bei einer Temperatur von 18—23° C. beobachtet man in hochgeschichteter Zuckergelatine oder in der im Buchnerrohr gehaltenen Eprouvette (sorgfältiges Auskochen bzw. Evacuieren der Gelatine hat stets unmittelbar vor der Impfung zu geschehen) nach 24 bis 48 Stunden das Auftreten von kugeligen oder knopfförmigen, längs des Stichkanals aneinandergereihten kompakten Vegetationen, die im weiteren Verlaufe etwas an Größe zunehmen; bald aber sistiert das Wachstum, die Vegetation kommt zum Abschluss, und es zeigt dann eine solche Kultur den Anblick eines aus knolligen oder scheibenförmigen Massen zusammengesetzten Stichfadens.

In manchen Fällen bilden sich nun als Übergang zum Typus 2, von dieser centralen Vegetation aus vereinzelt stachelige oder fadenförmige Ausstrahlungen. Kommt es im Verlaufe des Wachstums oder von vornherein sehr reichlich zur Entwicklung von solchen Ausläufern, so bieten die Gelatinekulturen ein sehr zierliches Bild. Der Nährboden zeigt sich dann durchsetzt von überaus zierlichen, langen, geschlungenen, mannigfach gedrehten, dickeren bis haarfeinen Gebilden, die oft in weitem Abstand vom centralen Stichfaden, von dem sie ausgehen, in bogenförmigen Windungen die Gelatine, welche keine Spur von Verflüssigung oder Erweichung zeigt, durchsetzen. Diese Vegetationen, ebenso wie der übrige Nährboden sind dann in wechselndem

Grade von Gasblasen durchsetzt. Diese Form der Gelatinevegetationen stellt den zweiten Typus vor. In wieder anderen Fällen kommt es schon in 48 Stunden nach der Aussaat zu einer ganz eigentümlichen Veränderung der Gelatine. Diese erscheint reichlich von Gasblasen durchsetzt, diffus getrübt, das Gesamtvolumen der Vegetation dadurch oft aufs Doppelte vergrößert, dabei aber tritt keine Spur von Verflüssigung auf. Man kann die Eprouvette umkehren, schütteln, es zeigt sich weder in den Gasblasen eine Bewegung noch sonst eine Veränderung, die auf Verflüssigung hinweisen würde.

Stellt man nun eine so veränderte Eprouvette, im Buchnerrohr verwahrt, auf 24 Stunden in den Brutschrank, so steigen naturgemäß nach der Verflüssigung der Gelatine die Gasblasen an die Oberfläche. Die Gelatine erstarrt aber in kürzester Zeit wieder in ihrer Gesamtheit, wenn die Eprouvette in kaltes Wasser gegeben wird und bleibt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dauernd unverändert.

Hält man die Eprouvette durch viele Tage im Brutschrank, so beobachtet man allerdings eine herabgesetzte Erstarrungsfähigkeit der Gelatine, ein Umstand, der gewiß nicht in Erstaunen setzen kann, wenn man bedenkt, daß es sich um langdauernde Einwirkung von Brutwärme auf eine durch die gebildete Buttersäure und Milchsäure stark sauer gemachte Leimlösung handelt. Jedenfalls darf man bei dieser Versuchsanordnung nicht ohne weiteres an die Einwirkung eines peptonisierenden Enzyms denken.

Von welchen Umständen hängt nun das jeweilige Auftreten einer der drei Typen des Wachstums auf Gelatine ab? Da wirft sich zunächst die Frage auf, ob sich zwischen den einzelnen Arten der untersuchten Stämme des beweglichen Buttersäurebacillus Unterschiede ergeben. Der Hinweis darauf, daß jeder der untersuchten Stämme in allen drei Typen auf Zuckergelatine zur Beobachtung kommt, zerstört bereits alle Illusionen, welche darauf hinzielen, etwa mit Hilfe der Zuckergelatinekultur einzelne Stämme voneinander zu unterscheiden. Davon kann bei dem außerordentlich wechselnden Verhalten der Reinkultur jedes

einzelnen Stammes nicht die Rede sein. Es gelingt zwar durch Züchtung bei einer Temperatur, welche der Verflüssigungstemperatur der Gelatine sehr nahe kommt, häufiger die Form diffusen Wachstums zu erhalten, doch tritt diese anderseits auch bei sehr niedriger Temperatur (12—14°) gelegentlich auf. Die Konzentration des zugesetzten Zuckers ist belanglos; bei starker Herabsetzung des Zuckergehaltes werden die Bedingungen zum Anwachsen sehr ungünstige, die geimpften Eprouvetten bleiben oft steril, bei höherer als 2proz. Zuckerkonzentration bleiben die Resultate ebenso wechselnd wie bei Gelatine mit 2% Zucker. Ja man kann nicht selten bei Abimpfung von einer Reinkultur in eine Anzahl von Eprouvetten, die mit Nährboden derselben Bereitung gefüllt sind, das Auftreten von verschiedenen Wachstumstypen beobachten. Die Bedingungen für das wechselnde Verhalten der beweglichen Buttersäurebacillen in Zuckergelatine sind uns also im einzelnen Falle nicht bekannt. Auch durch Wasserzusatz, bezw. Gelatinegehaltherabsetzung kann keine sichere Beeinflussung erzielt werden, ebensowenig liefs sich ein Einfluß von seiten der ursprünglichen Nährbodenreaktion feststellen. Zweifellos ist der augenblickliche Charakter des überimpften Stammes, der wieder von den Wachstumsbedingungen der vorausgegangenen Generationen abhängt, von großer Bedeutung, wie dies später noch auseinandergesetzt werden soll.

Im übrigen können wir nur vermuten, daß es außerordentlich feine Differenzen in der Beschaffenheit des Nährbodens einerseits, in der augenblicklichen Wachstumsenergie der Keime anderseits sind, die in verschiedenen Impfungen, ja in einer und derselben Kultur zeitweise langsames, geschlossenes Wachstum, dann rasches, diffuses Durchwachsen des Nährbodens herbeiführen. Jedenfalls läfst sich kein Zusammenhang mit den Verhältnissen der Anaërobiose feststellen.

Ganz analog wie das Verhalten des beweglichen Buttersäurebacillus in Gelatinestich ist dessen Wachstum auf Gelatineplatten. Auch hier kommt es gelegentlich, wenn auch seltener, zu einer diffusen, mit reichlicher Gasbildung verbundenen Vegetation, die sich mikroskopisch (50fach) als eine sehr feinkörnige

Trübung darstellt, meistens aber zeigen sich kompakte Kolonien, auch bei dichter Aussaat. Diese sind nun wieder entweder knollig, und die einzelnen Knollen oder deren Aggregate erreichen dann oft in sechs Tagen eine Gröfse von mehr als 2 mm Durchmesser, oder es treten bereits frühzeitig zahlreiche, zierliche Ausläufer auf, die sich bei schwacher Vergrößerung als korkzieherförmig gewundene, zopfartige oder strahlige, manchmal auch geldrollenförmig gestaltete Gebilde darstellen, welche die Gelatine nach allen Richtungen durchziehen.

Auch hier kommt es stellenweise zu diffuser, feinkörniger Infiltration; manchmal erscheint eine solche Ausbreitung, insbesondere in der Umgebung von Gasblasen unter dem Mikroskop als Geflecht von binsenförmig verfilzten Fäden. So bieten diese verschiedenen Typen, welche in einer und derselben Platte in verschiedener Form zur Ansicht kommen, einen Anblick, der an die Vegetationen des *Proteus vulgar.* auf Gelatine täuschend erinnert.

Am ehesten bekommt man hier noch mit einiger Regelmäßigkeit knollige Kolonien ohne Ausläufer zu Gesicht, wenn man Oberflächenkulturen anlegt, indem man eine mit der Reinkultur beschickte Platinnadel auf der Oberfläche der Platte verstreicht, ein Verfahren, das unter den absolut anaëroben Verhältnissen unseres Kulturverfahrens auch bei Verwendung von sporenfreiem Ausgangsmaterial, einige Schnelligkeit beim Anfertigen und Verarbeiten der Kulturen vorausgesetzt, mühelos zum Ziele führt. Es hat dies insofern eine gewisse Bedeutung, als man derart besonders schöne, reichliche Clostridien in Reinkultur erzielen kann (s. u.).

Es läfst sich nämlich feststellen, dafs in Kolonien, welche dem knolligen Typus entsprechen, die Menge der granuloseführenden und insbesondere der sporentragenden Stäbchen häufig eine auffallend grofse ist, während bei Vegetationen mit diffuser Infiltration fast regelmäfsig Clostridien und Sporen in den Hintergrund treten. Dieses Verhalten steht in gutem Einklang mit der Beobachtung, dafs auch unter anderen Umständen langsames Anwachsen und Sporenbildung einander nicht selten parallel gehen.

Auch hier hat man wieder den Eindruck, daß die günstigsten Bedingungen zur Sporenbildung regelmäÙig in den allerersten Zeiten des Anwachsens bereits vorhanden sein müssen, bezw. daß in Kulturen, die von vornherein sporenfrei vegetieren, in der späteren Zeit der Vegetation die Bedingungen zur Versporung keineswegs günstiger werden.

Verhalten auf Zuckeragar.

Im Zuckeragarstich (38° C.) entwickelt sich mit ganz wechselnder Geschwindigkeit, je nach Nährbodenverhältnissen, nach Lebensfähigkeit und Menge der übertragenen Keime in wenigen Stunden bis zu einem Tage, eine Vegetation, die, dem Stichkanal folgend, keinerlei charakteristische Eigenschaften aufweist; es braucht wohl nicht erwähnt zu werden, dass es von der Agarkonsistenz, von der Entwicklungsenergie der übertragenen Kultur und von dem Grade der vorhergegangenen oder fortwirkenden (Buchner) Sauerstoffbefreiung des Nährbodens abhängt, ob in diesem Stadium der Stichfaden mit seiner oberen Grenze mehr oder weniger weit von der Oberfläche entfernt ist. Ebenso kommt die gewöhnlich bald auftretende Gasbildung unter den verschiedensten Intensitätsgraden zur Erscheinung. Hat man günstige Bedingungen getroffen, so zeigt sich bereits 10 Stunden nach der Impfung der Zuckeragar von Gasblasen ganz durchsetzt, dabei diffus getrübt, an der Oberfläche sammelt sich eine Flüssigkeit, die durch Bakterien reichlich getrübt, längs des Stichkanals und mit den Gasblasen nach oben geprefst wurde. Im ungünstigsten Falle erscheint die Vegetation noch nach 24 Stunden unter dem Bilde eines die Oberfläche nicht erreichenden, gleichmäÙig dicken oder unregelmäÙigen Fadens. Beim Öffnen der gut gewachsenen Zuckeragarkulturen macht sich ein mehr oder minder intensiver Geruch nach Buttersäure bemerkbar, Fäulnisgeruch wird stets vermifst. In gewöhnlichem Agar erfolgt ebenfalls ziemlich reichliches Wachstum, die Gasbildung ist *ceteris paribus* geringer. Das beim Wachstum in Zuckeragar und Agar zur Beobachtung kommende Verhalten hinsichtlich Granulose- und Sporenbildung wird später auseinandergesetzt werden. Die

anaeroben Zuckeragarplatten zeigen gewöhnlich bereits nach 12 Stunden in den ersten Verdünnungen reichlich Gasblasen. 24 Stunden nach der Aussaat zeigen sich tiefe Kolonien, wetzsteinförmig oder mit stacheligen Ausläufern, letztere besonders in den dichtbesäten Platten. Sehr selten, nur bei Aussaat von Ragen mit ganz ausgesprochener Neigung zur Versporung, beobachtet man Kolonien mit haarigen Ausläufern. Außerdem sieht man oft sehr zahlreich große Gasblasen, welche den Nährboden vom Glase abheben und in ihrer Randbucht mit trüber Flüssigkeit gefüllt sind. Diese Gasblasen mit Randinfiltration bieten die beste Gelegenheit, die rasche Beweglichkeit der hier unter anaërobem Verschluss (durch die darüber liegende Agardecke) befindlichen Bakterien zu konstatieren, indem eine Beobachtung des Gasblasenrandes bei etwas stärkerer Vergrößerung über dieses charakteristische Verhalten sofort Aufschluss gibt (s. auch unsere erste Mitteilung). Voraussetzung ist, dass die Platten nicht älter als 24 Stunden sind. Denn in solchen älteren Kulturen ist sehr häufig die Beweglichkeit dieser Stäbchen, welchen eine sehr kurze Lebensdauer zukommt, vollständig erloschen, ein Umstand, der seine Analogie darin findet, dass auch Abimpfungen von älteren Kolonien häufig erfolglos bleiben. Dasselbe gilt von Kulturen, in denen überreichliche Granulosebildung von vorneherein einsetzt. Auch in solchen zeigen sich gelegentlich die meisten Stäbchen bereits nach 24 Stunden unbeweglich.

Es mag hier nebenbei erwähnt werden, dass anaërobe Zuckeragarplatten des beweglichen Buttersäurebacillus ebenso wie die des unbeweglichen, welche nach 24 Stunden noch keine Kolonien oder Gasblasen erkennen lassen, gewöhnlich auch dauernd steril bleiben; es handelt sich dann entweder um mangelhafte Anaërobiose oder um Verwendung von abgestorbenen Stäbchenvegetationen zur Aussaat.

Der schädliche Einfluss der Gegenwart von rasch wachsenden, fakultativ anaëroben Bakterien in Mischkulturen, welcher auch bei Verwendung von Ausgangsmaterial (flüssige Nährböden), das scheinbar überwiegend die Stäbchen des beweglichen Buttersäurebacillus enthält, zur Geltung kommt, macht

sich auch hier (Zuckeragar) in hohem Grade bemerkbar, eine Erfahrung, die von Wichtigkeit für die Beurteilung des Mengenverhältnisses verschiedener Arten von Gärungserregern in flüssigen Medien ist. Es mag hier hervorgehoben werden, daß in vielen Fällen eine Isolierung des beweglichen Buttersäurebacillus aus flüssigem Material, das er in dem betreffenden Falle gärend beherrscht, durch das einfache Plattenverfahren ausgeschlossen ist. Damit soll ein Punkt von wesentlicher Bedeutung berührt werden: strengste Anaërobiose, Wahl eines sonst günstigen Substrates (Zuckeragar), vermögen nicht die Nachteile aufzuwiegen, welche der feste Nährboden dem Anwachsen mancher Rassen der Buttersäurebacillen in Mischkultur entgegengesetzt, ja, man glaube nicht, im festen Nährboden durch Beimischung aërober Bakterien etwa ähnliche Wachstumsbegünstigungen herbeizuführen, wie dies in flüssigen Medien der Fall ist.

Es scheint uns, daß dies trotz aller Erfahrungen der älteren bakteriologischen Zeit gerade in den letzten Jahren zu wenig berücksichtigt worden ist. Das angeführte Verhalten kann nun aber auch in umgekehrter Richtung zu folgenschweren Irrtümern führen. Es kann nämlich der Fall eintreten, daß bei Abimpfung von solchen fakultativ anaëroben Kolonien, Sporen des spezifischen Gärungserregers, welche im Nährboden zerstreut gelagert sind, nun neuerlich, wenn die Übertragung in flüssiges Material stattfindet, auskeimen, neuerlich Gärung verursachen und das Feld beherrschen, während die fakultativ anaëroben Bakterien zurücktreten. Damit liegt die Vermutung nahe, daß ein Teil der rätselhaften Befunde, welche von Autoren angegeben werden, z. B. die Existenz von Organismen, die nur einmal oder einigemale spezifische Gärung verursachen, die sich dabei aus streng anaëroben Bakterien in morphologisch und biologisch ganz anders geartete Keime umwandeln, auf solche Fehlerquellen zurückzuführen ist. Eine Methode, die zum Teil die Nachteile des festen Nährbodens paralyisiert und damit auch unter sonst ungünstigen Bedingungen Rassen von Gärungserregern (welche unter gewöhnlichen Verhältnissen trotz strengster Anaërobiose, trotz verhältnismäßig reichlicher Gegenwart im flüssigen Ausgangs-

material etc. nicht züchtbar sind), über die Schwelle der Züchtbarkeit in festen Nährmedien hebt, soll von uns später mitgeteilt werden.

Ein sehr auffallender Unterschied zwischen den Kolonien des beweglichen und jenen des unbeweglichen Buttersäurebacillus ergibt sich in dem Aussehen der Oberflächenkolonien auf Zuckeragar.

Während sich in Reinkulturen des unbeweglichen Buttersäurebacillus auf Zuckeragarplatten fast regelmässig saftige, gut abgegrenzte, im gewissen Grade charakteristische Oberflächenkolonien entwickeln (s. unsere erste Abhandlung im Archiv für Hygiene), zeigen sich beim beweglichen Buttersäurebacillus die an die Oberfläche durchbrechenden tiefen Kolonien an der Durchbruchsstelle von einer schleierartigen, oder etwas dichteren Vegetation umgeben, die sich allmählich nach aussen verliert. Unter dem Mikroskop läßt sich die mehr diffuse Ausbreitung dieser Vegetationen über die Oberfläche in weitem Abstand von dem Zentrum der Kolonien deutlich verfolgen, offenbar sind eben die Bedingungen für das Ausschwärmen der beweglichen Buttersäurebacillen in dem Kondenswasser, das sich unter den besonderen Bedingungen der Anaërobie leichter erhält, sehr günstige.

Dafür spricht auch der Umstand, daß man nicht selten an Kolonien, die auf der Höhe der Kuppe von Gasblasen durchbrechen, schärfer abgegrenzte, rundliche, etwas dichtere Oberflächenvegetationen bemerkt, die einigermassen schlecht entwickelten Oberflächenkolonien des unbeweglichen Buttersäurebacillus gleichen.

Das Abfließen des Kondenswassers von der kuppenförmigen Wölbung der Oberfläche dürfte hier günstige Verhältnisse für ein mehr begrenzt bleibendes Wachstum herbeiführen.

Die mitgeteilten Befunde sollen durch die Angabe ergänzt werden, daß sich aus dem Studium der Zuckeragarkolonien keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Stämmen des beweglichen Buttersäurebacillus feststellen ließen.

Was die Gasbildung in Zuckeragarplatten betrifft, so zeigen sich dieselben meist reichlich von Gasblasen durchsetzt, welche teils von Kolonien ausgehen, teils sich im kolonienfreien Teil

des Nährsubstrats ansammeln, aber auch dann häufig vegetationsreiches Kondenswasser enthalten. Die Gasbildung ist im Zuckeragar überhaupt *ceteris paribus* gewöhnlich reichlicher, als dies beim unbeweglichen Buttersäurebacillus zur Beobachtung kommt.

Das Wachstum der Reinkulturen auf Kartoffeln, welche im Buchnerrohr oder in Scheiben zerschnitten in Petrischen Schalen verwahrt und unter strenger Anaërobiose bebrütet wurden, ist bei allen untersuchten Stämmen ein gleichartiges. Es bildet sich innerhalb 48 Stunden ein üppiger, schaumiger weißer Rasen aus, welcher die Oberfläche bedeckt, wobei die Kulturen stark nach Buttersäure riechen.

Das Wachstum auf Bouillon mit Zuckerzusatz tritt rasch ein, die Gärung verläuft hier unter den an anderer Stelle angegebenen Erscheinungen.

Morphologie der Individuen.

Eine einheitliche morphologische Beschreibung des beweglichen Buttersäurebacillus stößt auf große Schwierigkeiten. Denn der Umstand, daß bei diesem Bakterium der die Vielgestaltigkeit der Formen beherrschende Versporungsprozess so überaus häufig zur Entwicklung kommt, macht die Bilder so außerordentlich wechselnd, daß es schwierig ist, das Gemeinsame hervorzusuchen und das Typische zu gruppieren. Diese große Neigung zur Versporung, bzw. zu den die Versporung auf unseren gebräuchlichen bakteriologischen Nährböden einleitenden Prozessen schafft eine wesentliche Differenz zwischen dem beweglichen Buttersäurebacillus und der unbeweglichen Art, die uns unter den üblichen Bedingungen fast stets unter dem Bilde der sporenfreien Stäbchenvegetation zu Gesichte kommt.

Andererseits wäre es falsch, dieser Differenz ein zu großes Gewicht beizumessen und sie etwa im Sinne einer sehr getrennten Gruppierung der beiden Arten im Rahmen des natürlichen Systems zu verwerten. Denn alle Erfahrungen zeigen, daß unter anderen Verhältnissen in den von der Natur gebotenen Substraten mit allen ihren besonderen Eigenschaften (Symbiose etc.) auch der unbewegliche Buttersäurebacillus regelmäßig, ja reichlich

versport (beständige Anwesenheit von Sporen im Darminhalt!). Es ist also eine Differenz, welche vor allem auf eine für den unbeweglichen Buttersäurebacillus durchaus nicht gleichgültige Änderung der natürlichen Bedingungen zurückzuführen ist, die wir hervorrufen, wenn wir ihn zwingen, in Reinkultur auf unseren Nährböden Besitz zu ergreifen. Andererseits aber kennen wir doch eine Reihe von Einflüssen, die bei beiden Arten parallel die Versporung im günstigen oder ungünstigen Sinne beeinflussen.

Was nun die Formen betrifft, unter welchen die Individuen des beweglichen Buttersäurebacillus erscheinen, so sind die Differenzen zwischen denselben insbesondere, soweit es sich nicht um eigentliche reine Degenerationserscheinungen handelt, durch die im wechselnden Grade erfolgende Ablagerung der stärkeartigen Substanz im Innern der Bakterienzellen, der sogenannten »Granulose« bedingt, viel mehr als durch die räumliche Veränderung, welche durch die Einlagerung der Spore selbst geschaffen wird.

Die quantitativ verschiedene Ablagerung der Granulose im Innern der Zelle — quantitativ im Sinne einer ganz bedeutenden Spielweite — veranlaßt, daß die beweglichen Buttersäurebacillen einmal als schlanke Stäbchen, ein anderes Mal als Clostridien auftreten, und alle Übergänge zwischen beiden, die sich so überaus häufig in einer und derselben Vegetation vereinigt vorfinden, lassen sich auf dieselbe Ursache zurückführen. Es soll gleich hier erwähnt werden, daß außer dieser spezifischen, auf wechselnder Granuloseablagerung basierenden Vielgestaltigkeit der Formen, auch der sonst bei allen Bakterien zur Beobachtung kommende Formenwechsel, teilweise unter uns bekannten Umständen erfolgend (Kapsel-, Scheinfädenbildung etc.), auftritt. Die große, ins Auge springende Differenz zwischen den Extremen »Stäbchen« und »Clostridium« hat einen Forscher, Beijerinck, veranlaßt, offenbar unter dem Eindrucke einer Reihe schwer zu erklärender Erscheinungen bei der Buttersäuregärung, die Theorie aufzustellen, daß es sich bei dieser Bakterienart (es handelt sich um das gr. saccharobut.) um zwei Formen, eine Sauerstoffform und eine anaerobe Form handle.

Bejerinck unterscheidet diese beiden Formen, indem er ihnen nicht nur morphologische Unterschiede zuschreibt, Sauerstoffform = schnell bewegliche Stäbchen, Körner enthaltend und zu Ketten verbunden, Clostridienform = die bekannten langsamer beweglichen, plumpen, granulosereichen Gebilde, sondern er vindicirt ihnen auch verschiedene biologisch-chemische Charaktere, indem er die schlanken, lebhaft beweglichen Stäbchen als Formen auffasst, die bei Gegenwart geringer Mengen von Sauerstoff auftreten, die überdies ihre Beweglichkeit in strenger Anaerobiose einstellen, während die Clostridien sich im Gegensatze hierzu bei strenger Anaerobiose entwickeln, und sich sowohl bei Gegenwart als bei Abwesenheit von Sauerstoff bewegen sollen: Ja, auch die quantitativen Verhältnisse der gebildeten Produkte sollen nicht unwesentlich voneinander abweichen, je nachdem es sich um die eine oder die andere Form handle. Es ist hier nicht der Platz, auf eine erschöpfende Kritik der Bejerinckschen Behauptungen einzugehen, da diese der Schlufsbesprechung am Anhang unserer fortlaufenden Untersuchungen vorbehalten bleibt. Wir wollen hier nur unserer Ansicht Raum geben, daß wir einer derartigen Zweiteilung in anaerobe und aerobe Form dieser Bakterienart unter keinen Umständen beipflichten können. Wir haben uns stets überzeugen können, daß auch die schlanken Stäbchen gegenüber dem Sauerstoff empfindlich sind, daß Anaerobiose und Auftreten der einen oder andern Form in gar keinem direkten Zusammenhang stehen. Unserer Ansicht nach sind die beweglichen Buttersäurebacillen Organismen, die zum Anwachsen stets der Abwesenheit des freien O bedürfen, gleichgültig ob diese durch unsere Manipulationen oder durch vorhergehende Sauerstoffbefreiung des Nährbodens unter dem Einflusse der Symbiose hergestellt wird.

Das häufige Auftreten von Clostridien in Mischkulturen, das häufige Fehlen von Clostridien in Reinkulturen, flüssige Nährböden gleicher Zusammensetzung vorausgesetzt, beziehen wir nicht auf die in Mischkulturen leichter erfolgende Sauerstoffbefreiung, sondern auf eine Alteration des Bakterienstoffwechsels durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer Bakterien, sei es

dafs es sich um Einwirkung der von diesen gelieferten Stoffwechselprodukte oder um eine andere Art der Beeinflussung handelt, zum Teil auch auf den Umstand, dafs bei der Reinisolierung aus Mischkulturen in festen Nährböden häufig zunächst Abnahme der Neigung zur Versporung festzustellen ist. Wir wissen heute mit Bestimmtheit, dafs sowohl bei dem unbeweglichen als bei dem beweglichen Buttersäurebacillus die Sporenbildung auch durch die Gegenwart anderer streng **anaeröber** Bakterien begünstigt wird.

Zum Studium der Stäbchen- und der Übergangsformen empfiehlt sich vor allem die Kultur in Zuckeragar.

Wegen der grofsen Empfindlichkeit des beweglichen Buttersäurebacillus gegen freien Sauerstoff stellt man die ausgekochten, rasch erstarrten und mit einer Reinkultur geimpften Eprouvetten, im Buchnerrohr verwahrt, in den Brutschrank.

Ist nach 16—20 Stunden üppiges Wachstum eingetreten, mit reichlicher Gasbildung etc., so öffnet man das Buchnerrohr und fertigt sofort einen hängenden Tropfen an, indem man mit der Platinöse eingeht und etwas Kondenswasser entnimmt. Es empfiehlt sich dies mehr, als das Vermischen von Vegetation mit einem Tropfen ausgekochter Bouillon, weil bei dieser Manipulation leicht reichlich Luft von der Flüssigkeit, in welcher die Aufschwemmung stattfindet, absorbiert wird, so dafs die Eigenbewegung der Bakterien erlischt, bevor man die Beobachtung im Mikroskop beginnt. In vielen Fällen kommen bei dieser Kulturmethode (Zuckeragar) die Buttersäurebacillen als schlanke, ziemlich lange Stäbchen zu Gesicht, die sich mit grofser Geschwindigkeit, lebhaft schlängelnd oder schiefsend durch das Gesichtsfeld bewegen. Dabei zeigt sich, dafs auch solche Individuen, welche bereits die Sporenanlage — gewöhnlich dem einen Ende nahe gerückt — aufweisen, gut beweglich sind.

Bald macht sich nun eine auffällige Erscheinung bemerkbar, indem die Stäbchen sich immer zahlreicher in Häufchen gruppieren, die Haufen immer dichter werden, immer weniger Bakterien sich beweglich zeigen, bis endlich, gewöhnlich im Verlaufe einer viertel bis halben Stunde nahezu sämtliche Stäbchen, in

Haufen gruppiert, regungslos verharren. Diese, unter der zunehmenden Sauerstoffabsorption der Flüssigkeit erfolgende Haufenbildung hat äußerlich große Ähnlichkeit mit den bekannten Agglutinationserscheinungen, welche bei Einwirkung von normalem, bzw. spezifischem Serum auf Bakterien gesehen werden. Auch makroskopisch beobachtet man leicht, daß der ursprünglich gleichmäßig trübe Tropfen seine diffuse Trübung verliert, bis endlich in der klaren Flüssigkeit feinste Flöckchen suspendiert sind.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die beschriebene Erscheinung, die sich in ähnlicher Weise auch bei einigen anderen anaeroben Bakterien zeigt, auf einer unter dem Sauerstoffeinfluß erfolgenden Veränderung der Leibessubstanz beruht, welche diese klebrig macht. Jedenfalls muß diesem Verhalten beweglicher anaerober Bakterien besondere Aufmerksamkeit zugewendet werden, wenn es sich um das Studium spezifischer Agglutination handelt. Die außerordentliche Empfindlichkeit gegen Sauerstoffzufuhr macht sich nun auch in der Weise bemerkbar, daß es nicht leicht gelingt, in der Deckglastropfenkammer bei Durchleiten von reinem Wasserstoff die Beziehungen der Stäbchen zur Sauerstoffanwesenheit oder -abwesenheit festzustellen. Manipuliert man nämlich bei dieser Versuchsanordnung so, daß man auch nur durch einige Zeit mit Luft gemengten Wasserstoff vorbeileitet, so erlischt die Beweglichkeit der Stäbchen unter dem Einfluß des vorbeistreichenden Sauerstoffes so rasch, daß die Stäbchen für immer ihre Beweglichkeit verlieren, und dann auch der beliebig lang fortgesetzte Aufenthalt in reiner Wasserstoffatmosphäre keine Änderung herbeiführt.

Hat man aber zuerst den Zufuhrschlauch durch längeres Durchleiten von reinem H₂ ganz luftfrei gemacht, so läßt sich im Gegenteil eine außerordentliche Zunahme der Beweglichkeit, die lange unverändert anhält, leicht feststellen. Damit ist der Beweis erbracht, daß dasjenige, was Beijerinck als Sauerstoffform bezeichnet, allerdings in der morphologischen Beschaffenheit ganz dem von diesem Autor gegebenen Bilde entspricht, keineswegs aber biologisch — hinsichtlich der Resistenz oder dem Bedürfnis gegenüber Sauerstoff — der von demselben gegebenen Beschreibung gleichkommt.

Die Größen- und Formverhältnisse der Individuen des beweglichen Buttersäurebacillus, welche man in solchen jungen Kulturen zu Gesicht bekommt, sind außerordentlich wechselnd. Sie sind bei Reinkulturen desselben Stammes unter scheinbar denselben äußeren Verhältnissen äußerst verschieden, indem das Aussehen des Gesamtbildes, welches man bei Betrachtung einer geringen Menge der Vegetation unter dem Mikroskop erhält, ganz von dem Umstande abhängt, ob die Ansammlung der Granulose im Innern der Stäbchen eine geringe oder hochgradige ist, ob viele oder nur wenige Stäbchen mit Granulose beladen sind. Man hat es nun durchaus nicht in der Hand, im Einzelfalle das Maß der Granuloseentwicklung gleichmäßig zu beeinflussen; daraus erhellt bereits die Unmöglichkeit, einzelne Stämme etwa nach feineren morphologischen Differenzen als verschiedene Varietäten zu trennen. Auch unter den granulosefreien Stäbchen in einer solchen jungen Reinkultur machen sich allerdings geringere Differenzen in dem Dickendurchmesser der Zellen bemerkbar.

Die meisten granulosefreien Individuen im hängenden Tropfen aus jungen Zuckeragarkulturen stellen ziemlich gleichmäßig dicke, gerade oder schwach gekrümmte Stäbchen dar mit abgerundeten Enden, die entweder einzeln oder in kurzen Verbänden, zu 2 oder 3 sich mit ziemlich großer Geschwindigkeit durch das Gesichtsfeld bewegen.

Das Plasma erscheint entweder gleichmäßig hell oder leicht fleckig, nicht selten trifft man insbesondere Doppelstäbchen an deren freie Enden eine bei hoher Einstellung helle, bei tiefer Einstellung dunklere Partie erkennen lassen.

Die Stäbchen sind etwa $3-5 \mu$ lang, $0,6-1,0 \mu$ breit. Sieht man scheinbar längere Exemplare, so handelt es sich wohl meist um Doppelstäbchen mit undeutlicher Trennung der Individuen.

In solchen Dimensionen bewegen sich die granulose- und sporenfreien Individuen. Hat man nun, was allerdings selten geschieht, eine Zuckeragarkultur vor sich, in welcher die Ablagerung von Granulose in Stäbchen, die Versporung ganz ausgeblieben ist, so zeigen sich die Formen nach dem Mitgeteilten

ziemlich regelmäfsig, insbesondere ist der Dickendurchmesser der Individuen ein ziemlich gleichartiger.

Diese sporenfreen Stäbchen sind offenbar insbesondere gegen die schädliche Einwirkung der sauren Produkte bei höherer Temperatur (37°) sehr widerstandslos. Solche Kulturen sind oft, selbst wenn sie im Buchnerrohr verschlossen, nur 48 Stunden im Brutschrank verweilen, bereits nicht mehr übertragbar. Mikroskopisch erkennt man aufser rasch abnehmbarer Färbbarkeit und Auftreten einer nicht spezifischen Plasmakörnung (degenerativ) keine auffallende Veränderung.¹⁾

Wir haben bereits erwähnt, dafs uns die näheren Bedingungen für Auftreten oder Ausbleiben von Granulose in Zuckeragarkulturen im Einzelfalle nicht bekannt sind. In sicheren Reinkulturen unter scheinbar sonst ganz gleichartigen Verhältnissen zeigen sich die wechselndsten Mengen von granulosetragenden Stäbchen, wie es auch für den unbeweglichen Buttersäurebacillus zutrifft.

Nach unseren Erfahrungen und Anschauungen hängen Granulosebildung und Versporung bei den Buttersäurebacillen in dem Sinne zusammen, dafs in der Regel die Granulosebildung als einleitender Prozeß im Stäbchen der Versporung vorangeht. (Siehe auch unsere Abhandlung über den unbeweglichen Buttersäurebacillus.) Der Umstand, dafs bei der Granulosebildung im Gegensatz zum gewöhnlichen Stoffwechsel der lebhaft gärenden Zellen die Kohlehydrate nicht zersetzt werden, sondern im Gegenteil, wenigstens Anteile derselben, polymerisiert und abgelagert werden, spricht für eine wesentliche Alteration des Lebensprozesses der Bakterien. Die Granulose wird nun in auferordentlich wechselndem Grade in der Zelle abgelagert. Gewisse Bilder, von denen später die Rede sein soll, beweisen, dafs Anteile dieser Granulose auch in die sich bildenden Sporen übertreten. Es könnte zunächst fraglich bleiben, ob dies — im Sinne einer Ablagerung von Reservesubstanz — nicht regelmäfsig stattfindet und ob nicht

1) Sehr häufig beobachtet man, dafs sich granulose- und sporenfreen Stäbchen mit Jod intensiv gelb färben. Dieser Zustand dürfte der Granuloseentwicklung vorausgehen.

etwa durch eine vorhergehende weitere Veränderung der Granulose der Nachweis dieser Substanz mit Jod in der Spore versagt, oder ob andererseits der Zusammenhang Granulose und Versporung in dem Sinne aufzufassen ist, daß die Granuloseablagerung in dem Stäbchen nur ein Ausdruck des geänderten Stoffwechsels ist, der zur Sporenbildung führt, ohne daß die Substanz »Granulose« selbst ein wesentlich wichtiges Baumaterial für die Spore darstellt.

Wie dem auch sei (siehe später), das Maß der Granulose-Entwicklung im Stäbchen selbst beherrscht das morphologische Verhalten der Individuen im hohen Grade. Selbstverständlich trifft man in einer und derselben Kultur meist alle Stadien der Entwicklung dieses merkwürdigen Prozesses. Noch bevor sich an den Stäbchen im ungefärbten Zustande schärfer abgegrenzte Sporenanlagen erkennen lassen, findet man reichlich solche, die bei erhaltener Stäbchenform gleichmäßig oder etwas ungleichmäßig verdickt erscheinen (0,9 bis 1,3 μ Durchm.); färbt man mit Jodlösung, so zeigen sich sehr häufig diese Stäbchen ausgedehnt intensiv braun oder blau gefärbt. Die Form, in welcher die Granulose abgelagert ist, ist wechselnd, doch scheint es am häufigsten in diesen jungen Stadien zu einer solchen Ablagerung in der Zelle zu kommen, daß diese in ihrem einen Ende vollständig von dieser Substanz erfüllt ist, während das andere freie Ende keine Granulose aufweist. Infolge des außerordentlich häufigen Auftretens von Doppelstäbchen in den Kulturen findet man dann fast regelmäßig längere Stäbchen, die scheinbar in der Mitte Granulose tragen, während die beiden Enden frei von dieser Substanz sind. (Auch das entgegengesetzte Verhalten findet sich nicht selten.)

Bei genauerem Zusehen erkennt man, daß es sich um Verbände von zwei Stäbchen handelt, die mit ihrem granulosetragenden Ende zusammenstoßen, während die freien Enden ungefärbt sind.

Der granuloseerfüllte Anteil des Stäbchens ist sehr verschieden groß, geradlinig, bogenförmig oder unregelmäßig gegen das Ende abgegrenzt; oft zeigen sich nur geringe Ansammlungen dieser Substanz in Form von körnigen oder fleckigen Gebilden,

oft ist nahezu die ganze Zelle gleichmäßig hiervon durchsetzt, wenn auch in der Regel stets ein Anteil an dem einen Ende ungefärbt erscheint.

In manchen Fällen, insbesondere dann, wenn die Granulose nur spärlich zur Entwicklung gekommen ist, färbt sich diese Substanz mit Jod nicht blau oder schwarz, sondern bräunlich oder rötlich.¹⁾

In den weitaus meisten Fällen ist die Färbung so intensiv, daß es nicht möglich ist, in den blaugefärbten Partien nähere Struktureigentümlichkeiten festzustellen.

Tritt in Verbänden von drei oder mehr Individuen Granulose auf, dann erscheinen diese nicht selten blau gebändert oder gefleckt.

Kommt es nun zu einer noch reichlicheren Ansammlung der Granulose im Zelleib, dann geht eine auffällige Formveränderung mit demselben vor sich, indem die Wandung der Zelle offenbar unter dem Drucke der sich ansammelnden Massen ausgedehnt wird, wobei die ganze Zelle Eiform annimmt. So entsteht jenes Gebilde, das sich auf den ersten Anblick so auffällig von den typischen Stäbchen unterscheidet.

Auch diese granuloserreichen Eiformen lassen in der Regel, selbst dann, wenn noch keinerlei differenzierte Spore mit Hof zu erkennen ist, an einem Ende einen granulosefreien Abschnitt erkennen. Über die Gestalt dieses granulosefreien Abschnittes soll später berichtet werden.

Die eiförmigen Formen kommen auch in Verbänden zu drei und mehreren zu Gesicht. Länge und Dicke sind sehr verschieden.

Im hängenden Tropfen zeigen sie sich gut beweglich, die Bewegungen sind, entsprechend der sich der Kugel nähernden Gestalt, häufig rollend oder drehend und wackelnd.

Bei allen den bisher beschriebenen granulosetragenden Stäbchen und Eiformen kann es sich um solche Exemplare handeln, bei denen sich ohne Jodfärbung, im ungefärbten Präparat keinerlei Differenzierung im Sinne einer entwickelten Sporenanlage erkennen läßt.

1) Kommt bei allen untersuchten Rassen vor.

Das Plasma erscheint in solchen dicken Stäbchen und Clostridien (ungefärbtes Präparat) gleichmäßig feinkörnig. Jedenfalls beweist aber auch hier das Freibleiben eines Abschnittes der Zelle von Granulose, eines Abschnittes, welcher der regelmäßigen Sporenlage entspricht, daß schon bei dem ersten Auftreten der Granulose auch die Sporenanlage eingeleitet wird. Aber es kann die weitere Ausbildung der Spore im Gegensatz zu der Granuloseablagerung in der Zelle zurückbleiben; so daß der Prozeß mit einer excessiven Granuloseablagerung endgültig abschließt.

Dieses Verhalten — excessive Granuloseablagerung — mangelhafte Sporenausbildung — kann in manchen Fällen das ganze Bild einer Vegetation beherrschen.

Es führt insbesondere in älteren Zuckerbouillonkulturen, welche mit hartnäckig sporulierenden Rassen geimpft sind, zur Entstehung abenteuerlicher Gebilde.

In sehr vielen Fällen aber beginnt sich schon frühzeitig die Spore in dem früher geschilderten granulosefreien Anteil der Zelle (Stäbchen oder Clostridium) als stark lichtbrechender, ovaler Körper zu differenzieren, der oft durch einen deutlichen, scharf abgegrenzten Hof vom übrigen Zellinhalt getrennt ist. Hat sich die Bildung der Spore in einer Zelle vollzogen, die infolge verhältnismäßig bescheidener Granuloseablagerung den Stäbchencharakter gewahrt hat, so erscheint die Spore als endständig gelagertes Gebilde, freilich nicht immer streng endständig, insofern noch Plasma zwischen freiem Ende und Spore vorhanden sein kann. Hat sich aber inzwischen oder von vornherein so reichlich Granulose abgelagert, daß die Zelle Clostridienform angenommen hat, so entwickelt sich gewöhnlich folgendes Verhalten.

Die Spore liegt dem einen Ende näher, sehr häufig mit ihrer Achse nicht parallel zur Zellachse, sondern in mehr oder minder starkem Winkel zu derselben. So kommt es, daß bei der Betrachtung im hängenden Tropfen, wenn es sich um noch bewegliche sporentragende Clostridien handelt, infolge der Rotation der Clostridien der täuschende Anschein entsteht, als ob sich die Spore beständig in einer weichen Inhaltsmasse des Clostridiums umherbewegte (s. Beijerinck).

Bei näherem Zusehen zeigt sich aber, insbesondere an solchen Exemplaren, die durch ihre Stellung im Verband die rotierende Bewegungsart erkennen lassen, daß die Spore ihre Stellung zum Clostridium nicht verändert. In manchen Exemplaren von Clostridien nimmt die Spore einen Platz nahe der Mitte des eiförmigen Gebildes ein, auch hier oft excentrisch gelagert. Der Sporenhof ist in den Clostridien oft besonders deutlich entwickelt.

Sporentragende Clostridien zeigen im ungefärbten Zustande häufig eine auffälligere grobe Plasmagranulierung.

Bei der Färbung mit Jod erscheint es als gewöhnliches Verhalten, daß die Spore samt Hof von dem granulosetragenden Plasma der Zelle mantelförmig umscheidet wird, derart, daß oft nur ein kleiner Abschnitt des Clostridiums, entsprechend dem aus dem Granulosemantel hervorragenden Sporenteil ungefärbt bleibt, ja oft grenzt sich bei mit Jod gefärbten Clostridien der granulosetragende Körper gegen die granulosefreie Spitze infolge dieses Verhaltens wallartig ab. In ungefärbten Präparaten sieht man von einer solchen Form der Abgrenzung nichts, es ist deshalb wahrscheinlich, daß es sich um ein Kunstprodukt, durch Anschwellen des Zellinhalts bei der Jodimprägnierung handelt.

Die allermannigfachsten Bilder entwickeln sich nun, wenn an Individuen im Verbands alle die bisher beschriebenen Veränderungen vor sich gehen. So beobachtet man häufig, daß von zwei verbundenen Stäbchen das eine zum Clostridium wird und eine Spore enthält, während das zweite nur Granulose ablagert. So entsteht oft, wenn die Individuen kurz und die Zellgrenzen schwer feststellbar sind, der Anschein eines Stäbchens mit endständiger Auftreibung samt Spore in diesem, während es sich um einen Stäbchen-Clostridiumverband handelt. Daneben finden sich selbstverständlich alle Übergänge von Stäbchen zu Clostridien, Verbände von Stäbchen oder Clostridien mit solchen Übergangsformen etc.

Zum Schlusse soll noch erwähnt werden, daß man auch gelegentlich, allerdings selten, in zuckerhaltigen Nährboden auf Präparate stößt, die den Vorgang der Granulosebildung in sehr

geringem Maße erkennen lassen, und trotzdem zahlreiche Stäbchen mit je einer bereits deutlich endständigen Spore zeigen. Hier handelt es sich also um Zurückbleiben der Granuloseanhäufung trotz fortschreitender Sporenbildung. Ja, es gelingt sogar mit Sicherheit auf sterilen Nährböden, die neben Spuren von Zucker natives Eiweiß enthalten, vollkommen granulosefreie, lebhaft versporende Vegetationen zu erhalten.

Wichtig erscheint es nun, zu verfolgen, wie sich im Verlaufe des Versporungsvorganges das Plasma der Zellen gegenüber Anilinfarben verhält.

Junge, granulosefreie Stäbchen färben sich leicht, intensiv und gleichmäßig mit diesen Farbstoffen. In Stadien, welche bei Jodfärbung Granulose an den einander zugekehrten Enden von Doppelstäbchen erkennen lassen, zeigen sich die Stäbchen an den freien Enden fast regelmäßig intensiver gefärbt, während der übrige Zellinhalt blasser, häufig leicht fleckig gefärbt erscheint.

In manchen Fällen ist die mit Anilinfarben (Fuchsin) stärker färbbare endständige Partie kappenförmig abgegrenzt.

Die Clostridien sind fast regelmäßig mit Fuchsin nur schwach tingierbar.

Sehr häufig findet man an dem einen Pole, seltener an beiden Polen, eine kappenförmig gestaltete, intensiv rot gefärbte Partie. Derart verhalten sich Clostridien, in denen im ungefärbten Präparat noch keine Spore erkennbar ist.

Färbt man sporenhaltige Clostridien mit Fuchsin, dann erhält man gewöhnlich eine noch schärfere Differenzierung, indem sich die ungefärbte Spore samt Hof scharf gegen den blaßrot gefärbten übrigen Zellinhalt abgrenzt. Auch hier zeigt sich häufig an dem der Spore entgegengesetzten Ende eine kappenförmig gestaltete, dunkler gefärbte Partie.

Der Geißelfärbung unterzogen, zeigen die beweglichen Buttersäurebacillen eine Anzahl von peritrichen Geißeln, und zwar 6—20 und mehr; in gut gefärbten Präparaten von Clostridien läßt sich deutlich erkennen, daß die Geißeln, unmittelbar sich verbreiternd, in die Hülle der Bakterienzelle übergehen. Die Thatsache, daß Clostridien gewöhnlich arm begeißelt sind, dürfte

auf einen mit der Formveränderung vor sich gehenden Verlust an Geißeln zurückzuführen sein.

Gegenüber der Färbung nach Gram verhalten sich die beweglichen Buttersäurebacillen sehr wechselnd. Junge, sporen- und granulosefreie Stäbchen bleiben nach Gram gefärbt, wenn man die Entfärbung mit Alkohol nicht allzulange fortsetzt. Granulose tragende Stäbchen, Clostridien sind gegenüber der Entfärbung sehr empfindlich, ein Teil wird rasch völlig entfärbt, andere bleiben fleckig oder körnig gesprenkelt. Berücksichtigt man den Umstand, daß die beweglichen Buttersäurebacillen an und für sich die Gramsche Färbung nicht sehr fest halten, überdies ihre Resistenz gegenüber dem Alkohol bei der Granulosedifferenzierung weiter abnimmt, dann erklären sich die sehr wechselnden Bilder in einfacher Weise.

Die freien Sporen der beweglichen Buttersäurebacillen sind oval, manchmal leicht unregelmäßig, bohnenförmig oder ähnlich gestaltet. Ihre Länge beträgt ca. 1,8—2,3 μ , ihr Querdurchmesser 1,3—1,7 μ .

In Präparaten, welche reichlich freie Sporen enthalten, sieht man häufig solche, welche noch in den zerfallenden Stäbchen stecken oder noch aus dem einen offenen, wie zerfaserten Ende der von der Mutterzelle dargestellten Hülle hervorragen.

Der Formenkreis, welcher auf Gelatinekulturen zur Beobachtung kommt, entspricht im ganzen und großen dem Bilde der Zuckeragarkulturen. Das wichtigste über die Sporenbildung wurde bereits eingangs mitgeteilt.

In älteren (10 Tage alten) Gelatinekulturen sieht man besonders reichlich lange Scheinfäden, welche mehr als 50 μ lang und entweder dünner, 0,5—0,8, oder (und dann meist unregelmäßig) dick und mit Granulose streckenweise erfüllt sind. Stäbchen und Scheinfäden bewahren in solchen alten, gut verschlossen aufbewahrten Gelatinekulturen lange Zeit ihre Beweglichkeit.

In alten Gelatinekulturen (44 Tage) sieht man oft folgendes Bild: Neben reichlichen granulosefreien Stäbchen und Scheinfäden, reichlich freie Sporen, Clostridien, dann Stäbchen, die an einem Ende etwas Granulose enthalten, nahe der Mitte eine Spore

(ohne Hof, wie denn überhaupt die Ausbildung des Sporenhofes sehr inconstant ist). Bei vielen Clostridien und granulosetragenden Stäbchen zeigt sich die Granulose in, oft in Reihen geordneten rundlichen Körnern, ja man sieht freie Haufen von solchen braunviolettgefärbten winzigen Körnchen, die oft noch durch die Form des Haufens erkennen lassen, daß sie ursprünglich in einem Clostridium, dessen Zellwand vollständig aufgelöst wurde, enthalten waren.

Stärkeagar verhält sich hinsichtlich Granulosebildung und Versporung nicht wesentlich anders als Zuckeragar. Eine Reihe von Versuchen, die darauf angestellt wurden, ob der von Haus aus im Nährboden vorhandene Alkaleszenzgrad auf die Versporung von Einfluß sei, zeigte, daß zwar anscheinend einigemale in alkalischen Nährböden Granulosebildung und Versporung besser vor sich gingen, doch liefs sich keine konstante Beeinflussung durch willkürlich abgestufte Alkaleszenz erkennen, wie dies für den unbeweglichen Buttersäurebacillus zutraf.

Flüssige Nährböden, insbesondere zuckerreiche, bilden hinsichtlich Granulose-Entwicklung und Versporung auch bei Kreidezusatz an sich kein besonders geeignetes Substrat, wenn nicht besonders hartnäckig sporulierende Vegetationen verimpft wurden (die bloße Aussaat von Sporen genügt nicht!). Man findet sehr häufig, z. B. in Milch oder in Zuckerbouillon mit Kreide, welche, mit Reinkultur geimpft, wochenlang in Gärung war, nur wenige granulosetragende Stäbchen und oft fehlen Sporen vollständig. Dieses Verhalten bezieht sich, was hier besonders hervorgehoben werden soll, allerdings nur auf Reinkulturen im strengen Sinne. Sehr reichlich findet man in solchen flüssigen Kulturen kommaförmige oder s-förmig gekrümmte, mit Jod und Anilinfarben schlecht färbbare, granulosefreie Stäbchen mit körnigem Plasma und Verbände von solchen.

Auf Kartoffeln wachsen die beweglichen Buttersäurebacillen, wie schon erwähnt, gut an, und entwickeln sich auf diesem Nährboden reichlich Granulose und Sporen. Eine besondere Neigung zur Bildung abnormer Formen dieser Bakterienart, scheint diesem

Nährboden nicht zuzukommen (vgl. den unbeweglichen Buttersäurebacillus).

Ganz auffällige Neigung zur Bildung reichlicher Mengen von Granulose und Sporen zeigt sich oft in Kulturen (und hier sind es gerade zucker- oder stärkereiche flüssige Nährböden), in welchen neben dem beweglichen Buttersäurebacillus noch andere Bakterienarten, aërobe oder anaërobe zur Entwicklung gelangen. Es gelingt nicht regelmäÙig, durch künstliches Zusammengeben von Reinkulturen die Bedingungen für diese besondere Granulosebegünstigung zu erzielen. Einmal scheinen nicht alle Bakterienarten in gleichem Grade hiezu geeignet zu sein, dann hängt aber das Gelingen offenbar auch davon ab, in welchem Verhältnis die beiden Bakterien von vornherein vorhanden sind, resp. im Verlaufe der ersten Vegetation zur Entwicklung kommen. Aus zahlreichen Experimenten geht weiters hervor, daß sich diese Beeinflussung des Versporungsvorganges durch Symbiose vor allem darin bemerkbar macht, daß bei der Reinzüchtung aus Bakteriengemischen, insbesondere dann, wenn aus flüssigen Nährböden Zuckeragarplatten gegossen werden, die auf den Platten zur Entwicklung kommenden Kolonien sehr häufig sporenarm sind, ja daß die Generationen, welche von solchen sporenarmen Kolonien weiterhin unter verschiedensten Verhältnissen angelegt werden (auf flüssigen und festen Nährböden) oft geringe Neigung zur Versporung beibehalten. Ist das Versporungsvermögen noch nicht völlig verloren gegangen, so lassen sich durch reichliches Überimpfen von Material, z. B. in Zuckeragar, und bei mehrmaliger Wiederholung des Vorganges unter fortlaufender mikroskopischer Kontrolle und Auswahl sporenreicher Vegetationen zur Weiterimpfung Vegetationen erzielen, die ihrerseits wieder unter Umständen die Neigung zur Versporung mehr oder minder hartnäckig festhalten, ja selbst unter Verhältnissen, die sonst der Versporung ungünstig sind. Bei diesem Wiederanzüchten von Neigung zur Versporung macht es keinen Unterschied, ob man in dem Material, das man zu Überimpfungen verwendet, die vegetativen Formen durch Erhitzen abtötet oder nicht. Berücksichtigt man die oben mitgeteilte Thatsache, daß bei der Reinzüchtung oft zunächst

Vegetationen mit geringer Neigung zur Versporung entstehen, das ferner durch geeignete Züchtung Neigung zur Versporung erworben, bezw. verloren gehen kann, das überdies die einzelnen Stämme, die man in Reinkultur erhält, sich in der genannten Richtung, je nach den Bedingungen, unter welchen die vorausgegangenen Generationen gestanden waren, graduell sehr verschieden verhalten, so wird es leicht verständlich erscheinen, das man bei der Differenzierung von Racen etc. der Buttersäurebacillen gar nicht genug vorsichtig sein kann.

Ebenso wird es auch angezeigt erscheinen, bei der Beurteilung des Einflusses, welchen verschiedene Nährbodenzusammensetzung und Wachstumsbedingungen auf kulturelle und morphologische Erscheinungen äußern, sehr skeptisch zu sein, da diese Bedingungen oft weniger ins Gewicht fallen als der eben vorhandene ererbte Zustand der überimpften Generationen.

In Mischkulturen kommt es nun besonders oft zu einer Form excessiver Einlagerung von Granulose, wie wir sie in Reinkulturen bisher nur in Zuckergelatinen und auch dann nur recht selten beobachten konnten.¹⁾ Das Charakteristische besteht hier darin, das in der freien Spore Granulose nachweisbar ist.

Wir wollen in folgendem die Bilder beschreiben, wie wir sie an einem fortlaufend beobachteten Stärkebouillonkolben, der mit *B. sacharobuty.* Klecki und einem sehr zarten anaëroben Bacillus mit Köpfchen-Sporen geimpft worden war, wahrnahmen.

Alle die Bilder, welche hier in der Reihenfolge der Entwicklung geschildert werden, fanden sich auch in zwei Gelatine-reinkulturen der beweglichen Buttersäurebacillen, überdies war durch die charakteristischen morphologischen Verhältnisse der künstlich zugesetzten fremden Art jede Verwechslung ausgeschlossen:

Bereits 14 Stunden nach der Impfung lebhafte Gärung mikroskopisch neben den schlanken Stäbchen der fremden Art, sehr reichlich Individuen des Kleckischen Bacillus. Letztere ausschließlich in der Clostridiumform. Clostridien sehr dick.

1) In neuester Zeit konnten wir bei allen Stämmen auch in Reinkultur das Vorkommen dieser Erscheinung feststellen.

Bei Jodfärbung zeigt sich in fast allen Clostridien das typische Bild der Granuloseansammlung mit Freilassung eines scharf abgegrenzten ovalen Raumes an einem Pole der Zelle. In diesem granulosefreien Raume ist central ein mit Jod blau gefärbtes kleines Korn sichtbar. In einigen Clostridien ist bereits die junge Spore zu sehen. In diesem Falle zeigt sich, daß das kleine Granulosekorn in das Innere der Spore selbst zu liegen kommt.

Die mikroskopischen Präparate, welche aus den Kolben in den nächsten 24 Stunden angefertigt wurden, zeigten im wesentlichen dasselbe Bild, am dritten Tage waren aber bereits reichlich freie Sporen sichtbar und die meisten derselben, oval und regelmäßig geformt, von entsprechender Größe zeigten im Innern (bei Jodpräparaten) je ein deutlich abgegrenztes blaues Körnchen. Dieses Granulosekorn ist in vielen Sporen ganz central gelagert, in anderen etwas excentrisch, immer läßt sich erkennen, daß es in der Spore selbst liegt. Das Körnchen ist, soweit sich bei der Kleinheit des Gebildes erkennen läßt, entweder rundlich oder unregelmäßig umrandet. Bei der Betrachtung im ungefärbten Präparat zeigen sich die Sporen von normalem Glanz, gegenüber Anilinfarben verhalten sie sich wie gewöhnliche Sporen, insbesondere erfolgt hier auch bei gewöhnlicher Färbung im Centrum keinerlei Farbstoffaufnahme. Eine Prüfung der Resistenz wurde wegen der gleichzeitigen Gegenwart anderer, normaler Sporen nicht vorgenommen.

Auffallend erscheint es, daß in diesen Fällen bei der bekannten Widerstandsfähigkeit gegenüber Färbung Sporen so leicht das Jod in das Innere eindringen ließen.

Die Sache liegt hier wohl so, daß das Jod überhaupt die Sporenmembran leichter durchdringt als dies Anilinfarben thun, und hier bei dem Vorhandensein einer mit Jod charakteristisch färbbaren Substanz in der Spore besonders zur Geltung kommt.

Ich stehe nicht an, diesen Versporungsvorgang¹⁾ als einen abnormen, krankhaften zu bezeichnen, wie denn auch die charakteristische Überproduktion von Granulose als eine erbliche

1) Es hat den Anschein, als ob bei der gewöhnlichen Clostridienversporung alles darauf ankommt, daß der granulosefreie Teil des Plasmas

Erkrankung der Buttersäurebacillen anzusehen sein dürfte, von der diese so oft befallen werden, wenn sie sich zur Versporung anschicken.

Besonders bemerkenswert sind weiterhin auffällig kleine, oft kreisrunde, granulose-erfüllte Gebilde, die bei gleichzeitiger reichlicher Versporung dann zur Beobachtung kamen, wenn den zuckerhaltigen Flüssigkeiten nennenswerte Mengen von inaktiver Milchsäure bzw. milchsaurem Kalk von vornherein zugesetzt wurden. Die Untersuchungen über diesen Gegenstand sind noch nicht abgeschlossen, doch kann es nach den bisherigen Befunden keinem Zweifel unterliegen, daß — in Analogie zu sichergestellten ähnlichen Beobachtungen bei Stämmen, die zur Gruppe des unbeweglichen Buttersäurebacillus gerechnet werden müssen — die Gegenwart von Milchsäure hier eine besondere Rolle spielt.

Was die Widerstandsfähigkeit der Sporen¹⁾ des beweglichen Buttersäurebacillus vom Amylobaktertypus gegen Erhitzen betrifft, so konnten wir in einer Reihe von Versuchen feststellen, daß dieselben ihre Lebensfähigkeit bereits nach drei Minuten langem Aufenthalt im 100° Dampf einbüßen, sie erscheinen demnach bedeutend weniger resistent als die Sporen des unbeweglichen Buttersäurebacillus. Weitere Untersuchungen sollen feststellen, ob den unter verschiedenen Bedingungen (Versporung mit oder ohne Granulose etc.) entstandenen Sporen eine verschieden hohe Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen zukommt.

sich möglichst frühzeitig und scharf von dem mit Granulose beladenen Restplasma sondert, während hier der Plasmaanteil, welcher sich zur Sporenanlage differenziert, bereits in diesem Zeitpunkt mit einem nicht mehr austofsbaren Anteil von Granulose behaftet ist.

1) Die angeführten Versuche wurden mit Sporen aus Zuckergelatinekulturen angestellt.

Erklärung der Lichtdrucktafeln.

Die vorliegenden Abbildungen sollen in möglichst vollständiger Weise einen Überblick über den Formenkreis des beweglichen Buttersäurebacillus vom Typus des Amylobakter bringen. Vorausgeschickt soll werden, daß sämtliche Präparate von strengen Reinkulturen angefertigt wurden mit Ausnahme des Bildes Nr. 6 (s. u.). Es wurde überdies kein Bild in die Tafeln aufgenommen, das sich nicht bei sämtlichen untersuchten Stämmen durch geeignete Züchtung hervorrufen liefs. Um jedoch anderseits die Pleomorphie des einzelnen Stammes zum Ausdruck zu bringen, wurden fast für alle Bilder Präparate verwendet, die aus Kulturen des Gruberschen Originalstammes angefertigt wurden. Die absolute Reinheit der Kulturen erscheint dadurch garantiert, daß immer wieder von einzelnen Kolonien des Originalstammes oder dessen Abkömmlingen ausgegangen wurde. Dabei wurde es sogar vermieden, von Gasblasen mit Randinfiltration abzuimpfen.

Fig. 1 zeigt uns das mikroskopische Bild einer 20stündigen, kräftig gewachsenen Kultur des Amylobakter auf Zuckeragar, wie es außerordentlich häufig zur Beobachtung kommt, wenn man Stämme verwendet, die nach der Behandlung, welche frühere Generationen erfuhren, ihre Neigung zur Versporung verringert haben. Das Präparat ist vorsichtig fixiert, mit Lugolscher Lösung gebadet und liegt bei der photographischen Aufnahme in derselben Lösung. Die ausgesprochen dunklen Partien entsprechen solchen, welche sich mit Jod violett bis blau färbten.

Man sieht die Stäbchen (häufig Doppelstäbchen) mit Granulose gefleckt, sehr ungleich dick, auch Stäbchen, die keine charakteristische Jodfärbung annehmen, zeigen Unregelmäßigkeiten im Plasma, sie färben sich überdies mit Jod sehr wenig gelb. Schon finden sich einzelne Übergänge zu Clostridien.

Fig. 2 zeigt denselben Stamm auf demselben Nährboden, ebenfalls 20 Stunden alt, jedoch mit anderer Vorgeschichte (insofern die früheren Generationen wiederholt auf Zuckerbouillon reichliche Clostridien gebildet hatten und von einer solchen Zuckerbouillon zuletzt auf Zuckeragar abgeimpft wurde).

Hier finden sich bereits ausgesprochene Clostridien, auch solche, die eine deutlich ausgebildete Spore tragen. Die Neigung zur Bildung von Scheinfäden, sowie zur Bildung von in Ketten gereihten kurzen, vollständig mit Granulose erfüllten Formen ist bemerkenswert.

Fig. 3 und 4 zeigen Präparate aus einer und derselben Kultur (Zucker-gelatine 3 Tage, s. Fig. 14). Fig. 3 gibt das Bild des in Lugolscher Flüssigkeit, Fig. 4 dasjenige des in wässriger Fuchsinlösung eingebetteten Präparates. Hier sieht man fast nur Clostridien, die Granulose erfüllt den einen Teil der Zellen, das mit Fuchsin gut färbbare Plasma (Fig. 4) nimmt das Ende der Zellen in Beschlag. Die Ausbildung der Spore ist noch nicht erfolgt (in solchen Kulturen bleibt oft der größte Teil der Clostridien auf diesem Stadium stehen).

Fig. 5 zeigt das Bild einer Reinkultur des *B. s. Klecki* auf Zucker-gelatine (5 Tage), welche sich durch eine überaus reichliche Granulosebildung auszeichnet; hier ist es fast in allen Clostridien zur Bildung eines Granulose-kornes im Sporenteil des Plasmas gekommen. Dies führt unter geeigneten Verhältnissen zu merkwürdigen Bildern. Die freien Sporen nehmen in einer central oder mehr peripher gelagerten Partie Jodfärbung an.

Präparat 6, welches derartige Sporen in besonders reichlicher Zahl aufweist, entstammt einem Kolben (siehe Text der Abhandlung), der mit *B. s. Klecki* und einem sehr zarten anaëroben *Bacillus* geimpft war. Die Stelle rechts unten verrät die Anwesenheit dieses Stäbchens, sie zeigt zugleich (Vergrößerung = 2000!) die Feinheit desselben.

Die Versporung ist nicht unbedingt mit Granulosebildung verbunden, oder, richtiger gesagt, es muß nicht stets im Verlaufe der Versporung Granulose nachweisbar sein. Dies zeigt Fig. 7 (*Amylobakter* auf sehr zucker armem Nährboden mit leicht angreifbarem, nativem Eiweiß, 20 Stunden). Das Jodpräparat zeigte (hier nicht abgebildet) nirgends Granulose, das Präparat ist nach Gram gefärbt, eine weitgehende Pleomorphie hinsichtlich Lage der Spore und Gestalt der versporenden Stäbchen ist unverkennbar, beachtenswert ist die verschieden intensive Färbung der Stäbchen, der Besitz von Kapseln. Wie anders verläuft hier die Versporung im Vergleich zu Bild 2! Dort fast völlige Scheidung des Zellinhalts in Plasma und Granulose, hier dagegen bildet sich die Sporenanlage inmitten des noch gut färbbaren Zellplasmas, ja selbst bei reifer Spore ist der übrige Teil des Zellinhalts mit Anilinfarben intensiv färbbar. (Diese granulosefreie Versporung konnten wir mit absoluter Sicherheit bei allen Stämmen nachweisen.) Überimpft man von dieser Kultur auf Zuckeragar (Bild 8, 20stündige Kultur, Gram), so bilden sich reichlich Clostridien.

Wie verhalten sich die extremen Degenerationsformen clostridienreicher Vegetationen? Fig. 9 zeigt uns Centrifugenrückstand einer 2 Tage alten Zuckerbouillon von *Amylobakter* Gruber, abenteuerlich gequollene, mit Granu-

lose vollgestopfte Gebilde, daneben reichlich mit blaufioletten, feinsten Körnern gefüllte Clostridienschatten, überdies reichlich zerfallende Stäbchen und detritus, auch freie Sporen.

Gelingt es etwa regelmäßig, durch Übertragung in zucker- (bezw. stärke- etc.)freies Medium granulosefreie Versporung zu erhalten?

Fig. 11 zeigt den Effekt einer solchen brüskten Übertragung in Bouillon (gewöhnl. Zusammensetzung), nach 6 Stunden centrifugiert. Die Ausgangskultur entsprach etwa dem Bilde 4. Massenhafte Kettenbildung, mit ganz kurzen Elementen, zum Teil mit Granulose vollgestopft (rasche Zellteilung und Vorhandensein durchwegs degenerativer Individuen gehen hier parallel!). Von dieser Kultur wurde auf Agarplatte (ohne Zucker) oberflächlich geimpft, dieselben wurden sofort in den Botkinschen Apparat (siehe Archiv Bd. 37) gebracht, stürmisch Wasserstoff durchgeleitet etc., nach 20 Stunden oberflächliche Rasen, das Präparat Fig. 12 (in wässriger Fuchsinlösung) zeigt regelmäßige Formen, das Plasma jedoch leicht fleckig, dabei ist mit Jod keine Granulose nachweisbar. Solche granulosefreie Vegetationen kommen in anderer Form zu Gesicht, selbst bei Gegenwart von Zucker, wenn man ganz junge Bouillonkulturen oder noch besser die eben besprochenen jungen Rasen sofort nach dem Herausnehmen aus den anaëroben Behältern auf tadellos ausgekochte und erstarrte Zuckergelatine überimpft. Siehe Fig. 10 (4 Tage alte Zuckergelatinekultur vergl. Bild 20). Die Vegetationen sind mit Fuchsin zum großen Teil gut färbbar, im extremen Falle granulosefrei, sie zeigen aber Wachstum in Scheinfäden.

Geht man wiederholt in der bei Beschreibung von Fig. 12 geschilderten Weise vor (diese Versuche stammen aus der jüngsten Zeit), so gelingt es mühelos, die regelmäßigsiten und schönsten, vollkommen granulosefreien Stäbchen zu erzielen, die Präparate lassen Scheinfäden fast vollkommen vermissen. Die Stäbchen sind ganz außerordentlich lebhaft beweglich, ihre Bewegung im hängenden Tropfen hält oft durch länger als eine Stunde an, nicht weil sie eine besondere Form des B. sind, sondern weil sie am lebenskräftigsten sind. Die nach der Ermenghem'schen ausgezeichneten Methode angefertigten Geißelpräparate zeigen den Geißelreichtum dieser Stäbchen, für ihr gesundes Plasma spricht die außerordentlich leichte Beizbarkeit der Bakterienleiber. (Clostridien sind arm begeißelt, auch das Plasma schwer beizbar.) Man kann entweder durch Modifikation der Beizen und Färbemittel oder durch Auswahl von Nährböden und Züchtungsverfahren, welche Bakterienzellen mit normalem Plasma garantieren, gute Geißelpräparate erzielen. Der letztgenannte Weg scheint mir der sicherere.

Kommen diese Extreme: einerseits Fig. 21 bzw. 12, 10 — andererseits 3, 4, 9 auch im Bilde der Kulturen zum Ausdruck? Diese Frage entscheidet das Aussehen der Vegetationen auf Zuckergelatine. Reichliche Clostridien finden sich in Zuckergelatine-Kolonien (anaëroben Platten), die Fig. 13, 14 u. 15 entsprechen (Zuckergelatinstich Fig. 18); solche Kolonien färben sich mit Jod intensiv schwarz. In Fig. 16 resp. 19 sind Vegetationen zu sehen, in welchen spontan der Charakter der Kulturen sich zu ändern beginnt, es dringen korkzieherförmige Ausläufer in die Gelatine ein. Fig. 20 und 17

endlich entsprechen den rasch beweglichen, granulosefreien Stäbchen, die in die Gallerte stürmisch einwachsen. Fig. 20 entspricht einer 2 Tage (!) alten Zuckergelatine-Stichkultur (abgeimpft von Kultur siehe Bild 21).

Besonders charakteristisch ist die Zuckergelatineplatte Fig. 17. Man sieht reichlich Gasblasen (die lichthofschleierfreie Platte hat für die Darstellung hier leider etwas zu gut gearbeitet) und um diese eine schleierartige Trübung, das ist die Vegetation.

Fig. 27 zeigt das Aussehen der Milchkulturen (viele Wochen alte Kultur). Das Caseiningerinnsel ist vollkommen aufgelöst.

Fig. 25 zeigt eine tiefliegende Kolonie in Zuckeragar (20 Stunden alte Zuckeragarplatte). Fig. 26 eine ebenso alte Kolonie in zuckerfreiem Agar (Aussaat: erhitztes Sporenmateriale). Fig. 24 zeigt eine Stelle aus dem Präparat Fig. 8 bei 2500facher Vergrößerung. Man sieht in zahlreichen Clostridien, wabige Räume begrenzende Plasmastränge. In diesen Hohlräumen liegen die (hier ungefärbten) Granuloseballen, ein Verhalten, das ebenso bei der weiterhin auftretenden Lösung der Granulose in der Lagerung der einschmelzenden Granuloseballen zum Ausdruck kommt. Das Plasma der normalen, granulosefreien Zellen zeigt im extremen Fall keinerlei Differenzierung.

Überblickt man die vorliegenden Tafeln, so läßt sich am besten durch Kombination einer Anzahl von Bildern ein Einblick in den merkwürdigen Formenkreis des Amylobakter gewinnen. Will man ihn in seinem granulosefreien Entwicklungsgang verfolgen, so reihe man Fig. 21 (22—23), 17, 20, 10, 7 aneinander, im anderen Falle (Versporung mit Granulose) Bild 1, 3, 4, 9, 13—15, 18.

Die Photogramme habe ich im Vereine mit Herrn Universitätslehrer Hinterberger in dessen musterhaft eingerichtetem Privatlaboratorium angefertigt.

Fig. 1—5, 7—12, 21—23 Vergr. = 1000,

Fig. 6 Vergr. = 2000,

Fig. 24 Vergr. = 2500,

Fig. 13—16 Vergr. = 14,

Fig. 25 und 26 Vergr. = 21,

Fig. 18, 19, 20, 27 Vergr. = 1 $\frac{1}{2}$,

Fig. 17 natürliche Größe.

B. Biologisches Verhalten und Verbreitung des beweglichen Buttersäurebacillus.

Von Dr. A. Schattenfroh,
Assistent am Institute.

Im ersten Teile dieser Abhandlung wurden die verschiedenen Formen des beweglichen Buttersäurebacillus, wie sie im Verlaufe der Versporung und im sporenfreien Entwicklungskreise zur Beobachtung kommen, ausführlich beschrieben, es wurde auch hervorgehoben, daß derselbe ein streng anaërobes Bakterium ist und stets, auch bei völligem Sauerstoffmangel des Mediums, Eigenbewegung zeigt.

Es erübrigt noch, über sein sonstiges biologisches Verhalten, insbesondere aber über die Zersetzungen zu berichten, die er durch seine Gärthätigkeit in den Kulturflüssigkeiten bewirkt.

Was die zum Gedeihen des beweglichen Buttersäurebacillus notwendige Temperatur betrifft, so wäre hervorzuheben, daß die Grenzen, innerhalb deren seine Entwicklung möglich ist, ziemlich weit gezogen sind. Er vermehrt sich zwar am üppigsten — auch die Gärerscheinungen sind hier am stürmischesten — bei Bruttemperatur, doch findet er auch — günstige Nährbedingungen und strenge Anaërobiose vorausgesetzt — bei wesentlich niedrigeren Temperaturen sein Auskommen. Wir sahen sogar im Kühlschrank bei ca. 10° C. und darunter ein wenn auch verzögertes und langsames Wachstum desselben bei gleichzeitiger Vergärung des Substrates — ein Verhalten, das wir in der letzten Zeit auch bei zur Gruppe des unbeweglichen Buttersäurebacillus gehörigen Stämmen konstatieren konnten.

Während nun die bei niedriger Temperatur langsam angewachsenen Kulturen — stets dauernd anaëroben Verschlufs vorausgesetzt — langé übertragungsfähig bleiben, sind die bei höheren Temperaturen rasch und üppig gewucherten Generationen gewöhnlich wenig widerstandsfähig und gehen oft schon in wenigen Tagen zugrunde. Dies konnten wir besonders häufig bei Zuckeragarplatten beobachten, deren Kolonien, wenn die Kulturen mehrere (2—4) Tage alt waren, meist nicht mehr überimpfbar waren. Besser konservierten sich die Zuckeragarstich- und Bouillonkulturen, doch war auch in solchen Kulturen, selbst dann, wenn Sporen gebildet waren, die Lebensdauer der Vegetationen keine sehr lange, wenn nicht für besonders exakten Abschluss des Luftsauerstoffs gesorgt war. In solchen Fällen — z. B. behufs Aufbewahrens der Stämme — wendeten wir auch stets die Grubersche Evacuationsmethode an, die die einzige ist, bei welcher unbegrenzte Zeit die Kulturen sauerstofffrei bleiben.

Der bewegliche Buttersäurebacillus stellt gewisse Anforderungen an die Zusammensetzung des Nährsubstrats, so dafs er durchaus nicht in allen gebräuchlichen Nährböden wächst. Vor allem ist für ein lebhaftes Wachstum desselben die gleichzeitige Anwesenheit von organischen, stickstoffhaltigen Substanzen, unter denen er die Eiweifsstoffe bevorzugt, und löslichen, vergärbaren Kohlehydraten unerläfslich. So wie der »unbewegliche« Buttersäurebacillus vermag er in kohlehydratfreien Nährlösungen, wie Peptonbouillon, nicht oder nur kümmerlich zu wachsen, ebenso wie er in »künstlichen Nährlösungen«, die nur anorganischen Stickstoff enthalten, selbst bei Anwesenheit von Kohlehydraten nur ausnahmsweise die Bedingungen zur Entwicklung findet; wir sahen ein einzigesmal in Uschinskyscher Lösung, die 2% Traubenzucker enthielt, eine kurzdauernde Vermehrung desselben eintreten¹⁾, meist blieben jedoch die Versuche, ihn in so einfachen Medien zu züchten, erfolglos.

1) Betont soll werden, dafs die ausgeführten Verhältnisse für die Reinkultur des Buttersäurebacillus gelten.

Der bewegliche Buttersäurebacillus ist ein echter Gärungs-erreger. Gleichzeitig mit seinem Wachstum in den Nährlösungen wie auf den festen Nährböden kommt es daher zu intensiven Zersetzungen in denselben, die sich jedoch entsprechend der schon früher gegebenen Definition des Begriffes »Buttersäuregärung« auf die Kohlehydrate beschränken. Die Eiweißkörper, deren er zum Aufbau des Leibesplasmas so dringend bedarf, greift der bewegliche Buttersäurebacillus in ausgiebigerem Maße nicht an, so daß es in seinen Kulturen niemals zu tiefergreifenden Veränderungen derselben kommt. Man vermifft daher in den Gärflüssigkeiten auch alle jene Stoffe, die auf Eiweißfäulnis deuten, ebenso wie die sinnfälligen Erscheinungen derselben (s. w. u.).

Von Kohlehydraten vergärt der bewegliche Buttersäurebacillus Mono- und Disaccharide, ebenso Stärke, während er Cellulose nicht angreift. Neben den Kohlehydraten unterliegen dann noch eine Reihe verwandter Stoffe seiner Gärung, so insbesondere das Glycerin, das er viel leichter angreift und zersetzt, als beispielsweise der stammverwandte unbewegliche Buttersäurebacillus.

Mannit blieb in unseren Versuchen unzersetzt, doch möchten wir mit einem endgiltigen Urteile über diesen Punkt bei der kleinen Zahl derselben und im Hinblick auf die positiven Resultate Beijerincks zurückhalten, indem es möglich wäre, daß in unseren Versuchen die günstigen Bedingungen zum Zustandekommen dieser Gärung fehlten.

Milchsaure Salze werden von seiner Reinkultur nach unseren bisherigen Erfahrungen gleichfalls nicht angegriffen, wenngleich eine Beeinflussung des Formenkreises, hauptsächlich in Bezug auf das Eintreten der Versporung und das Aussehen der granulose-führenden Individuen, zweifellos konstatiert werden konnte (s. I. T.).

Wir sind übrigens noch mit Studien über diesen Punkt beschäftigt und gedenken später noch einmal darauf zurückzukommen, wenn wir die Gärungserreger der Milchsäure beschreiben.

Die Untersuchungen der Gärprodukte nahmen wir in ähnlicher Weise vor, wie wir es in unserer ersten Abhandlung

beschrieben haben. Wir versetzten demnach Fleischwasser, Peptonbouillon oder »künstliche Nährlösung«, die einen Zusatz von Pepton erfahren hatte, mit den zu untersuchenden Substanzen in solchen Mengen, daß Konzentrationen von 2—4 % resultierten (s. Protokolle) und nahmen die Verarbeitung des Materiales eine bis mehrere Wochen nach der Aussaat im wesentlichen nach derselben Vorschrift vor, die wir früher eingehalten hatten. Es wurde dementsprechend auf flüchtige und nichtflüchtige Säuren, auf Alkohole, auf Zersetzungsprodukte der Eiweißstoffe geprüft, und gegebenenfalls wurden diese Stoffe quantitativ bestimmt; weiters wurden gelegentlich die bei der Gärung stets reichlich gebildeten Gase nach der exakten Analyse untersucht.

Hierbei stellte sich nun heraus, daß aus Dextrose, Saccharose und Laktose, sowie aus Stärke (verkleistert und in löslicher Form) und Glycerin regelmäÙig Buttersäure, Milchsäure, Kohlensäure und Wasserstoff gebildet werden.

Alkohole, die von manchen Autoren als konstantes Gärprodukt des beweglichen Buttersäurebacillus gefunden wurden — es handelte sich im wesentlichen hierbei stets um Butylalkohol — fanden wir ein einziges Mal in gröÙerer Menge bei der Analyse der Gärprodukte eines frisch aus Erde gezüchteten Stammes vor, wobei sich beim Absättigen des Destillats mit Pottasche etwa 4 ccm eines bei 118° C. übergelenden Alkohols abschieden; wir waren jedoch nicht imstande, bei mehrfacher Wiederholung des Versuchs ein gleiches Resultat zu erzielen.

Das Mengenverhältnis der gebildeten Gärprodukte ist kein konstantes, sondern hängt von einer Reihe von Einflüssen ab. Wenngleich bei den Gärungen des beweglichen Buttersäurebacillus — im Gegensatz zur unbeweglichen Art — stets verhältnismäÙig groÙe Mengen von Buttersäure gebildet werden, was zunächst hervorgehoben werden soll, ist doch innerhalb gewisser Grenzen das Verhältnis der Buttersäure und Milchsäure zu einander ein recht wechselndes, indem von letzterer bald nur kleine Mengen, bald ansehnliche Quantitäten gebildet werden. In den meisten Fällen entstehen aus den Kohlehydraten durch den beweglichen Buttersäurebacillus zwar gröÙere Mengen

von Buttersäure als Milchsäure, doch sehen wir ausnahmsweise das Verhältnis von Buttersäure und Milchsäure sich umkehren, so daß neben beträchtlichen Mengen von Milchsäure nur kleine Mengen von Buttersäure gebildet werden.

Diese aufsergewöhnlichen Befunde entziehen sich vollständig einer zutreffenden Erklärung, wie überhaupt zugegeben werden muß, daß wir nur einen Teil der Einflüsse kennen, welche für den Ausfall der Gärung bedeutungsvoll sind. So ist es zweifellos, daß der Milchzucker zum größten Teile in Buttersäure übergeführt wird und nur ein sehr kleiner Rest desselben zu Milchsäure vergärt. Ganz besonders tritt dies in Milchkulturen hervor, in denen wir nur ausnahmsweise Spuren von Milchsäure nachweisen konnten.

Es ist dies wieder ein übereinstimmendes Verhalten beider bisher beschriebenen Buttersäurebacillen, daß von ihnen in Milch absolut und relativ die größten Mengen Buttersäure gebildet werden.

Die übrigen untersuchten Zucker, sowie die Stärke zerfallen in Buttersäure und Milchsäure ohne gesetzmäßige Regelmäßigkeit in dem Mengenverhältnisse der Säuren. Wir haben daher auch in diesem Falle von dem Aufstellen einer Gärungsgleichung Abstand genommen und registrieren einfach die Thatsache.

Beide Säuren entstehen nach unserer Auffassung aus dem Zucker direkt; daß Buttersäure durch nachträgliche mehr oder minder vollständige Vergärung der Milchsäure in statu nascendi zustande kommt, ist uns unwahrscheinlich, da Milchsäure, den Nährböden zugesetzt, wie schon erwähnt, vom beweglichen Buttersäurebacillus anscheinend nicht angegriffen wird.

Die Modifikation der Milchsäure ist bei den einzelnen Racen des beweglichen Buttersäurebacillus eine verschiedene, indem von einer Reihe von Stämmen inaktive, von anderen Rechts-Milchsäure gebildet wird. Es scheint dies, soweit unsere Beobachtungen reichen, konstant zu sein, wenigstens konnten wir Ausnahmen nicht konstatieren. Die einzelnen Stämme entsprechend der Modifikation der Milchsäure voneinander zu

trennen, ist uns nicht gelungen, so daß wir das diesbezüglich abweichende Verhalten derselben nur als eine Stammeseigentümlichkeit ansehen können.

Über die Milchkultur hätten wir noch einiges zu bemerken. Vor allem, daß nicht alle untersuchten Stämme sich in diesem Nährboden gleich verhielten. Alle jene, welche wir nach Botkins Vorschrift in Milch angereichert hatten, zeigten in derselben auch in Reinkultur das typische Bild, wie wir es für den unbeweglichen Buttersäurebacillus beschrieben haben: Stürmische Gasbildung, Gerinnung des Caseins und Entführung des Coagulums an die Oberfläche durch die entweichenden Gase. Andere Stämme, die wir auf andere Weise isoliert hatten (s. u.) wuchsen aber langsamer in Milch an, in ganz vereinzelt Fällen blieb die geimpfte Milch steril, oder das Wachstum der eingesäten Bakterien stand, bevor es noch zu sinnfälligen Veränderungen der Milch gekommen war, still. Wenn Wachstum in Milch eingetreten war, blieb das Caseingerinsel andauernd ungelöst; die beweglichen Buttersäurebacillen produzieren daher in Milch ebensowenig wie ihre unbeweglichen Verwandten peptonisierende Enzyme. Dies ergab sich außer der makroskopischen Betrachtung der Milchkultur auch noch aus dem Stickstoffgehalt der Molke (nach Kjeldahl bestimmt); derselbe erhob sich auch in alten Kulturen nicht über 0,13 % und blieb vom Tage der Ausfällung des Caseins an konstant.

Dem Fehlen der peptonisierenden Enzyme entsprechend, konnten auch Phenol, Indol, Schwefelwasserstoff und Ammoniak in der Molke nicht nachgewiesen werden, so daß weitergehende Zersetzungen des Milcheiweißes wohl füglich ausgeschlossen sind. Weiter wahrscheinlich machen konnten wir dies durch die Konstatierung der Thatsache, daß der bewegliche Buttersäurebacillus — wir konnten für den unbeweglichen den Versuch nachholen — in reinen Caseinlösungen trotz reichlicher Aussaat nicht wächst.

Die in Milch gebildeten Gärprodukte sind daher ebenso wie beim unbeweglichen Buttersäurebacillus zum überwiegenden Teile aus dem Milchzucker entstanden. Eine vollständige Zersetzung

desselben konnte jedoch niemals beobachtet werden; stets blieb ein Rest von mindestens $2\frac{1}{2}\%$ noch nach Wochen unvergoren.

Der bewegliche Buttersäurebacillus bildet in den Kulturen diastatische Enzyme. Doch stiefs der Nachweis auf gröfsere Schwierigkeiten, und wir können heute nur die regelmäfsige Bildung von Amylase behaupten, während die Sucrase trotz aller Bemühungen nur ein einziges Mal — und da nicht völlig einwandfrei — nachgewiesen werden konnte.

Die Technik dieser Versuche soll bei einer späteren Gelegenheit besprochen werden.¹⁾

Ob Milchzucker invertierende Enzyme bei der Gärung in Milch entstehen, haben wir nicht näher untersucht; jedenfalls aber ist in solchen Kulturen, wie die Gärprobe mit Dextrosehefe ergab, keine Dextrose gebildet.

Labenzyme entstehen, wie zu erwarten, in den Milchkulturen nicht; die Gerinnung des Caseins erfolgt durch Säurewirkung. Man darf sich durch den Umstand nicht irreführen lassen, dafs auch in Milchkulturen, die Kreide enthalten, Caseinfällung eintritt; es setzt sich die durch das Sterilisieren geballte Kreide eben nur allmählich mit den entstandenen Säuren um, so dafs die Reaktion der Milch und später der Molke stets eine deutlich saure ist.

Giftigkeit und Pathogenität.

Der »bewegliche« Buttersäurebacillus vom Typus »Amylobakter« ist nach unseren bisherigen Erfahrungen für Meerschweinchen nicht pathogen. Wir glauben, dafs, wenn bewegliche Buttersäurebacillen als Krankheitserreger beschrieben werden, es sich um Bakterien handelt, die einer anderen Gruppe zugehören. Hierüber soll später noch ausführlich die Rede sein.²⁾

1) Auch der unbewegliche Buttersäurebacillus bildet — wie wir uns nachträglich durch bessere Methodik überzeugen konnten — in den Kulturen Diastasen, und zwar sowohl Amylase als auch Sucrase.

2) Über die pathogenen Varietäten des unbeweglichen Buttersäurebacillus bezw. die Zugehörigkeit des Gasphlegmonebacillus und des Rauschbrandbacillus zur Gruppe desselben, ist an anderer Stelle bereits kurz berichtet worden (Münch. med. Wochenschr., 1900 u. 1901).

Verbreitung des beweglichen Buttersäurebacillus.

Der bewegliche Buttersäurebacillus scheint so wie der unbewegliche Buttersäurebacillus in ganz allgemeiner Verbreitung in der Natur vorzukommen, indem er in den verschiedensten Ausgangsmaterialien, wie in Erde, in Wasser (Wiener Hochquellwasser), in verschiedenen Käsesorten, in einer Reihe von Mehlproben — ausnahmsweise auch in Marktmilch — aufgefunden wurde.

Am besten hält man sich bei seinem Nachweise an das Bejerincksche Rezept, das sich auch uns gut bewährt hat.

Man übergießt in einem enghalsigen Gefäße 5 g Glykose und 5 g feingemahltes Fibrin (oder auch Pepton) mit 100 g Wasser und bringt die Mischung zum Sieden; in die siedende Flüssigkeit trägt man das zu prüfende Material, wie Gartenerde, Schlamm, Mehl von Cercalien etc. in kleinen Mengen ein. Am nächsten Tage ist in der bei 37° gehaltenen Probe lebhaft Gärung eingetreten, die fast stets durch den beweglichen Buttersäurebacillus hervorgerufen ist.

Weniger häufig gelang uns seine Anreicherung, wenn wir die Ausgangsmaterialien in steriler Milch erhitzten, ähnlich wie wir behufs Gewinnung des unbeweglichen Buttersäurebacillus verfahren waren.

Verschiedene Gründe sind wohl dafür maßgebend, daß in solchen Fällen der unbewegliche Buttersäurebacillus meist die Oberhand gewann. Einmal dürften bei dem Botkinschen Verfahren (Erhitzen durch 10—30 Minuten im strömenden Dampfe) die wenig widerstandsfähigen Sporen des *Granulobacillus mobilis* in den meisten Fällen zu Grunde gehen, dann ist aber wohl weiters der Schluss berechtigt, daß eine Proliferation derselben bei diesem Verfahren deshalb meist ausbleibt, weil für viele Varietäten der beweglichen Art die Milch keinen günstigen Nährboden vorstellt (s. o.). Daß der unbewegliche Buttersäurebacillus in den nach Bejerincks Angabe angelegten Vorkulturen niemals seinen beweglichen Verwandten zu verdrängen vermag, kann darin seinen Grund haben, daß letzterem die Dextrose in

besonders hohem Mafse zusagt; doch konnten wir in den Dextrose-Reinkulturen beider Arten Unterschiede in der Gärungsintensität nicht wahrnehmen.

Die in der vorliegenden Abhandlung gegebene Beschreibung des »beweglichen« Buttersäurebacillus läfst erkennen, dafs wohl manche Beziehungen ihn mit dem unbeweglichen Buttersäurebacillus verbinden, dafs aber genügend Unterschiede vorhanden sind, die die Aufstellung einer eigenen Art rechtfertigen und geboten erscheinen lassen.

Sind schon für den Fernerstehenden eine Reihe von leicht kenntlichen Verschiedenheiten gegeben, wie vorhandene oder fehlende Beweglichkeit, Peptonisierung der Gelatine und der Mangel einer solchen, anderes Aussehen der Kolonien u. s. w., so ist für denjenigen, der sich lange und viel mit dieser Gruppe von Bakterien beschäftigt hat, der Gesamtcharakter derselben, welcher sich unter wechselnden biologischen Bedingungen stets unverkennbar ausprägt, vor allem mafsgebend und entscheidend.

Wir möchten auf letzteren Umstand besonderen Wert legen, hauptsächlich auf Grund von Erfahrungen aus der letzten Zeit, die uns belehrten, dafs manche bis dahin für charakteristisch gehaltene Eigenschaft der »unbeweglichen« Art verloren gehen, eine fehlende Fähigkeit zeitweise auch erworben werden kann, ohne dafs die Zugehörigkeit zum Typus hierdurch auch nur im geringsten zweifelhaft würde.

Die Einzelheiten hierüber zu bringen, ist einer späteren Abhandlung vorbehalten, in ihr soll auch von den Übergangsformen zwischen »beweglichen« und »unbeweglichen« Buttersäurebacillen die Rede sein.

Protokollauszüge.

Verbreitung.

1. Milch in Originalflasche aus Breslau eingesandt; 15 Minuten im strömenden Dampfe sterilisiert. Typische Gärung. Auf Zuckeragarplatten wetzsteinförmige Kolonien mit Gasblasen; hiervon Reinkultur des beweglichen Buttersäurebacillus.

2. Milch aus Wien, nach 12 Min. langem Erhitzen im Dampftopfe geronnen (aërobe Milchsäurebakterien?); im Brutschranke deutliche Gärung mit Buttersäuregeruch; auf den Platten Reinkultur von beweglichen Buttersäurebacillen.

3. Sterile Milch mit 20 ccm Wiener Hochquelleitungswasser versetzt, hierauf 5 Min. im strömenden Dampfe erhitzt; stürmische Gärung; bewegliche Buttersäurebacillen, anscheinend in Reinkultur.

4. Sterile Milch, mit einem linsengroßen Stück Schweizerkäse beschickt; 15 Min im Dampftopf erhitzt; neben aëroben Bakterien und unbeweglichen Buttersäurebakterien Isolierung von beweglichen Buttersäurebacillen.

5. Sterile Milch mit »Schmierkäse« geimpft; typische Gärung. Neben unbeweglichen Buttersäurebacillen auch bewegliche reingezüchtet.

6. Rohrzuckerbouillon mangelhaft sterilisiert, bei der Prüfung im Thermostaten stürmisch vergoren; bewegliche Buttersäurebacillen in praktischer Reinkultur.

7. Sechs Proben mit Gartenerde, nach Beijerinck (s. o.) angesetzt. Nach 48 Stunden Zuckeragarplatten; überall bewegliche Buttersäurebacillen.

8. Fünf Proben, ähnlich wie 7., doch statt Fibrin Pepton zugesetzt. Roggen- und Hafermehl; in allen Proben bewegliche, granulose tragende Buttersäurebacillen.

9. Peptonbouillon mit 1% milchsaurem Kalk. Sehr fette Gartenerde eingebracht. Nach 48 Stunden sehr schwache Gärung; neben dünnen, beweglichen Stäbchen auch granulose führende, bewegliche Buttersäurebacillen daraus isoliert.

Untersuchung der Gärprodukte.

Die Methoden glichen völlig den in der ersten Abhandlung ausführlich beschriebenen, weshalb hier nicht darauf eingegangen wird. Kleine Abweichungen vom gewöhnlichen Analysengang sind in den Protokollauszügen verzeichnet.

1. Milch $2\frac{1}{2}$ l; frei von Milchsäure; Kreide. Mit »Breslauerstamm« geimpft; Bunsenventil. Nach 14 Tagen 2400 ccm in Arbeit genommen; in gewöhnlicher Weise verarbeitet. 16 g Barytsalz der flüchtigen Säuren; keine fixen Säuren, keine Alkohole. Barytgehalt des Salzes = 46,2% Ba (noch kohlensuren Baryt enthaltend). Milchzuckergehalt der Molke = 2,65%; Eiweißgehalt der Molke = 0,71%.

2. Milch 2 l. Kontrolle frei von Milchsäure. »Breslauerstamm«. Bunsenventil, Kreide. Nach 12 Tagen verarbeitet. 18 g buttersaures Ba, keine fixen Säuren, keine Alkohole. Der größte Teil des Barytsalzes wird mit Schwefelsäure zersetzt und im Schacherlischen Apparate mit Äther extrahiert. Ab-sättigen mit Baryt, fraktioniertes Fällen mit Silbernitrat.

Erste Fraktion = 1,6172 g; hiervon wurden 1. 0,3971 g abgewogen und verascht; Gewicht des metallischen Silbers = 0,2215 g, entsprechend einem Silbergehalt von 55,9%; 2. 0,2676 g Silbersalz gaben beim Veraschen einen Rückstand von 0,1493 g Silber; der Silbergehalt dieser Probe betrug = 55,8%.

Zweite Fraktion = 2,9137 g; 0,3804 g Salz geben nach dem Versetzen einen Silberrückstand von 6,2140 g = 56,2 %.

Das Filtrat von der zweiten Fraktion schwärzte sich in kürzester Zeit, was auf Ameisensäure schließen läßt.

3. Milch. Buttersäurebacillus aus Hochquellwasser. Wie 2. 12 g Barytsalz der flüchtigen Säuren, keine Alkohole, keine fixen Säuren.

4. Milch. Buttersäurebacillus aus Schweizerkäse. 11,8 g Ba-Salz der flüchtigen Säuren, keine Alkohole, keine fixen Säuren.

5. Milch. Kontrolle frei von Milchsäure. Buttersäurebacillus aus Schmierkäse. 10 g buttersaurer Baryt; keine fixen Säuren und Alkohole.

6. Milch. Bejerinckscher Stamm. Paraffinverschlufs. Kreide. Erst nach 4 Tagen Gärung geronnen. 7,6 g Barytsalz der flüchtigen Säuren; geringe Mengen fixer Säure.

7. 30 g Milchzucker in künstlicher Nährlösung und 10 g Pepton. »Breslauer Stamm«. 13 g buttersaures Ba, geringe Mengen fixer Säure.

8. Wie 7. Paraffinverschlufs. Bejerinckscher Stamm. 12 g Barytsalz der flüchtigen Säuren, keine fixen Säuren.

9. Wie 7. Ein von v. Hibler in Innsbruck als *B. sporogenes* Klein übersandter Stamm. 15 g buttersaures Ba, geringe Mengen Milchsäure.

10. Wie 7. Stamm »Hochquell«. 15 g buttersaures Ba, geringe Mengen Milchsäure.

11. 40 g Dextrose (kryst. Kahlbaum) in Peptonbouillon (2 l) mit Paraffinverschlufs, Kreide. »Breslauer Stamm«. Nach 4 Wochen verarbeitet. Zucker vollständig vergoren. 25 g buttersaurer Baryt, 5 g milchsaures Calcium, (Ca-Gehalt = 18,1 %), keine Alkohole.

12. Wie 11. »Breslauerstamm«. 12 g buttersaures Ba, 5 g milchsaures Ca.

13. 30 g Dextrose in 1 l Peptonbouillon (Paraffinverschlufs), Kreide. Aus spontan vergorener Rohrzuckerbouillon isolierter Stamm. Zucker nicht vollständig zersetzt. 7,5 g buttersaurer Baryt; 3,2 g Kalksalz der fixen Säuren in großen Drusen aus der wässrigen Lösung krystallisierend.

14. 30 g Dextrose in 1 l Peptonbouillon und Kreide. Paraffinverschlufs; Bejerinckscher Stamm. 7,2 g Barytsalz der flüchtigen Säuren, 5,3 g Kalksalz der fixen Säuren. Alkohole dem Geruche nach vorhanden, doch nicht aussalzbar.

15. 30 g Dextrose in 1 l künstlicher Nährlösung mit Pepton und Kreide. Bejerinckscher Stamm. In der Botkin-Glocke durch 7 Tage gehalten. 14 g Barytsalz flüchtiger Säuren, 1,3 g Kalksalz fixer Säure, keine Alkohole.

16. 30 g Dextrose in 1 l künstlicher Nährlösung mit Pepton und Kreide. Bejerinckscher Stamm. 11 g Barytsalz flüchtiger Säure. Von den fixen Säuren etwa $\frac{2}{3}$ verloren; der Rest mit pulv. Zinkkarbonat gekocht = 1,9 g milchsaures Zink; zwei Krystallisationen, beide optisch aktiv.

17. 30 g Dextrose in 1,5 l Bouillon und 15 g Pepton und Kreide. Paraffinverschlufs. *Bacillus saccharobutyricus* Klecki. 10,4 g Barytsalz flüchtiger Säure, 13,2 g Kalksalz fixer Säure. Keine Alkohole.

18. 30 g Dextrose, künstliche Nährlösung und Pepton; Paraffin. Kleckischer Stamm; 7 Tage alte Kultur. 4,7 g Barytsalz flüchtiger Säure, 2,3 g Kalksalz fixer Säure. Letzteres durch Ausäthern der angesäuerten wässerigen Lösung und Kochen mit $ZnCO_3$ ins Zinksalz übergeführt; zweimal umkrystallisiert. Starke Linksdrehung der Lösung.

19. Wie 17. In gleicher Weise verarbeitet; das Kalksalz der fixen Säure ins Zinksalz übergeführt; zweimal umkrystallisiert, starke Linksdrehung der wässerigen Lösung.

20. 30 g Dextrose, 1 l Peptonbouillon und Kreide, Paraffinverschlufs. Zehntägige Kultur von *Amylobakter Gruber*. 9 g Barytsalz der flüchtigen Säure, 6,7 g Kalksalz der fixen Säure, keine Alkohole.

21. 30 g Dextrose in künstlicher Nährlösung mit Pepton und Kreide, Paraffinverschlufs. *Amylobakter Gruber*. 13 g Barytsalz flüchtiger Säure, 0,9 g Kalksalz fixer Säure.

22. Wie 21. *Amylobakter Gruber*. 5 g buttersaures Ba; 2 g milchsaures Zink, optisch inaktiv.

23. 30 g Dextrose in 1 l künstlicher Nährlösung mit Pepton und Kreide, Paraffinverschlufs. Beweglicher Buttersäurebacillus aus Schmierkäse. 11 g buttersaures Ba; 3,2 g Zinksalz der fixen Säure. Optisch inaktiv.

24. 30 g Dextrose. Wie 23. Buttersäurebacillus »Hochquelle«. 11 g buttersaures Ba, 3 g Zinksalz der fixen Säure. Erste Krystallisation wiederholt gereinigt, optisch inaktiv. Mutterlauge mit Alkohol-Äther gefällt. Keine Alkohole.

25. 30 g Dextrose. Wie 23. »*B. sporog. Klein*« (v. Hibler). 12 g buttersaures Ba; 3,1 g milchsaures Zink (optisch inaktiv).

26. 30 g Saccharose (käuflich, krystallisiert) in künstlicher, mit Pepton versetzter Nährlösung; mit Paraffin überschichtet. Bejerinckscher Stamm. Nach 12 Tagen verarbeitet. 11 g buttersaures Ba. Die fixen Säuren mit Kreide abgesättigt und nach dem Verjagen des Wassers in heißem Methylalkohol gelöst; mit Äther gefällt. 1,5 g Ca-Salz. Im Rest Kalkbestimmung gemacht, die einen Gehalt von 0,67 g Milchsäure berechnen liefs. Im ganzen demnach 1,87 g Milchsäure. (Diese Methode der Reindarstellung des milchsauren Kalkes wurde später aus verschiedenen Gründen wieder verlassen.)

27. 30 g Saccharose. Wie 26. »*B. sporogenes Klein*« (v. Hibler). 17 g buttersaures Ba; Kalksalzkrystallisation der fixen Säure aus Methylalkohol hochgradig hygroskopisch und zerfließend. Die wässrige Lösung des Kalksalzes mit etwas mehr als der theoretischen Menge Oxalsäure versetzt und das Filtrat mit $ZnCO_3$ gekocht. Beim Eindampfen Krystallisation. Erste gereinigte Krystallisation = 1,2 g. Optisch inaktiv. Krystallwasser gehalt (Krystalle 5 Tage an der Luft getrocknet, offenbar schon etwas verwitert) = 17,3% (18,3% = 3 Moleküle Krystallwasser). Zinkgehalt 33,2% (0,236 g Substanz — 0,0784 g ZnO).

28. 30 g Saccharose. Wie 26. Beweglicher Buttersäurebacillus aus Schmierkäse. 10 g buttersaures Ba; 1,98 g milchsaures Ca. Keine Alkohole.

29. 30 g Saccharose. Wie 26. Stamm »Hochquell«. 9 g buttersaures Baryum; zwei Krystallisationen des Zinksalzes der fixen Säure, beide inaktiv.

30. 30 g Saccharose, künstliche Nährlösung mit Pepton und Kreide, Paraffinverschluss. Amylobakter Gruber. Der Kolbeninhalt wird im Vacuum eingedampft, dann angesäuert und mit Äther extrahiert. (9 Tage.) Nach dem Verjagen des Äthers wird der Rückstand in Wasser gelöst und destilliert; die flüchtigen Säuren werden mit Baryt, die nicht flüchtigen mit $ZnCO_3$ abgesättigt. 10 g buttersaures Ba, 2,1 g milchsaures Zn.

31. 30 g Saccharose. Wie 26. Aus Rohrzuckerbouillon gezüchteter Stamm. Geringe Mengen buttersaures Ba (2,3 g), 9,7 g milchsaures Zink. Starke Linksdrehung der Krystalle. Keine Alkohole. (Das Mengenverhältnis der fixen und flüchtigen Säuren in diesem, völlig einwandfreien Versuche ist ein analoges wie beim unbeweglichen Buttersäurebacillus. Wir waren später nie mehr in der Lage, bei einem beweglichen Buttersäurebacillus eine ähnliche Zersetzung zu beobachten; auch derselbe Stamm, in Rohrzuckerbouillon ein zweites Mal untersucht, wies dieses Verhalten nicht mehr auf.)

32. 30 g Saccharose. Wie 26. Ein aus Erde gezüchteter Stamm. 5 g buttersaures Ba, 4,2 g milchsaures Zink. Außerdem circa 4 ccm eines zwischen 115 und 118° C. übergehenden Alkohols, der demnach als Butylalkohol anzusehen ist.

(Der gleiche Stamm bildete in zwei weiteren Versuchen, in denen wir nur auf Alkohole geprüft haben, keine Alkohole und ist dieser Versuch somit als der einzige in einer großen Reihe anzusehen, in welchem uns der Nachweis größerer Alkoholmengen gelang)

33. 20 g Saccharose in 1,5 l Peptonbouillon. »Breslauerstamm«. 10 g buttersaures Ba, 4,7 g Ca-Salz der fixen Säure.

34. 30 g Saccharose in künstlicher Nährlösung mit Pepton und Kreide. Ein aus Fitzschem Sporenkalk gezüchteter Stamm. 5 g buttersaures Ba; 2,1 g milchsaures Zink, keine Alkohole. (Linksdrehung der Lösung.)

35. 40 g verkleisterter Stärke in Peptonbouillon. Breslauerstamm. 15 g buttersaures Ba, 2,8 g Kalksalz der fixen Säure, keine Alkohole.

36. 50 g verkleisterter Stärke in künstlicher Nährlösung und Pepton. Bejerinckscher Stamm. Im Filtrat Zuckerreaktion. 10 g buttersaures Ba, keine Alkohole, 2,7 g milchsaures Ca.

37. 30 g verkleisterter Stärke in künstlicher Nährlösung und Pepton; in der Botkinglocke gehalten. Stamm »Hochquell«. 19 g buttersaures Ba, 2,9 g milchsaures Zn.

38. 35 g verkleisterter Stärke in künstlicher Nährlösung und Pepton. (Paraffinverschluss). »B. sporogenes Klein« (v. Hible). 11 g buttersaures Ba, 3,78 g milchsaures Zink.

39. 30 g verkleisterter Stärke in künstlicher Nährlösung und Pepton. Paraffinverschluss. Kleckis Stamm. 9 g buttersaures Ba, 1,8 g milchsaures Zink; letzteres stark linksdrehend.

40. 40 g Glycerin in einfacher Nährlösung und Pepton. In der Botkinglocke 20 Tage gehalten. »Breslauerstamm«. Bei der Destillation

schwacher Geruch nach Aldehyden. Die flüchtigen Säuren, mit Baryt neutralisiert, erst durch kleine Mengen salpetersaures Silber von Salzsäure befreit, hierauf mit überschüssiger Silberlösung gefällt. Der entstandene Niederschlag, abgesaugt, gewaschen, getrocknet (4,2 g), enthielt 56,2% Ag. (0,8304 g Substanz, 0,4667 g Silber). Keine Alkohole; kleine Mengen fixer Säuren gebildet (eine Krystallisation, Mutterlauge mit Alkohol-Äther gefällt).

41. 30 g Glycerin in 1 l einfacher Nährlösung mit Pepton und 5 g Liebig'schem Fleischextrakt. (Paraffinverschluss.) Beijerinck'scher Stamm. 7 g Barytsalz der flüchtigen Säuren. Kleine Mengen fixer Säuren (wegen des Gehaltes der Lösung an Fleischextrakt nicht ohne weiteres als Gärprodukt zu deuten). Keine Alkohole.

42. 30 g Dextrose in 1 l peptonfreier Bouillon. Botkin'sche Glocke. Amylobakter Gruber (der gewaschene Bodensatz einer Pepton-Dextrose-Kultur). Stürmische Gärung, nach 48 Stunden einsetzend. Nach 14 Tagen untersucht. Keine Alkohole. 8 g buttersaurer Baryt, 3 g milchsaures Zink (inaktiv).

43. Gasanalyse. Amylobakter Gruber. 30 g Dextrose in künstlicher Nährlösung und 10 g Pepton. Dickwandiger Kolben, seitlicher Ansatz am Gasentbindungsrohr zur Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe (Sieden im Vacuum). Auffangen der Gase im Eudiometer über Wasser. Analyse der Gase nach Ansammlung von etwa 300 ccm Gas. Abmessen von 100 ccm in der Hempel'schen Bürette. Überleiten in die Kalilauge-Pipette. $\text{CO}_2 = 10\%$ des Gasgemenges. Von dem entkohlensäurten Gas wird ein Teil in ein graduiertes Eudiometer mit Niveaugefäß (Hg) gesaugt = 21,5 ccm. Nach Hinzuleiten von Sauerstoff aus geschmolzenem chlor-sauren Kali, Volumen = 37,4 ccm; nach der Explosion = 20,2 ccm. Nach abermaligem Überleiten in die Kalilaugepipette und Zurückführen = 20,1 ccm. Nach Überleiten in die Pyrogallolpipette und Zurückführen = 8,4 ccm. Das analysierte Gasgemenge bestand demnach aus 10% Kohlensäure, 47,97% Wasserstoff und 42,03% Luft. (Schlechte Dichtung des Apparates! Höherer Stickstoffgehalt der analysierten Luft [86,6% N] als der Zusammensetzung der Atmosphäre entspricht, wegen selektiver Absorption durch das Sperrwasser.)

Die Gärungsgase bestanden demnach aus 17,25% Kohlen-säure und 82,75% Wasserstoff.

Sumpfgas wurde keines gebildet.

Beitrag zur Biologie der Rattentrypanosomen.

Von
Oberarzt Dr. **Jürgens.**

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Berlin.)

Für die genauere Kenntnis der Flagellaten, welche seit dem Nachweis ihrer Bedeutung für die Nagana, Surra und Dourine-Krankheit lebhaft an Interesse gewonnen haben, erscheint das Studium der scheinbar nicht pathogenen Trypanosomen des Rattenblutes nicht unwichtig. Auf Veranlassung von Herrn Stabsarzt Dr. v. Wasielewski wurde daher die Prüfung einer Reihe von Fragen über das Verhalten dieser Parasiten innerhalb und außerhalb des Tierkörpers vorgenommen.

Die ersten erfolgreichen Übertragungsversuche der Rattentrypanosomen auf andere Ratten wurden von Koch ausgeführt. Zwar berichtet schon Lingard (1895) über gelungene Überimpfungen auf Kühe, Pferde, Affen und Feldmäuse, doch kann man diesen positiven Versuchen keinen allzuhohen Wert beilegen, weil die Erreger der Surra-Krankheit und die anscheinend harmlosen Rattenblutparasiten nicht scharf auseinander gehalten werden. Auch geben sämtliche späteren Untersucher übereinstimmend an, daß eine Übertragung auf andere Tiere als nicht infizierte Ratten mißlingt.

Robert Koch (1898) erkannte den Unterschied zwischen Rattentrypanosomen und den Parasiten der Surra-Krankheit und überimpfte einwandfrei Rattentrypanosomen mit positivem Erfolg auf nicht infizierte Ratten, während ihm die Übertragung auf andere Tiere als Ratten nicht gelang.

Genauere Studien über die uns beschäftigenden Organismen sind dann von Rabinowitsch und Kempner (1898), sowie von v. Wasielewski und Senn (1900) angestellt worden. Es wurde parasitenhaltiges Rattenblut, mit steriler Kochsalzlösung oder Bouillon vermischt, dem Versuchstier in die Bauchhöhle gespritzt. Am 3. oder 4. Tage nach der Impfung traten spärliche Parasiten in dem Blut des geimpften Tieres auf, und zwar sahen v. Wasielewski und Senn anfangs stets nur erwachsene Exemplare, während Rabinowitsch und Kempner fast nur »Entwicklungsformen« am 1. und 2. Tage ihres Auftretens im Schwanzblut fanden, darunter allerdings einige wenige ausgewachsene Parasiten. Die Inkubationszeit dauert also, wie übereinstimmend angegeben wird, etwa 3—7 Tage, selten kürzere oder längere Zeit, und nur in Bezug auf die Form der ersten Ankömmlinge im Schwanzblut der geimpften Ratten stehen sich zwei Beobachtungen gegenüber und geben Veranlassung, die Frage nach der Hauptentwicklungsstätte der Parasiten verschieden zu deuten. Rabinowitsch und Kempner glauben aus ihren Beobachtungen schliessen zu müssen, daß die Parasiten in der Bauchhöhle zur Entwicklung kommen und als Entwicklungsformen in die Blutbahn vordringen, während v. Wasielewski und Senn die Hauptentwicklung im Blute vor sich gehen lassen und glauben, daß eine Überwanderung hauptsächlich von den erwachsenen und jungen Parasiten ausgeführt wird, während die in Entwicklung begriffenen durch ihre Gröfse verhindert werden, durch die Lymphbahnen ins Blut überzutreten. Bei der Besprechung meiner eigenen Versuche komme ich auf diese Frage zurück.

Mesnil und Gazeau (1901) verwendeten bei ihren Impfungen defibriniertes Blut oder nahmen einen Zusatz von Oxal- oder Citronensäure. Sie konstatierten bisweilen schon am 1.—3. Tage nach der Impfung das Auftreten der Parasiten im Blut, aber immer erst nach dem 3.—5. Tage fanden sie eine gröfsere Anzahl, welche dann innerhalb von 24 Stunden stark zunahm. Während dieser Zeit gelang es ihnen dann auch, alle Entwicklungsstadien aufzufinden.

Das Ausgangsmaterial, womit ich meine eigenen Versuche anstellte, bildeten zwei wilde graue Ratten, welche ziemlich zahl-

reiche Trypanosomen beherbergten. Die Übertragung der Parasiten auf weiße Ratten gelang in allen 47 Fällen. Es wurde etwas Blut vom Schwanz der infizierten Ratten entnommen, mit etwa der gleichen Menge Kochsalzlösung vermischt und dem Versuchstier in die Bauchhöhle gespritzt. Der erste Nachweis der Parasiten im Schwanzblut des geimpften Tieres gelang meistens am 3. oder 4. Tage, selten später. Die Beobachtung von Mesnil und Gazeau, daß sich öfters schon am 1.—3. Tage Parasiten im Blute finden, wird durch meine Versuche bestätigt, doch gelingt ein so frühzeitiger Nachweis nur nach der Impfung mit großen Dosen. In allen Fällen, wo erwachsene Tiere mit 0,1 ccm oder mit noch kleineren Mengen geimpft wurden, konnten nie vor dem 3. Tage Trypanosomen im Blute aufgefunden werden. Wurden dagegen kleine Tiere mit 0,5—1,0 ccm trypanosomenhaltigem Blute geimpft, so erschienen stets nach wenigen Stunden, in einzelnen Fällen bereits nach 20 Minuten, Parasiten im Schwanzblut des geimpften Tieres. Eine merkliche Vermehrung der Flagellaten machte sich aber niemals von diesem Moment des ersten Auftretens im Blut bis zum 3. oder 4. Tage nach der Impfung geltend; erst nach dieser Zeit trat ziemlich plötzlich eine Überschwemmung des Blutes mit Trypanosomen ein. Offenbar handelt es sich hier nicht um eine abgekürzte Inkubationszeit, sondern um ein Überwandern der eingeimpften Parasiten in die Blutbahn. Denn unter diesen so frühzeitig im Blute auftretenden Trypanosomen fanden sich niemals Vermehrungsformen oder kleine, junge Exemplare; stets waren es alte erwachsene Parasiten, die den eingeimpften genau gleichen. Erst am 3. Tage oder noch später erschienen neben diesen ausgewachsenen Formen plötzlich ganz kleine, junge und große, sich zur Vermehrung anschickende; und am nächsten Tage waren dann Vermehrungsformen und alle Entwicklungsstadien im Blute zu finden. Auch Gazeau und Mesnil fanden niemals vor dem 3. Tage eine größere Menge Parasiten, und Vermehrungsformen sahen sie ausschließlich nur nach dem 4. Tage. Wenn man also unter der Inkubationszeit diejenige Zeit versteht, welche vom Moment der Impfung bis zum Auftreten einer neuen

Parasiten-Generation im Blut verstreicht, so beträgt diese Inkubationszeit in der Regel mindestens drei Tage. Auf einen Fall, der von Rabinowitsch und Kempner berichtet wird und gegen diese Regel zu sprechen scheint, komme ich weiter unten zurück.

Da es nahe liegt, anzunehmen, daß die Anzahl der verimpften Parasiten auf den Nachweis des ersten Auftretens im Schwanzblut von merklichem Einfluß ist, wurden in dieser Richtung Versuche angestellt und Ratten mit verschiedenen großen Dosen trypanosomenhaltigen Blutes geimpft. Es zeigte sich ein ähnliches Verhalten, wie es Mesnil und Gazeau bei den Erregern der Nagana beobachtet haben, daß nämlich die Quantität der überimpften Parasiten keinen merklichen Einfluß auf die Inkubationszeit ausübt. Differenzen von 0,5 und 0,0005 ccm machten sich für die Inkubationszeit überhaupt nicht bemerkbar, und erst ganz bedeutend kleinere Mengen (0,000005 ccm) bewirkten eine Verzögerung um 1—2 Tage. Diese kleinen Dosen wurden durch Verdünnung mit Kochsalzlösung derart hergestellt, daß zunächst 0,1 ccm Blut mit neun Teilen Kochsalzlösung verdünnt wurde, davon dann wiederum ein Teil mit neun Teilen vermischt und so fort bis 1 ccm der Lösung die gewünschte Menge Blutes enthielt. Durch diese allmählich vorgenommene Verdünnung erhält man eine ziemlich gleichmäßige Verteilung des Blutes in der Kochsalzlösung und damit eine genauere Dosierung. Andererseits muß man aber auch möglichst rasch arbeiten, und nach Herstellung der beabsichtigten Verdünnung das Impfmaterial dem Versuchstier sofort in die Bauchhöhle spritzen, damit die schädigende und selbst lähmende Wirkung, welche durch die Konzentrationsänderung des die Parasiten umgebenden Mediums verursacht wird, nicht allzulange bestehen bleibt.

Eine derartige Verzögerung des ersten Nachweises der Flagellaten im Schwanzblut tritt auch ein bei Überimpfung von alten, lange Zeit im Eisschrank aufbewahrten Trypanosomen. Laveran und Mesnil (1900) konnten bei Übertragung von 47 Tage altem Blut erst am 6.—7. Tage die ersten Parasiten im Schwanzblut nachweisen. Die von mir vorgenommenen Infizierungsversuche

mit 32 und 53 Tage altem Blut ergaben dasselbe Resultat. Da in solchem, Wochen und Monate im Eisschrank gestandenen Blut sich gewöhnlich nur sehr wenige Trypanosomen lebensfähig erhalten, so erscheint die Ähnlichkeit mit dem Verhalten sehr kleiner Dosen nicht wunderbar.

Einen merkwürdigen Einfluss auf die Inkubationszeit zeigte das Entwicklungsstadium der überimpften Parasiten. Wurde nämlich zur Übertragung das Blut einer solchen Ratte verwendet, welche noch Entwicklungsstadien beherbergte, so dauerte die Inkubationszeit bei dem Versuchstier nicht die üblichen 3—4, sondern nur 1—2 Tage. Bereits 24 Stunden nach der Impfung erschienen Parasiten im Schwanzblut und schon am nächsten oder spätestens übernächsten Tage fand die Überschwemmung des Blutes mit Trypanosomen statt. Während also bei einer Impfung mit alten erwachsenen Flagellaten sich erst nach 3—4 Tagen frühestens eine Vermehrung der eingeführten Parasiten bemerkbar machte, geschah dies bei Impfungen mit Entwicklungsstadien oder Jugendformen zwei Tage früher. Augenscheinlich gebrauchen die alten überimpften Trypanosomen in der Bauchhöhle oder im Blut des neuen Wirtes eine gewisse Zeit, bevor sie sich zur Vermehrung anschicken. Der Vorgang der Impfung, sowie die Einflüsse des neuen Wirtes scheinen auf die alten erwachsenen Formen entwicklungshemmend einzuwirken, während die Jugend- und Vermehrungsformen in ihrer Entwicklungsenergie weniger gestört werden und die hemmenden Einflüsse leichter zu überwinden vermögen.

Auf diese Weise erklärt sich nun auch die oben erwähnte, von Rabinowitsch und Kempner einmal beobachtete eintägige Inkubationszeit. Das Versuchstier (Ratte Nr. 19) wurde mit dem Blut einer Ratte geimpft, welche erst seit zwei Tagen Parasiten in ihrem Blute hatte, also ohne Frage Entwicklungsstadien beherbergte.

Hier ist der Ort, um auf die Frage nach der Hauptentwicklungsstätte der Trypanosomen zurückzukommen. Wie schon oben erwähnt, sprechen die Beobachtungen von Rabinowitsch und Kempner für die Entwicklung in der Bauchhöhle,

die von v. Wasielewski und Senn für eine solche im Blut. Zunächst bestätigen meine Beobachtungen die von den letztgenannten Verfassern gemachte Angabe, daß unter den ersten Ankömmlingen im Schwanzblut einer geimpften Ratte sich niemals Teilungsformen finden. Es wurden in jedem einzelnen Fall immer eine ganze Reihe von Präparaten in frischem und gefärbtem Zustand genau durchmustert, aber stets fanden sich nur junge oder ausgewachsene schlanke Exemplare, niemals Teilungsformen. Wenn nun diese Beobachtung schon sehr dafür spricht, daß die Überwanderung aus der Bauchhöhle in die Blutbahn nicht von den Vermehrungsformen, sondern von erwachsenen und jungen Individuen ausgeführt wird, so läßt sich diese Frage experimentell direkt durch Überimpfung von großen Mengen Teilungsformen zur Entscheidung bringen. Da nämlich die Parasiten sofort nach der Impfung anfangen, aus der Bauchhöhle ins Blut überzuwandern, so daß sie bei großen Dosen schon nach wenigen Stunden im Schwanzblut nachzuweisen sind, so müßten nach einer Impfung mit Entwicklungsstadien nach der Theorie von Rabinowitsch und Kempner viele Teilungsformen im Schwanzblut erscheinen, während das Fehlen dieser Formen und das Auftreten von jungen und schlanken erwachsenen Individuen für die Richtigkeit der v. Wasielewskischen Annahme sprechen würde. Es zeigte sich nun in der That, daß bei diesen Versuchen immer nur erwachsene und junge Trypanosomen ins Blut überwanderten, manchmal fand sich auch wohl ein dicker, sich zur Teilung anschickender Parasit, aber nie wurden Rosetten oder andere Teilungsstadien gefunden, die doch im verimpften Material so zahlreich vertreten waren. Ihre größeren Dimensionen lassen augenscheinlich den Übertritt ins Blut durch die Lymphgefäße nicht zu.

Die in die Bauchhöhle gebrachten Parasiten schreiten also hier nicht gleich zur Entwicklung, sondern einige von ihnen wandern sofort ins Blut und beginnen dort erst nach 2—3 tägigem Aufenthalt sich zu vermehren. Das plötzliche Auftreten von jungen Formen am 3. Tage nach der Impfung neben diesen erwachsenen Parasiten beweist, daß inzwischen auch in der Bauch-

höhle eine Vermehrung stattgefunden hat und Jugendformen ins Blut übergewandert sind. Die am 3.—4. Tage im Blut vorhandenen Trypanosomen sind demnach zum Teil sofort nach der Impfung aus der Bauchhöhle ins Blut übergewandert, zum Teil haben sie sich bereits aus den eingepfchten in der Bauchhöhle entwickelt und sind dann als Jugendformen ins Blut übergetreten. Es besteht demnach die v. Wasielewskische Annahme zu Recht, dafs nämlich die nach 4—5 Tagen im Blute vorhandenen zahlreichen Kolonien herrühren:

1. von den direkt übergewanderten, im Blute bereits in zweiter Generation geteilten Parasiten,
2. von den in einer Generation in der Bauchhöhle zur Teilung geschrittenen, als Jugendformen ins Blut übergetretenen und hier in einer neuen Generation vermehrten Parasiten.

Ohne Frage bildet also das Blut den günstigsten Nährboden und den Hauptvermehrungsort. Merkwürdig erscheint es nur, warum nicht alle eingepfchten Trypanosomen gleich aus der Bauchhöhle ins Blut überwandern, denn ein mechanisches Hindernis schaffen sie sich ja erst selbst durch ihre Gröfsenzunahme nach zweitägigem Verweilen. Noch wunderbarer aber wäre es, wenn sie nach der Beseitigung dieses selbstgeschaffenen Hindernisses, nämlich nach vollendeter Teilung und Loslösung der einzelnen Jugendformen aus der Peritonealflüssigkeit völlig verschwinden würden, wie dies Rabinowitsch und Kempner angeben. Über einen ähnlichen Befund berichtet übrigens neuerdings auch Schilling bei der Surra-Krankheit der Pferde. In den ersten 3×24 Stunden nach der intraperitonealen Impfung sollen sich im Peritonealexsudat massenhaft Trypanosomen und zahlreiche Teilungsformen gefunden haben, während das periphere Blut erst am 5. Tage die erwachsenen Formen beherbergte. Am 19. Tage soll dann das Peritonealexsudat wieder frei von Parasiten gewesen sein, während im peripheren Blut massenhaft Trypanosomen angetroffen wurden. Indessen hatte schon v. Wasielewski nach einer mir mündlich gemachten Mitteilung bei einer am 25. Tage nach der

Infektion gestorbenen Ratte noch zahlreiche Parasiten im Peritoneum gefunden, und, gestützt auf diesen Befund, versuchte ich durch eigene Untersuchungen mir über diese Frage Rechenschaft zu geben. Diese Beobachtung ergab nun, daß die Flagellaten keineswegs einige Tage nach der Impfung aus der Bauchhöhle verschwanden. Auch nachdem die Vermehrung der Parasiten im großen und ganzen beendet und die Höhe der Infektion überschritten war, fanden sich noch zahlreiche Trypanosomen in der Peritonealflüssigkeit, und ein völliges Verschwinden derselben aus der Bauchhöhle trat erst mit dem Ende der Infektion ein.

Die Untersuchung des Peritoneums in den ersten Tagen nach der Impfung ergab Resultate, welche von den Berichten von Rabinowitsch und Kempner, sowie von den neuesten Untersuchungen von Laveran und Mesnil¹⁾ abweichen. Es wurden vier junge Ratten mit je 0,3 ccm trypanosomenhaltigen Blutes geimpft. Am nächsten Tage hatten bereits alle vier schlanke erwachsene Parasiten im Schwanzblut, und die Peritonealflüssigkeit einer zu diesem Zwecke getöteten Ratte zeigte dieselben Parasiten ohne Andeutung von beginnender Vermehrung. Auch am 2. und 3. Tage nach der Impfung zeigte das Schwanzblut und in gleicher Weise die mittels Kapillarröhrchen entnommene Peritonealflüssigkeit nur schlanke erwachsene Trypanosomen ohne Teilungsformen. Um die Peritonealhöhle genauer durchsuchen zu können, wurde am 2. wie am 3. Tage je eine Ratte getötet, aber bei der darauffolgenden Untersuchung wurden in der Peritonealflüssigkeit noch keine Vermehrungsformen gefunden. Erst am 4. Tage, als auch im Blute die beginnende Vermehrung

1) Anm: Nachdem diese Arbeit bereits zum Drucke gegeben war, erhielt ich Kenntnis von den neuesten Untersuchungen von Laveran und Mesnil: *Recherches morph. et expériment. sur le Trypanosome des rats.* (Annales de l'Institut Pasteur), Sept. 1901. Die Beobachtungen dieser Forscher über das Verhalten des Trypanosomen in der Bauchhöhle und das völlige Verschwinden aus derselben nach der Vermehrungsperiode können durch meine Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Ich werde Gelegenheit nehmen, auf diese Frage sowie auf einige andere Punkte der erwähnten Arbeit später näher einzugehen.

zu erkennen war, fanden sich in der Bauchhöhle einzelne in Teilung begriffene Parasiten, und als am 10. Tage im Schwanzblut keine Vermehrungsstadien mehr angetroffen wurden, fehlten sie auch in der Peritonealflüssigkeit, dagegen waren noch zahlreiche erwachsene schlanke Exemplare vorhanden.

Über die Dauer der Entwicklung der Parasiten ist nichts genaueres bekannt. Aus dem Schicksal der in die Bauchhöhle eingespritzten Trypanosomen läßt sich natürlich für die Dauer der Entwicklung nichts folgern, weil sich hier, wie wir oben gesehen haben, entwicklungshemmende und andere störende Einflüsse geltend machen. Die weiter unten erwähnten Beobachtungen im hängenden Tropfen bei Brutschranktemperatur zeigen indessen, daß die Entwicklung der sich zur Teilung vorbereitenden Parasiten bis zur beendeten Teilung und Loslösung der Jugendformen bei diesen offenbar nicht sehr günstigen Außenbedingungen in 12—24 Stunden beendet sein kann. Wahrscheinlich geht die Teilung in wenigen Stunden vor sich, sonst wäre auch ein so plötzliches Anwachsen der Parasitenzahl am 4. und 5. Tage nach der Impfung kaum zu erklären.

Die Höhe der Infektion wird bereits 2—3 Tage nach dem Auftreten der ersten Vermehrungsformen im Blut erreicht, und zwar ist die Stärke der Infektion unabhängig von der Quantität der eingepflichten Parasiten, wie dies Mesnil und Gazeau auch für die Erreger der Nagana angeben. Sie erreicht in diesen Tagen oft eine außerordentliche Stärke. Mesnil und Gazeau fanden bisweilen ein Verhältnis der Parasiten zu den roten Blutkörperchen wie 1:1—2 und selbst wie 2—3:1. Es ist jedoch nicht ersichtlich, ob nur in einzelnen Präparaten oder Gesichtsfeldern dieses Verhältnis angetroffen wurde oder im Durchschnitt. Beurteilung einzelner Gesichtsfelder führt natürlich zu Täuschungen, da die Erfahrung zeigt, daß die Verteilung im Blut keineswegs gleichmäßig ist. Für die Entscheidung dieser Frage würde weiter in Betracht zu ziehen sein, daß wahrscheinlich auch ein Unterschied in den verschiedenen großen Gefäßen, sowie im arteriellen und venösen Blut zu finden ist. In meinen Präparaten fanden sich bisweilen auch außerordentlich zahlreiche

Parasiten. Doch übertraf auch bei der stärksten Infektion die Zahl der Trypanosomen niemals die der roten Blutkörperchen. Genauere Zählungen wurden nicht ausgeführt.

Am 4. Tage nach dem ersten Auftreten fanden Rabinowitsch und Kempner keine Vermehrungsformen mehr, sondern fast ausschließlich wieder isolierte, ausgewachsene Individuen. Auch nach den Untersuchungen von v. Wasielewski und Senn verschwinden die Teilungsstadien etwa am 8.—10. Tage nach der Impfung, und Mesnil und Gazeau sahen nach dem 8. Tage keine Entwicklungsstadien mehr. v. Wasielewski wirft die Frage auf, ob in der That mit diesem Zeitpunkt die Vermehrung aufhört oder ob sie nur so spärlich wird, daß sie gegenüber der Unzahl erwachsener Formen zurücktritt. Er entscheidet sich für die letztere Annahme, und in der That konnte ich bei manchen Ratten nach langem Suchen noch in der 3. Woche nach der Impfung vereinzelte Teilungsformen auffinden, bei einigen jungen Tieren mit deutlichen Krankheitssymptomen traten zu dieser Zeit Vermehrungsformen sogar noch in beträchtlicher Zahl auf.

Über die Dauer der Infektion liegen sehr verschiedene Beobachtungen vor. Rabinowitsch und Kempner berichten, daß die weißen Ratten ihre Parasiten im allgemeinen nach 4 bis 6 Wochen wieder verlieren, in einzelnen Fällen bereits nach 1—2 Wochen und mitunter noch früher. Nur zwei weiße Ratten hatten noch nach 3 und 4 Monaten Trypanosomen. v. Wasielewski und Senn konnten noch 5½ Monaten nach der Injektion bei einigen weißen Ratten Flagellaten reichlich nachweisen, und kein Versuchstier verlor vor der 6. Woche seine Parasiten. Mesnil und Gazeau sahen wiederum in einigen Fällen schon am 7. oder 8. Tage das Ende der Infektion, bei anderen Ratten erst nach 4—5 Monaten. Meine Versuchstiere beherbergten ihre Blutparasiten in der Regel 1—2 Monate, selten etwas länger; nur in zwei Fällen konnten noch nach 7 Monaten zahlreiche Trypanosomen gefunden werden. Kürzere Zeit als einen Monat dauerte die Infektion nur ein einziges Mal. In diesem Falle verschwanden die Parasiten ganz plötzlich am 3. Tage nach dem

Auftreten der ersten Vermehrungsformen. Das Tier brachte am nächsten Morgen acht Junge zur Welt. Die Annahme, daß diese beiden Ereignisse in ursächlichem Zusammenhang stehen, liegt sehr nahe. Auch Rabinowitsch und Kempner erklären zwei Fehlversuche bei intraperitonealer Infektion zweier trächtiger Ratten mit der veränderten und in verschiedenen Organen vermehrten Blutcirkulation.

Die beiden grauen, natürlich infizierten Ratten verloren ihre Parasiten nach drei- und fünfmonatlicher Gefangenschaft.

Erneute Übertragungsversuche nach einmal überstandener Infektion ergaben stets ein negatives Resultat, auch selbst bei Ratten, welche bereits vor 7 Monaten ihre Trypanosomen verloren hatten.

Wurden die Wiederimpfungen mit großen Dosen ausgeführt, so wanderten zwar einige Parasiten ins Blut über und konnten hier am nächsten und übernächsten Tage nachgewiesen werden, am 3. oder 4. Tage nach der Impfung waren aber diese Parasiten wieder verschwunden und weder im Blute noch in der Bauchhöhle konnten Flagellaten gefunden werden.

Die Trypanosomeninfektion wird im allgemeinen von den weißen Ratten sehr gut vertragen. Mattigkeit, geringe Fresslust, vorübergehende geringe Gewichtsabnahme: Das sind die einzigen Krankheitserscheinungen, welche Rabinowitsch und Kempner bei ihren weißen Ratten konstatieren konnten. Keine davon ging an der Infektion zu Grunde. Bei den grauen Ratten vermifsten sie jeden Unterschied zwischen gesunden und spontan infizierten Tieren. Doch beobachteten sie bei künstlich infizierten grauen Ratten zuweilen schwere Krankheitserscheinungen, an deren Folgen sogar einige Tiere eingingen. Leider fehlt jede Andeutung über die Art der Erkrankung und eine Mitteilung über den histologischen und pathologischen Befund ist bisher noch nicht erfolgt.

v. Wasielewski berichtet über den Tod eines jungen Tieres am 25. Tage nach der Impfung. Bei der Sektion zeigte sich die Blase stark mit blutigem Urin gefüllt, im übrigen wurde aber kein Anhalt für die Ursache des Todes gefunden.

Mesnil und Gazeau fanden Temperatur, Körpergewicht, Allgemeinbefinden und Aussehen ihrer Versuchstiere nicht beeinflusst, nur in einigen Fällen fanden sie bei starker Infektion junger Ratten (Verhältnis der Trypanosomen zu den roten Blutkörperchen wie 2—3:1) eine Gewichtsabnahme, die aber allmählich wieder ausgeglichen wurde und den Tieren keinen dauernden Schaden brachte.

Es sind also bisher bei weissen infizierten Ratten nur sehr selten geringe Krankheitserscheinungen wahrgenommen worden. Um so auffallender war es daher, das von meinen Versuchstieren sehr viele erkrankten und anscheinend der Trypanosomeninfektion erlagen. Von 47 weissen Ratten erkrankten 16 etwa am 4.—7. Tage nach der Impfung. Sie zeigten ein struppiges Aussehen, waren nicht so munter wie vorher und nahmen an Gewicht bedeutend ab. Temperaturmessungen wurden anfangs zwar vorgenommen, da es sich jedoch zeigte, das auch bei gesunden, nicht geimpften Tieren die Temperatur im Rektum grossen Schwankungen ausgesetzt war, wurde weiterhin von Messungen Abstand genommen. Die Ratten wurden einige Tage später dyspnoisch, bekamen Ödeme an den Hinterbeinen, zum Teil mit Blutungen ins Unterhautbindegewebe, und starben dann sämtlich, gewöhnlich etwa in der 2. Woche nach der Impfung. Zwei Ratten starben bereits am 4. Tage, eine erst am 25. Tage nach der Impfung. Auffallend war es, das nur junge Ratten erkrankten. Bei alten erwachsenen Tieren konnten nie, auch nicht nach Impfung mit sehr grossen Dosen (2 ccm), und mit Teilungsformen Krankheitserscheinungen wahrgenommen werden. Da aber nicht alle jungen Ratten erkrankten, so wurde durch Impfungen mit sehr grossen und sehr kleinen Dosen, mit alten erwachsenen Parasiten und mit Teilungsformen festzustellen versucht, ob die Dosis und die Beschaffenheit des Impfmateri als den schweren Verlauf der Infektion bedingte. Es liess sich jedoch kein Grund finden, warum die einen erkrankten und starben, die andern die Infektion ohne merkliche Störung überstanden.

Die Sektion ergab in allen Fällen dasselbe Bild. Die Lungen waren im allgemeinen ziemlich blutreich und zeigten

mehrere erbsen- bis bohnegroße dunkelrote Stellen, die stets bis zur Pleura reichten und sich ziemlich derb anfühlten, so daß sie an pneumonische Herde erinnerten. Auf dem Durchschnitt erschien die Schnittfläche jedoch völlig glatt, und im mikroskopischen Präparat sah man starke blutige Infiltrationen im Gewebe und Austritt von Blut in die Alveolen. Trypanosomen fanden sich in auffallend großer Anzahl in der Lunge. Die linke Herzkammer stand in der Diastole. Die Milz war außerordentlich stark vergrößert und die Lymphdrüsen geschwollen. Das Blut enthielt fast immer noch Vermehrungsformen, in einem Falle also noch am 25. Tage nach der Impfung.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß es sich um septische Infektionen bei der Übertragung handelte, wurden bakteriologische Untersuchungen der Peritonealflüssigkeit und des Herzblutes vorgenommen. Nach aseptisch vorgenommener Eröffnung des Peritoneums und des Herzens wurden in jedem Falle je drei Agarausstriche vom Peritoneum und dem Herzblut hergestellt, aber stets blieben die Röhren steril.

Was endlich den natürlichen Infektionsmodus betrifft, so glauben Rabinowitsch und Kempner aus ihren vergleichlichen Versuchen, Ratten durch Fütterung zu infizieren, schloßen zu dürfen, daß eine Infektion auf dem Digestionswege nicht erfolgen kann. Dagegen wurden sie durch die Beobachtung, daß gesunde Ratten, mit infizierten weißen Ratten zusammengebracht, nach 11—15 Tagen Entwicklungsformen in ihrem Blute zeigten, zu der Vermutung gedrängt, die Trypanosomen-Infektion der Ratten könne ein Analogon darbieten zu verschiedenen, durch blutsaugende Insekten verbreitete Infektionskrankheiten. Übertragungsversuche durch intraperitoneale Injektion von Flohkörpern, und die durch Flohstiche erzeugte Infektion einer Ratte, bestärkten sie in ihrer Annahme und ihrer Überzeugung, daß Flöhe als die gewöhnlichen Vermittler der Trypanosomen-Infektion angesehen werden können. Meine in dieser Richtung angestellten Versuche sind noch nicht zum Abschluß gekommen, doch ist es auffallend im Gegensatz zu den Beobachtungen von Rabinowitsch und Kempner, daß monatelang infizierte und

gesunde Ratten in einem Käfig beisammen gehalten werden konnten, ohne daß eine Infektion erfolgte, obgleich die Tiere stark mit Flöhen besetzt waren, während eine spätere Impfung der gesund gebliebenen Tiere in typischer Weise erfolgreich war. Es bleibt indessen die Möglichkeit bestehen, daß die Jahreszeit einen Einfluß auf die Übertragung der Parasiten ausübt. Die Analogie mit der Dourine-Krankheit gab zu Versuchen Veranlassung, ob vielleicht beim coitus eine Übertragung vor sich ginge. Es wurden dreimal gesunde weibliche Ratten mit infizierten männlichen zusammengebracht. Zwei davon wurden trächtig, jedoch ohne Parasiten zu bekommen. Auch in diesen Fällen war eine spätere Impfung erfolgreich.

Außerhalb des Tierkörpers zeigen die Trypanosomen sich außerordentlich lebens- und widerstandsfähig. Danilewsky (1889) bezeichnet diese Eigenschaft als eine charakteristische Eigentümlichkeit der Trypanosomen überhaupt. Nach seinen Beobachtungen bleiben die Parasiten im Blut außerhalb des Tierkörpers 8—9 Tage lebensfähig. In Pipetten oder im mikroskopischen Präparat bei gewöhnlicher Zimmertemperatur aufbewahrt, zeigten sie noch am 5.—8., junge Tiere sogar noch am 10.—12. Tage ihre unveränderte Form und Beweglichkeit. Ein Zusatz von 0,6 proz. Kochsalzlösung zum Blut änderte nichts daran.

Rabinowitsch und Kempner fanden das Blut einer infizierten Ratte, bei Zimmer- und Brutschranktemperatur aufbewahrt, noch nach einer Woche infektiös, wie erfolgreiche Übertragungsversuche an zwei Ratten bewiesen.

Laveran und Mesnil (1900) erhielten die Parasiten im defibrinierten Blut (rein oder zur Hälfte mit Kochsalzlösung verdünnt) im Laboratorium 4—5 Tage, im Eisschrank bei einer Temperatur von $+5$ bis $+7^{\circ}$ etwa 1—1½ Monate lebens- und infektiös. Eine Impfung mit solchem, 23 Tage lang im Eisschrank aufbewahrtem Blute ergab ein positives Resultat; ebenso hatten die beiden Forscher schon früher mit 47 Tage altem Blut zwei Impfungen vorgenommen, von denen eine erfolgreich war. Und obwohl sie am 51. Tage in dem Blute keine

Parasiten mehr mikroskopisch nachweisen konnten, so war doch eine damit ausgeführte Impfung von Erfolg begleitet.

Auch ich hatte Gelegenheit, die Trypanosomen sehr lange außerhalb des Tierkörpers lebens- und infektionsfähig zu erhalten. Selbst bei -5° bis -8° blieben sie mehrere Tage lang im mikroskopischen Präparat lebend. Die Präparate wurden bei dieser Temperatur im Freien hingestellt und am nächsten resp. einem der folgenden Tage wieder untersucht. Zunächst erschienen die Parasiten in dem im warmen Zimmer wieder aufgetauten Präparat regungslos, nach einigen Minuten begannen aber wieder langsame Bewegungen, die sich oftmals nach weiteren 20—30 Minuten zur normalen Schnelligkeit steigerten. Sogar nach siebentägigem Verweilen bei dieser Aufsentemperatur konnten noch bewegliche Trypanosomen im aufgetauten Präparat gefunden werden. In einem Kältegemisch von -17° starben die Flagellaten ab und durch Impfungen mit solchem Blut, welches 2 Stunden lang in dieser Kältemischung gestanden hatte, konnte keine Infektion mehr erreicht werden. Gegen Erwärmung scheinen die Parasiten empfindlicher zu sein. Schon im Wärmkasten bei 45° untersucht, nahmen die Ortsbewegungen oftmals bedeutend an Schnelligkeit zu, doch starben die Trypanosomen bei dieser Temperatur nicht ab. Das Blut wurde in Kapillarröhrchen in zimmerwarmes Wasser gebracht und dann allmählich auf 50° erwärmt. Auf dieser Temperatur wurde das Wasser 2 Stunden erhalten und dann wieder allmählich abgekühlt. Die hernach mit diesem Blute ausgeführten Übertragungsversuche ergaben ein positives Resultat. Doch liegt die obere Temperaturgrenze, bei welcher die Flagellaten lebensfähig bleiben, nur wenige Grade höher. Wenigstens konnte nach zweistündigem Erwärmen auf 58° keine Infektion mehr erreicht werden, und im mikroskopischen Präparat waren keine Parasiten mehr zu finden, sie scheinen bei dieser Temperatur nicht allein abzusterben, sondern auch aufgelöst zu werden.

Am längsten konnten die Trypanosomen im Eisschrank bei $+5^{\circ}$ bis $+10^{\circ}$ in Kapillarröhrchen oder im hängenden Tropfen lebensfähig erhalten werden. Zwei Impfungen mit 32 und 53 Tage lang bei dieser Temperatur aufbewahrtem trypanosomenhaltigem

Blut erzeugten, wie schon oben erwähnt, noch Infektionen mit siebentägiger Inkubationszeit. Bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank starben die Parasiten bedeutend schneller ab, bei 37° spätestens nach 2—4 Tagen, bei Zimmertemperatur (16—18°) nach 1—1½ Wochen. Für die ungünstigen Verhältnisse bei diesen Temperaturen glauben Laverau und Mesnil den Einfluß von Bakterien und die etwaige Einwirkung von veränderten und zerfallenen roten Blutkörperchen ausschließen zu können, weil sie das Blut stets aseptisch entnahmen, und öfters bereits das Verschwinden der Parasiten bei noch intakten roten Blutkörperchen konstatiert wurde. Meine Beobachtungen deuten indessen gerade auf den schädigenden Einfluß der Bakterien im Brutschrank hin. Denn in nicht aseptisch hergestellten hängenden Tropfen waren im Brutschrank bei üppiger Bakterienentwicklung am anderen Tage die Trypanosomen stets abgestorben, während in aseptisch hergestellten Präparaten die Parasiten noch 2—3 Tage lebensfähig blieben. Nach dieser Zeit gingen sie auch in aseptischen Präparaten zu Grunde. Ob der Zerfall der Blutkörperchen für die Lebensfähigkeit der Flagellaten so ganz ohne Bedeutung ist, wie Laverau und Mesnil angeben, vermag ich nicht zu entscheiden. Überzeugen konnte ich mich nicht davon, denn die Parasiten gingen niemals früher als die roten Blutkörperchen zu Grunde.

Um den Einfluß der Bakterien genauer zu beobachten, wurden Trypanosomen mit faulendem Rattenblut zusammengebracht. Es zeigte sich dann unter dem Mikroskop schon nach wenigen Minuten die schädigende Wirkung dieser bakterienhaltigen Flüssigkeit. Die Parasiten nahmen an Beweglichkeit ab, ihre Gestaltsveränderungen erfolgten langsamer und ungleichmäßiger. Ortsbewegungen wurden oft gar nicht mehr ausgeführt, und nach einigen Stunden waren die Trypanosomen abgestorben.

Unter solch ungünstigen Lebensbedingungen verändern die Parasiten öfters in auffallender Weise ihre Form. Schon Danilewsky bemerkte in dem längere Zeit aufbewahrten trypanosomenhaltigen Blut eine Verdickung am hinteren Ende

der Flagellaten. In anderen Fällen sah er eine Verlängerung bis zur doppelten natürlichen Länge. Schliesslich will er bei absterbenden Parasiten die Beobachtung gemacht haben, dass die undulierende Membran und die Geissel allmählich kleiner wurden und endlich verschwanden, während der Körper eine sphärische Form annahm. Künstlich konnte Danilewsky durch Chloroform die Trypanosomen in unregelmässig geformte amoeboiden Körper von durchscheinendem Aussehen verwandeln.

Auch Rabinowitsch und Kempner beobachteten, dass längere Zeit aufbewahrte Parasiten allmählich in ihren Bewegungsträger wurden, sich zu Klumpen zusammenballten und öfters am hinteren Ende eine köpfchenförmige Anschwellung zeigten. Auf die von Danilewsky und auch von Rabinowitsch und Kempner beschriebene Einziehung der Geissel, Auflösung der undulierenden Membran und die Umwandlung des langgestreckten Parasitenkörpers in eine mehr oder weniger ausgesprochene Kugelform brauche ich hier nicht näher einzugehen, da bereits in der Arbeit von v. Wasielewski und Senn nachgewiesen wurde, dass es sich um ungenaue und wahrscheinlich infolge nicht gelungener Geisselfärbung falsch gedeutete Beobachtungen handelte. Indessen zeigten auch in meinen Präparaten die Parasiten oft auffallende Gestaltsveränderungen, und zwar manchmal bereits nach einigen Stunden, besonders wenn im Präparat eine starke Bakterienentwicklung stattgehabt hatte. Das hintere Ende der Flagellaten erschien dann stark verdickt, so dass eine entfernte Ähnlichkeit mit sich zur Teilung anschickenden Trypanosomen vorgetäuscht wurde; eine Ähnlichkeit, die durch das Auftreten zackiger Vorsprünge, welche mit neuen Geisseln verwechselt werden konnten, noch gesteigert wurde. In dem verdickten Teil der Parasiten erkannte man einen grossen glänzenden Körper, welcher bisweilen stark lichtbrechend, bisweilen aber auch ungleichmässig und aus einer Anzahl kleiner Kügelchen zusammengesetzt erschien. Die Bewegungen erfolgten ruckweise und bewirkten fast gar keine Ortsveränderungen. In gefärbten Präparaten solcher Parasiten erschien der Kern sehr aufgelockert, manchmal auch geteilt, das Protoplasma sehr matt gefärbt und

die Geißel öfters auffallend lang. Man geht wohl nicht fehl, wenn man diese Bilder als Degenerationsformen anspricht, besonders da diesen Gestaltsveränderungen stets völlige Auflösung der Parasiten folgte. Öfters wurden diese Formen auch im Herzblut gestorbener und erst nach Verlauf von mehreren Stunden secierter Tiere gefunden.

Eine eigentümliche Eigenschaft der Parasiten bemerkten Laveran und Mesnil zuerst in dem lange Zeit im Eisschrank aufbewahrten Blute. Sie fanden, daß die Trypanosomen sich manchmal schon am 3. Tage, gewöhnlich aber erst später zu Haufen vereinigten. Sie bildeten mit ihrem Hinterende Verschlingungen und führten mit dem Geißelende ihre lebhaften Eigenbewegungen ungestört weiter aus, so daß sich dem Beobachter ein rosettenähnliches Gebilde präsentierte, welches im Centrum ein mehr oder weniger homogenes Aussehen darbot, während in der Peripherie nach allen Seiten in radiärer Richtung die Geißeln der einzelnen Flagellaten lebhaft beweglich erkennbar waren. Im ungefärbten Präparate können derartige Gebilde sehr wohl mit rosettenförmigen Vermehrungsstadien verwechselt werden. Und in der That scheint Danilewsky bei seinen Beobachtungen über die Vermehrung durch Segmentation öfters derartige Knäuel für Vermehrungsformen gehalten zu haben, denn derartige Teilungsformen mit 30—60 Tochterindividuen, wie er sie beschreibt und abbildet, sind nach ihm von anderen Untersuchern nicht wieder beobachtet worden.

Die Knäuel blieben nach den Untersuchungen von Laveran und Mesnil tagelang bestehen und nahmen mit der Zeit noch an Größe zu, ohne daß jedoch sämtliche Parasiten sich zu Knäueln verbanden. Die in den ersten Tagen ungeschwächte Beweglichkeit begann erst nach 20—30 Tagen deutlich langsamer zu werden, und die Trypanosomen nahmen dann ein granuliertes Aussehen an.

Auf diese knäuelbildende Eigenschaft des Rattenblutes wurde ich zuerst aufmerksam, als das Blut einer Ratte, welche ganz plötzlich ihre Parasiten verloren hatte, mit dem Trypanosomen enthaltenden Blute einer anderen Ratte zusammengebracht

wurde. Im hängenden Tropfen konnte man beobachten, wie die Flagellaten sich näherten und nach einigen Minuten mit ihrem hinteren Ende Verschlingungen bildeten. Diese Verbindungen der Parasiten waren anfangs nur sehr locker, dann bei Zusatz von wässriger Methylenblaulösung oder Formol, oder beim Eintrocknen konnte man unter dem Mikroskop beobachten, wie sich ein Parasit nach dem anderen loslöste, bis nach einigen Minuten sämtliche Flagellaten aus ihren Verschlingungen gelöst und wieder frei und isoliert waren. Je länger aber der Knäuel bestand, desto fester wurde die Verschlingung, jedenfalls ließen sich die Trypanosomen später nicht mehr durch die oben genannten Mittel auseinanderbringen. Man konnte daher die Knäuel fixieren und färben, so daß die Struktur genauer beobachtet und die Zahl der Parasiten wenigstens annähernd festgestellt werden konnte.

In solchen Bildern von kleinen Knäueln erscheinen die Geißelenden der Parasiten zwar nicht mehr genau in radiärer Richtung ausgestreckt, aber man erkennt doch noch die rosettenähnliche Anordnung. Bei den größeren Knäueln ist allerdings von einer regelmäßigen Lagerung nicht mehr die Rede, manchmal macht es zwar den Eindruck, als ob auch hier die Hinterenden aneinanderhaften, im allgemeinen liegen aber in den großen Knäueln die Parasiten wirr und planlos durcheinander, wie dies auch von Laveran und Mesnil beschrieben wurde.

Die Zahl der Flagellaten beträgt in den großen Knäueln oft 30—50 und in einzelnen Fällen noch bedeutend mehr, besonders wenn sich mehrere Knäuel vereinigt haben. Diese Verbindung zweier oder mehrerer Knäuel zu einem großen Haufen tritt aber nicht immer ein, oft liegen mehrere große und kleine Knäuel lange Zeit bei einander, und im hängenden Tropfen lassen sie sich oftmals durchaus nicht in ihren Ortsbewegungen durch die Nähe anderer größerer Knäuel stören. Auch finden sich in ihrer nächsten Nähe oft noch einzelne isolierte Parasiten, welche isoliert bleiben, während andere aus weiter Entfernung näher kommen, um sich schließlich mit den Knäueln zu vereinigen. Niemals wurden in Übereinstimmung mit den Beobachtungen

von Laveran und Mesnil alle Parasiten im Präparat zu Knäueln vereinigt gefunden.

Die Ähnlichkeit dieser Knäuelbildung mit der Agglutination der Bakterien veranlafte Laveran und Mesnil, das Serum verschiedener Tiere auf agglutinierende Eigenschaften zu prüfen. Sie fanden, dafs das Tauben- und Rattenblut-Serum keinen Einflufs auf die Parasiten ausübte, während das Serum vom Schaf, Kaninchen, Hund, Pferd und Huhn knäuelbildend wirkte. Die beiden letzten noch in einer Verdünnung von 1:4—5. Bedeutend stärker, nämlich in einer Verdünnung von 1:20, wirkte das Serum von Ratten, welche eine Trypanosomeninfektion überstanden hatten.

Auffallend ist es, dafs Rabinowitsch und Kempner gelegentlich ihrer experimentellen Untersuchung über aktive und passive Immunität der einmal infizierten Ratten diese Knäuelbildungen nicht beobachtet haben. Am Schlufs der Untersuchungen heifst es ausdrücklich: »was die Agglutinationsfähigkeit betrifft, so zeigt das Trypanosomenserum in keiner Weise irgend welche agglutinierende oder entwicklungshemmende Eigenschaften«.

Meine eigenen Untersuchungen bestätigen nun vollauf die Erfahrung von Laveran und Mesnil, dafs das Blut gesunder weifser Ratten niemals, dagegen nach überstandener Trypanosomen-Injektion stets knäuelbildende Eigenschaften zeigt. Ein Unbeweglichwerden vor der Knäuelbildung trat nicht ein, wie es auch von Laveran und Mesnil beobachtet wurde, jedoch zeigten manche Parasiten oft eine veränderte, krampfartig oder ruckweise ausgeführte Bewegung in dem agglutinierenden Serum.

Bei der weiteren Untersuchung zeigte sich nun, dafs die Knäuelbildung nicht immer und überall gleich schnell und gleich stark auftrat. Das Blut mancher Ratten, z. B. derjenigen, welche 3 Tage nach dem Nachweis der gelungenen Infektion plötzlich ihre Parasiten verlor, wirkte sofort sehr stark knäuelbildend, während das Blut anderer Ratten, welche ihre Trypanosomen ganz allmählich verloren (z. B. die beiden grauen) erst nach einigen Stunden deutlich diese Wirkung erkennen liefs. Da nun

die Ratten, wie oben erwähnt, nach einmal überstandener Infektion nicht von neuem infiziert werden können, so war es wichtig, das Verhalten des Blutserums nach solch wiederholten Impfungen zu prüfen. 7 Tage nach dem Verschwinden der Parasiten wurden Ratten von neuem mit trypanosomenhaltigem Blut geimpft, und dann 4 oder 5 Tage später das Serum auf knäuelbildende Eigenschaften geprüft. Dabei zeigte sich, daß diese Eigenschaft nach einer Impfung jedesmal erheblich, mindestens um das Doppelte zunahm, und zwar nicht allein nach der ersten Wiederimpfung, sondern in gleicher Weise nach einer 2., 3. und 4. Wiederholung der Impfung. Durch derartige Einspritzungen konnten also sehr stark knäuelbildende Sera erhalten werden, die das ursprüngliche Serum mindestens um das 4fache in der Wirkung übertrafen.

Auch Menschen-, Pferde-, Mäuse- und Tauben-Serum wurde untersucht. Menschen- und Mäuse-Serum veranlafte keine Knäuelbildung, während Taubenblut-Serum etwas schwächer, Pferde-Serum stärker als das Blut immuner Ratten wirkte.

Worauf übrigens diese Knäuelbildung beruht, ist noch völlig dunkel. Es mag ja nahe liegen, an eine Ähnlichkeit mit der Agglutination der Bakterien zu denken, aber einen thatsächlichen Anhalt für die Verwandtschaft dieser beiden Vorgänge haben wir bisher nicht. Und bevor nicht genaue Untersuchungen und Beobachtungen erfolgt sind, ist jegliche Vermutung über diese Angelegenheit unnütz.

Eine Vermehrung der Parasiten ist außerhalb des Tierkörpers bisher noch nicht beobachtet worden. Zwar berichtet Danilewsky von einer stattgehabten Entwicklung der Trypanosomen in sterilisierten Pipetten. Es ist jedoch nicht deutlich zu ersehen, ob er dieselbe auch bei den Parasiten des Rattenblutes, oder nur bei den Trypanosomen der Frösche und Fische unter dem Mikroskop beobachtet hat. Wahrscheinlich haben ihm auch Knäuelbildungen als Vermehrungsformen imponiert. Rabinowitsch und Kempner konnten niemals eine Entwicklung der Ratten-Trypanosomen außerhalb des Tierkörpers konstatieren. Nur die Teilung der Rosetten in die einzelnen Sprößlinge gelang ihnen im hängenden Tropfen zu verfolgen. v. Wasielewski

und Senn waren nicht so glücklich in ihren Beobachtungen. Im hängenden Tropfen sahen sie nie eine Entwicklung der Parasiten erfolgen, auch nicht bei Bruttemperatur. Insbesondere konnte auch nicht nach stundenlanger Beobachtung einzelner in Teilung begriffener Exemplare ein Fortschreiten der Teilung festgestellt werden.

Auch ich konnte unter dem Mikroskop keine Weiterentwicklung eines bereits in Teilung begriffenen Parasiten beobachten, aber doch scheint die Weiterentwicklung unter bestimmten Umständen auch im hängenden Tropfen vor sich zu gehen. Wurden nämlich unter aseptischen Kautelen mehrere hängende Tropfen von Rattenblut mit jungen Trypanosomen angefertigt, und davon einige in einen Brutschrank von 37° gestellt, so sah man sehr oft am anderen Tag in diesen Präparaten Teilungsformen und Entwicklungsstadien, welche man am Tage vorher nicht darin bemerkt hatte, während eine derartige Veränderung in den im Zimmer aufgestellten Präparaten niemals auftrat. Auch fanden diese Vorgänge nie bei alten Parasiten statt, sondern nur bei jungen, vor der Teilung stehenden, also bei solchen, welche im Blute einer geimpften Ratte am 3.—4. Tage nach der Impfung erschienen. Da nun bei frischen Infektionen die große Menge der Parasiten es unmöglich macht, sich über die Zahl und Form der in einem hängenden Tropfen vorhandenen Trypanosomen genau zu orientieren, so wurden Verdünnungen hergestellt, um jedes Präparat genau durchmustern und die darin vorhandenen Flagellaten zählen zu können. Aber in derartigen, auch noch so schwachen Verdünnungen fand nie eine Entwicklung statt; wahrscheinlich schädigt die angewandte Flüssigkeit die Parasiten. Man mußte daher die zu verschiedenen Zeiten in einem hängenden Tropfen vorhandene Zahl und Form der Trypanosomen auf andere Weise zu vergleichen suchen. Dies geschah folgendermaßen: Es wurden mit derselben Platinöse drei möglichst gleich große hängende Tropfen von dem zu untersuchenden Blute hergestellt. Nr. 1 wurde in den Brutschrank, Nr. 2 ins Zimmer gestellt und von Nr. 3 wurden Deckglausstrich-Präparate gemacht, die darin vorhandenen Parasiten gefärbt und gezählt. Am

anderen Tag wurden dann Zahl und Form der in Nr. 1 und Nr. 2 beobachteten Trypanosomen mit den in Nr. 3 vorhandenen verglichen. Diese Untersuchung nach 24 Stunden wird dadurch außerordentlich erleichtert, daß fast sämtliche Parasiten aus der Mitte des hängenden Tropfens (dem Blutkuchen) an den Rand (in das Serum) treten. Am anderen Tag ergab nun die Beobachtung, daß Präparat Nr. 2 stets dieselben Verhältnisse zeigte wie Nr. 3 am vorhergehenden Tage, während im Präparat Nr. 1 mehr Parasiten und vor allem ganz andere Entwicklungsformen vorhanden und im gefärbten Präparat deutlich nachweisbar waren. Fanden sich z. B. in Nr. 3 dicke, zur Teilung sich vorbereitende Parasiten, so zeigte Präparat Nr. 1 am anderen Tag stets Rosetten und Teilungsformen, während in Nr. 2 keine Vermehrungsform zu entdecken war. Um etwaige Täuschungen und Verwechslungen mit Degenerationsformen auszuschließen, wurden die Präparate nach dem Eintrocknen fixiert und gefärbt, so daß die Verhältnisse im gefärbten Bilde genau mit Nr. 3 verglichen werden konnten.

Diese Beobachtungsart kann selbstverständlich keinen Anspruch auf Exaktheit machen, da aber in den Brutschrank-Präparaten immer wieder dieselben Veränderungen gefunden wurden, und niemals in einem bei Zimmertemperatur aufgestellten Präparat auch nur eine Andeutung einer Weiterentwicklung beobachtet werden konnte, so wird es hierdurch meines Erachtens doch wahrscheinlich, daß unter bestimmten Bedingungen gewisse Stadien der Parasiten sich auch außerhalb des Tierkörpers zu vermehren vermögen. Ob und in wie weit die Misserfolge von v. Wasielewski und Senn etwa auf die Einwirkung des Lichtes zurückzuführen sind, darüber müssen weitere Beobachtungen Aufschluß geben.

Die Arbeiten wurden im hygienischen Institut der Universität Berlin ausgeführt, woselbst mir Herr Geh.-Rat Rubner in liebenswürdigster Weise einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hatte. Für dieses weitgehende Entgegenkommen, sowie

für das stete Interesse für den Fortgang der Arbeiten, spreche ich Herrn Geh.-Rat Rubner meinen ganz gehorsamsten Dank aus.

Auch bin ich Herrn Stabsarzt Dr. v. Wasielewski für die Anregung zu der Arbeit und die Unterstützung bei derselben zu großem Dank verpflichtet.

Litteratur.

- Danilewsky (1889), La parasitologie comparée du sang.
Koch (1898), Reiseberichte über Rinderpest, Tsetse oder Surra-
krankheit u. s. w.
Laveran und Mesnil (1900), De la longue conservation à la glacière des
Trypanosomes du rat et de l'agglomération de ces parasites. (Compt.
rend. de la Soc. de Biologie.)
— (1900), Sur l'agglutination des Trypanosomes du rat par divers sérums.
(Ibidem.)
Lingard (1895), Summary of further report of Surra.
Mesnil et Gazeau (1901), Les Trypanosomes et leur rôle pathogène. (Extr.
des Archives de médecine navale.)
Rabinowitsch und Kempner (1899), Beitrag zur Kenntnis der Blut-
parasiten, speciell der Rattentrypanosomen. (Zeitschr. f. Hygiene und
Infektionskrankheiten, Bd. 30.)
Schilling (1901), Bericht über die Surra-Krankheit der Pferde. (Centralbl.
f. Bakt., XXX, Nr. 15.)
von Wasielewski u. Senn (1900), Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten
des Rattenblutes. (Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, 1900.)
-

Theoretische Betrachtungen über Ansteckung und Disposition.

Von
Otto Ammon.

Hueppe¹⁾ hat schon 1893 ausgesprochen, daß zur Entstehung einer Infektion eine Anlage gehört, welche unter geeigneten Bedingungen die Auslösung der Krankheit durch die Erreger gestattet. Im Jahre 1896 hat Hueppe²⁾ diesen Satz in einem Punkte noch etwas schärfer gefaßt durch die genauere Darlegung, daß sowohl die Krankheitsanlagen als die Virulenz der Erreger von Null bis Unendlich variieren können. Hieraus ergibt sich mit Notwendigkeit, daß die Intensität der Infektion und der Seuchen in weiten Grenzen schwanken kann.

In dem folgenden Jahre hat Gottstein³⁾ das Verhältnis der durchschnittlichen Höhe der normalen Konstitutionskraft C zu der Höhe der pathogenen Eigenschaften sämtlicher zu dem Menschengeschlechte in Krankheitsbeziehungen tretender Parasiten p durch den Bruch $\frac{C}{p}$ ausgedrückt und dieses Verhältnis die »Disposition« genannt.

Es scheint mir jedoch, daß in dem, was Hueppe »Virulenz« und Gottstein p genannt hat, zwei Faktoren zu unterscheiden

1) Über die Ursachen der Gärungen und Infektionskrankheiten und deren Beziehungen zum Kausalproblem und zur Energetik. Berlin, 1893.

2) Naturwissenschaftliche Einführung in die Bakteriologie. Wiesbaden, 1896, S. 152.

3) Allgemeine Epidemiologie. Leipzig, 1887, S. 179.

sind, ein quantitativer und ein qualitativer. Es kommt nämlich erstens auf die Menge der Parasiten an, welche in den Körper innerhalb einer gewissen Zeit eindringen, und zweitens auf die erregende Kraft dieser Parasiten, auf ihre »Virulenz« im engeren Sinne. Eine geringere Zahl sehr virulenter Parasiten kann ebensoviel Wirkung thun, wie eine grössere Zahl weniger virulenter. Die Virulenz im weiteren Sinne ist daher eine Funktion der Zahl und der Ansteckungsfähigkeit der Parasiten, welche in einer Zeiteinheit in den Körper einzudringen vermögen. Bis zu einer gewissen Grenze ist die Hauspolizei im stande, der Eindringlinge Herr zu werden; darüber hinaus entsteht die Infektion, die zum Ausbruch der Erkrankung führt.

Es hat mir geschienen, daß dieses Verhältnis einer näheren theoretischen Untersuchung durch die Anwendung der Wahrscheinlichkeitsrechnung zugänglich sei. Der Übersichtlichkeit wegen unterscheiden wir in dem Folgenden die beiden Faktoren der »Virulenz« nicht, sondern nehmen an, daß wir es jeweils mit einer gewissen Zahl von Erregern von mittlerer Virulenz zu thun haben. Alsdann fragen wir uns:

Wie sind die Krankheitserreger in der Natur verteilt?

Wir wissen durch die Untersuchungen, die an der Luft verschiedener Gegenden und zu verschiedenen Zeiten angestellt worden sind, daß der Gehalt eines einheitlichen Raunteiles Luft an Erregern sehr wandelbar ist. Bald fand man deren viele, bald nur sehr wenige. Es ist auch theoretisch als gewiß anzunehmen, daß nicht jeder Kubikdecimeter Luft, der an uns vorüberzieht, gleich stark mit Krankheitskeimen gemischt ist. Neben dem Kubikdecimeter, den ein Bakteriologe untersucht hat, befand sich zur Zeit der Luftentnahme vielleicht ein anderer Kubikdecimeter mit einem bedeutend größeren oder kleineren Erregergehalt. Etwas Bestimmtes hierüber ist nicht empirisch ermittelt, aber theoretisch können wir allerdings nach der Wahrscheinlichkeit vermuten, daß die Zufälligkeiten des wechselnden Erregergehaltes einem Gesetze folgen, dem alle derartigen Zufälligkeiten ohne Ausnahme unterliegen: der Gaußschen Formel

für die Häufigkeit der Kombinationen. Gemeinverständlich sagt die Formel aus, daß eine gewisse Kombination am häufigsten vorkommt, und daß die Häufigkeit der Kombinationen um so mehr abnimmt, je mehr dieselben in ihrer Zusammensetzung von jenem Mittel abweichen. Quételet¹⁾ hat die Formel auf verschiedene Phänomene angewendet, Galton²⁾ und andere haben auf sie gebaut, um menschliche Begabungen leichtfaßlich darzustellen; neuerdings hat Prof. Ludwig³⁾ in Greiz die Anwendung auf botanische Thatsachen gemacht und damit große Erfolge erzielt. Eigentlich gehört die Formel den Astronomen, welche sie benutzen, um die Beobachtungsfehler unschädlich zu machen; denn auch hier gilt das Gesetz, daß kleine Fehler häufiger sind als große, und daß die Fehler um so seltener werden, je mehr sie von der Wahrheit abweichen.

Es kommt für unsere weitere Untersuchung gar nicht darauf an, ob die Erreger diese oder jene Krankheit hervorrufen, auch nicht darauf, ob sie durch den Mund, durch die Lungen, durch die Schleimhäute, oder durch Verletzungen der Oberhaut ins Innere des Körpers dringen. Es kommt einzig und allein darauf an, wie häufig die Erreger in Gruppen von 1, 2, 3, 4 und mehr Gelegenheit zum Eindringen erhalten. Um aber nicht gar zu abstrakt zu verfahren, mit Rücksicht darauf, daß eine konkrete Annahme meistens leichter verstanden wird, stellen wir uns zunächst die Frage so: wieviele Erreger irgend einer Krankheit werden in einer Zeiteinheit mit der Atemluft eingeatmet? Da können wir nun nach Gaußs mit ziemlicher Bestimmtheit die Annahme machen, daß irgend eine Zahl von Erregern in der Zeiteinheit am häufigsten vorkommen wird, und daß die Häufigkeiten kleinerer und größerer Zahlen beiderseits von diesem

1) *Lettres sur la théorie des probabilités*, Brüssel 1845; *L'Anthropométrie* und andere Schriften.

2) *Hereditary Genius*, London 1869; *Inquiries into Human Faculty*, London 1883; *Natural Inheritance*, London, 1889.

3) *Beiträge zur Phytarithmetik*. *Botanisches Centralblatt* 1897; *Über Variationskurven*, daselbst, 1898; *Die pflanzlichen Variationskurven und die Gaußsche Wahrscheinlichkeitskurve*, daselbst, 1898, u. A.

Mittel symmetrisch abnehmen werden. Um noch konkreter zu sein, sagen wir, die Zahl der in einer Zeiteinheit eingeatmeten Bacillen sei 50, so werden die Zahlen 49 und 51 auch noch ziemlich häufig sein, und die Zahlen 48 und 52, 47 und 53 eine abnehmende Häufigkeit zeigen. Die Abnahme ist jedoch keine gleichmäßige, d. h. sie folgt nicht dem Gesetz der geraden Linie, sondern der mehrgenannten Gaußschen Formel, bzw. der Gaußschen Wahrscheinlichkeitskurve, die in Fig. 1 nebenstehend abgebildet ist. Streng genommen, ist die Kurve im Sinne Huettes eine unbegrenzte, beiderseits von Null bis Unendlich gehende, indem die beiden Arme sich nicht wie in der Figur mit der Abscissenachse bei 0 und 100 verschmelzen, sondern die

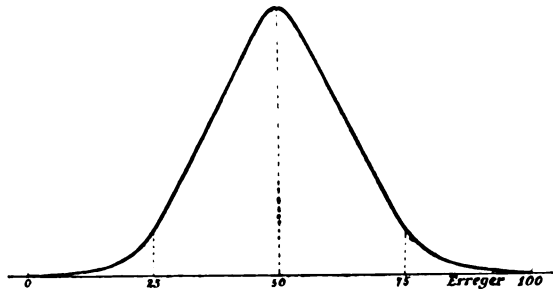


Fig. 1.

Verteilung der Krankheitserreger in der Natur.

Achse zur Asymptote haben; für praktische Zwecke ist dies jedoch unerheblich, da der zwischen der Kurve und der Achse verbleibende Raum verschwindend klein und graphisch nicht mehr darstellbar ist. Luft mit 0 Erregern wird natürlich auch schon ausnehmend selten sein, und Luft mit mehr als 100 wird nicht vorkommen. Wir erkennen aus der Figur, dass schon die Zahlen 25 und 75 verhältnismäßig recht selten sind; überhaupt können wir uns nach dieser Kurve ein ziemlich deutliches Bild davon machen, wie die Krankheitserreger in der Natur verteilt sind, und wie sie bald vereinzelt, bald in kleineren oder größeren Gruppen ihre Angriffe auf den Menschen ausführen. Denn was wie soeben über die Einatmung gesagt haben, können wir nun auf jede Art des Angriffs ausdehnen. Die Verallgemeinerung

ist nicht blofs zulässig, sondern eine logische Notwendigkeit. Es ist nun die Frage, welche Folgerungen für die Ansteckung von Menschen sich hieraus ergeben?

Wie sind die Dispositionen der Individuen verteilt?

Es gibt Individuen, die sehr leicht angesteckt werden und solche, die mehr oder weniger seuchenfest sind. Wenn wir nach einem Mafsstab suchen, um die Gröfse der Disposition auszudrücken, so bietet sich uns im Anschluß an das Vorhergehende die Zahl der Erreger (von mittlerer Virulenz) dar, welche in den Körper eindringen muß, um eine Ansteckung hervorzubringen.

Um die Sache nicht zu verwickelt zu machen, sehen wir zunächst davon ab, daß die Disposition eines Individuums nach Zeit und Umständen wechselt, denn das sind Verhältnisse, die nachher leicht für sich betrachtet werden können. Ebenso kümmern wir uns nicht darum, ob die Disposition angeboren oder erworben ist, sondern suchen nur die vorhandene Disposition exakt zu messen. Gar keinen Einfluß auf unsere Betrachtungen hat der Umstand, daß für die eine Krankheit mehr, für die andere weniger Erreger aufzunehmen sind, um eine Wirkung zu erzeugen: wir denken uns eine Art von Normalkrankheit.

Unter keinen Umständen unterliegt es einem Zweifel, daß die Verteilung der Grade der Disposition zu einer Ansteckungskrankheit ebenfalls durch das Gaußsche Gesetz bestimmt wird. Nennen wir x die Zahl der Erreger, die von der relativ gröfsten Zahl von Menschen gerade noch ohne Schaden ertragen wird (immer innerhalb einer Zeiteinheit), so wird die Zahl der Individuen, welche weniger oder mehr als x Erreger ertragen können, eine etwas geringere sein und die Zahl wird beiderseits von dem Mittel x abnehmen und bei 0 Erregern ebenfalls 0 werden, denn ohne irgend einen Erreger aufzunehmen, wird kein einziger Mensch erkranken. Auch in diesem Falle wird die Abnahme von der Mitte nicht gleichmäfsig in einer geraden Linie vor sich gehen, sondern nach dem Gaußschen Gesetz. Der entgegengesetzte Nullpunkt der Kurve wird daher bei $2x$ zu suchen sein.

Dabei ist jedoch nicht gesagt, daß die Gaußsche Kurve für die Verteilung der Dispositionen genau derjenigen für die Verteilung der Erreger gleichen müsse. Denn die Formel enthält 2 Konstante, die für jeden Fall neu zu bestimmen sind, und nach ihnen richtet sich die Gestalt der Kurve, die auf einer schmalen Grundlinie mehr in die Höhe gezogen, oder auf einer breiten mehr flachgedrückt sein kann. Hierüber habe ich das Nötige in meiner kleinen Schrift »Der Abänderungsspielraum«, Berlin (Ferd. Dümmler) 1896 auseinandergesetzt.

Wir haben nun für die Wechselwirkung der Erreger und der Dispositionen die verschiedenen Möglichkeiten näher zu untersuchen.

Wechselwirkung der Erreger und der Dispositionen.

Wieviele Erreger (von mittlerer Virulenz) erforderlich sind, um einen Menschen anzustecken, ist uns unbekannt. Wenn wir uns aber ins Gedächtnis zurückrufen, daß wir vorhin angenommen haben, es kämen einzelne Schwärme von Erregern (innerhalb der Zeiteinheit) von 100 Stück vor und die häufigste Zahl, gewissermaßen der Normalschwarm, sei 50 Stück, dann ist eines ganz gewiß: die Zahl der Erreger, die der Mensch im Mittel aufnehmen kann, ist entweder kleiner, oder gleich, oder größer als die Zahl 50, die ganze Variationsbreite der individuellen Dispositionen entsprechend kleiner oder gleich größer als 100.

Betrachten wir nun die drei Fälle der Reihe nach, jeden für sich.

a) Erster Fall.

Die Zahl der Erreger, die der Mensch innerhalb einer Zeiteinheit in sich aufnehmen kann, ohne angesteckt zu werden, sei kleiner als 50. Es versteht sich, daß wir für 50 jede andere Zahl setzen können und setzen müssen, wenn die Zahl der häufigsten Erregerschwärme eine andere ist.

In Fig. 2 auf der folgenden Seite haben wir der Einfachheit wegen angenommen, die Zahl der Erreger, denen der Durchschnittsmensch gerade noch widersteht, sei 25. Dann verteilen sich die individuellen Dispositionen zwischen 0 und 50; letzteres

ist die Zahl, bei der jedes Individuum von der Krankheit erfaßt wird. In der nebenstehenden Fig. 2 ist die entsprechende Gestalt der Gauß'schen Kurve dargestellt. Auf der Abscissenachse erstreckt sich die Kurve von 0 bis 50 und der höchste Gipfel findet sich bei 25. Die Ordinaten geben wieder die verhältnismäßige Häufigkeit der Individuen für jeden Grad von Disposition. Wir müssen uns aber vorstellen, daß wir nicht eine absolute Zahl von Fällen als Ordinaten auftragen, sondern eine Verhältniszahl, etwa auf 100 berechnet, und daß wir vorhin bei den Erregern ebenso verfahren seien. Dann ist klar, daß für die Dispositionen der Scheitel der Kurve auf das Doppelte der Ordinate in die Höhe gezogen sein muß, denn die ganze, von der Kurve und der Abscissenachse eingeschlossene Fläche muß hier wie dort 100% ergeben, mit anderen Worten, die eingeschlossenen Flächen müssen in beiden Fällen einander gleich sein.

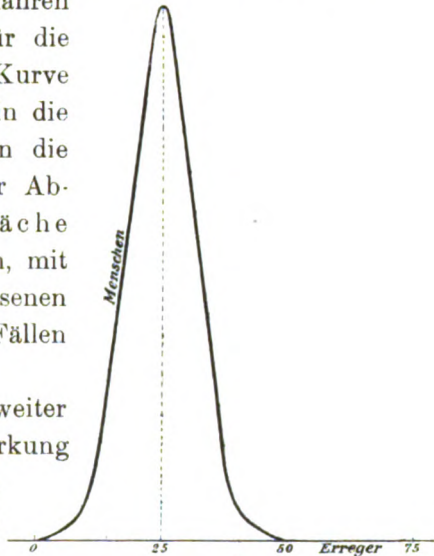


Fig. 2.

Gehen wir nun einen Schritt weiter und fragen wir nach der Wechselwirkung der Erreger und der Dispositionen. Zu diesem Zwecke zeichnen wir die beiden Kurven von Fig. 1 und

Verteilung der individuellen Krankheitsdispositionen bei den Menschen.

Fig. 2 aufeinander, wie dies in Fig. 3 zu sehen ist. Die Nullpunkte decken sich natürlich, denn mit 0 Erregern wird 0 Mensch angesteckt. Was wird nun eintreten? Die Figur gibt Aufschluß. Sämtliche Individuen ohne Ausnahme werden angesteckt werden, denn jedes wird mit einer Zahl von Erregern in Berührung kommen, die zu einer Ansteckung hinreicht. Um dies auszudrücken, ist die ganze Fläche der Kurve der Menschen schraffiert worden. Es gibt keinen Punkt der Menschenkurve, der rechts außerhalb der Erreger-Kurve in den ansteckungsfreien Teil der Abscissenachse fallen würde. Die Frage, ob die angesteckten Individuen

sterben oder genesen, lassen wir hier ganz außer acht, da sie für unsere Betrachtung unerheblich ist; wir haben es nur mit der Disposition zur Erwerbung der Krankheit zu thun. Nach dem weiteren Schicksal der Befallenen werden wir später fragen müssen, es liegt aber kein Grund vor, die Sache jetzt schon mehr als nötig verwickelt zu machen.

Es wäre falsch, anzunehmen, die Individuen, welche durch den in der Höhe über die Erreger-Kurve hinausragenden Teil

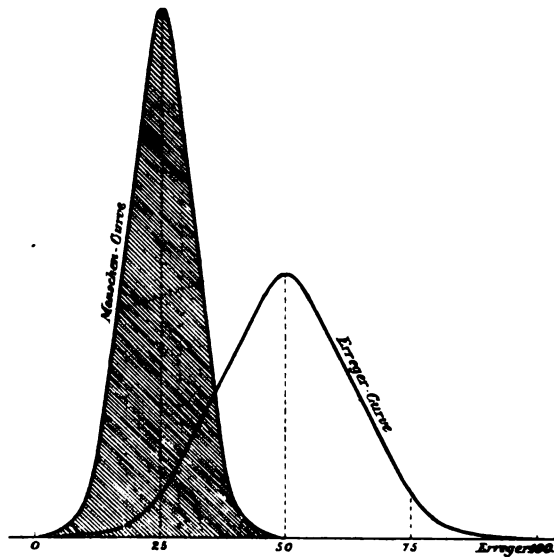


Fig. 8

Wechselbeziehung der Erreger-Kurve und der Menschen-Kurve im Fall 1.

der Menschen-Kurve vorgestellt werden, könnten seuchenfrei bleiben. Die Erreger-Kurve stellt nur die Erreger dar, welche in einer Zeiteinheit sich dem Menschen zur Aufnahme darbieten. Wer sie nicht in der ersten Zeiteinheit aufnimmt, hat in der zweiten, dritten, oder irgend einer folgenden ausreichend Gelegenheit dazu.

b) Zweiter Fall.

Die Zahl der Erreger, die der mittlere Mensch ohne Schaden aufnehmen kann, sei der mittleren Zahl der Erregerschwärme gleich.

Dies ist ein Grenzfall, den wir erhalten, wenn wir in der vorhergehenden Fig. (3) den Endpunkt der Menschen-Kurve von dem Punkt bei der Zahl 50 allmählich über 75 nach 100 rücken und den Scheitel entsprechend erniedrigen. Sind wir bei 100 angekommen, so wird die Menschen-Kurve mit der Erreger-Kurve vollständig zusammenfallen, und es wird sich an den vorhin gezogenen Folgerungen nichts ändern. Die ganze Fläche bleibt schraffiert, denn auch bei dieser Annahme kann kein Mensch der Ansteckung entgehen. Die Fälle a und b können daher keine Dauerzustände darstellen: sie würden die Menschheit ausrotten.

c) Dritter Fall.

Die mittlere Zahl, die der Mensch ertragen kann, sei größer als 50. Dann ändert sich die Sache.

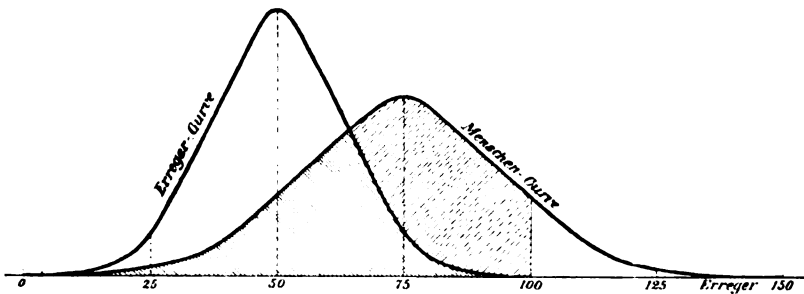


Fig. 4.

Wechselbeziehung der Erreger-Kurve und der Menschen-Kurve im Fall 3.

In der nebenstehenden Fig. 4 haben wir gleich beide Kurven übereinander gezeichnet. Die Erreger-Kurve ist die nämliche wie vorhin, aber die Menschen-Kurve ist auf der Abscissenachse bis in das seuchenfreie Gebiet rechts von dem Punkte 100, und zwar des Beispiels wegen bis zu dem Punkte 150 ausgedehnt. Hier ergeben sich nun sehr bedeutsame Unterscheidungen. Die Individuen, welche in den dunkel schraffierten Teil der Menschen-Kurve fallen, werden unbedingt angesteckt, weil sie jedenfalls mit einer größeren Zahl von Erregern in Berührung kommen als sie ertragen können. Sie sind die ersten und sichersten Opfer, die schon in der ersten Zeit ergriffen werden.

Die entgegengesetzt und lichter schraffierte Fläche zeigt uns Individuen, die nur unter Bedingungen von der Krankheit heimgesucht werden. Ihre Widerstandsfähigkeit liegt größtenteils über Mittel, und die Kurve der Erreger bleibt innerhalb der Menschen-Kurve, d. h. die betreffenden Individuen fallen nur dann der Seuche anheim, wenn sie zufällig in einer Zeiteinheit mit einem der stärkeren Erregerschwärme in Berührung kommen, und diese Schwärme gehören verhältnismäßig zu den selteneren, so daß die Individuen nicht unter allen Umständen ergriffen zu werden brauchen. Alle, bis zur Zahl 100, sind der Gefahr ausgesetzt.

Aber alle zwischen der Zahl 100 und der Zahl 150 — freilich nur ein ziemlich kleiner Teil wegen der Einbuchtung der Kurve sind vor jeder Ansteckung gesichert — sind immun und zwar vollständig immun. Dabei rufen wir aber die Voraussetzung ins Gedächtnis: die Kurve der Erreger hat nur in der Praxis bei 100 ein Ende, theoretisch nähert sie sich der Abscissenachse asymptotisch und verschmilzt sich mit ihr erst im Unendlichen. Das heißt mit Worten, es können unter gegebenen Umständen, ausnahmsweise, auch Erregerschwärme von mehr als 100 Stück vorkommen, und gegen solche abnorme Angriffe sind auch die Individuen unserer Kurve zwischen 100 und 150 nicht mehr gefestigt. Selbstverständlich gilt die gleiche Bemerkung hinsichtlich der Menschen-Kurve, d. h. es giebt immer einzelne Leute, die auch mehr als 150 Erreger vertragen können, aber sie sind gewiß sehr selten und nur als Ausnahmen anzusehen. Machen wir jedoch die Voraussetzung, daß die Menschen-Kurve auf der Abscissenachse bis 200, 300, 400 u. s. w. Erreger gehe, so rückt ihr Scheitel nach 100, 150, 200, d. h. der seuchenfeste Teil der Individuen wird größer und größer. Die Betrachtung dürfte gerade deswegen von Wert sein, weil sie die größere oder geringere Häufigkeit der absoluten Seuchenfestigkeit begreifen lehrt.

Die Erreger-Kurve und die Menschen-Kurve durchschneiden sich in Figur 4 an einem Punkte, dessen Abscisse ungefähr bei der Zahl 64 liegen dürfte; eine rechnerische Bestimmung würde

sehr schwierig und an viele Voraussetzungen geknüpft sein, und der Wert für unsere weitere Erkenntnis würde nicht im Verhältnis zu der Mühe stehen. Zwischen 64 und 100 giebt es Individuen von verhältnismäßiger Immunität, und die Wahrscheinlichkeit, daß solche angesteckt werden, nimmt von 64 bis 100 beständig ab, um bei 100 gleich 0 zu werden. Es giebt also jedenfalls unter den gemachten Annahmen eine gewisse Zahl von Individuen, deren Ansteckung sehr unwahrscheinlich oder praktisch unmöglich ist, neben solchen von absoluter Immunität.

Folgerungen.

Bis jetzt haben wir uns um das weitere Schicksal der erkrankten Individuen nicht bekümmert. Es giebt meines Wissens keine Infektionskrankheit, bei der alle Befallenen sterben müssen, wiewohl der Prozentsatz der Opfer sehr wechselnd ist und bei einigen Krankheiten hoch ansteigt. Aus diesem Grunde ist die Fortsetzung einer allgemeinen Betrachtung von hier an nicht möglich. Wir müßten die verschiedenen Grade von Sterblichkeit und Genesung untersuchen, und das würde sehr umständlich sein. Besonders schwierig wird die Sache dadurch, daß bei manchen Krankheiten die genesenen Individuen auf kürzere oder längere Zeit verschont werden, also eine fast unbedingte Immunität besitzen, während bei anderen Arten von Krankheit gerade die einmal befallen Gewesenen der Gefahr einer Wiederholung besonders ausgesetzt sind.

Um eine Vereinfachung zu erzielen, wollen wir uns an die allerschwerste Form halten und nun einmal uns fragen, was weiter geschieht, wenn alle Erkrankten ohne Ausnahme sterben. In diesem Falle gehen uns die Individuen der dunkel schraffierten Fläche (Fig. 4) gänzlich verloren. Wir können eine neue Kurve (Fig. 5, I) zeichnen, in der die links von Abscisse 64 liegenden Individuen fehlen, die Kurve also erst bei 64 beginnt. Von hier bis 100 nimmt die Wahrscheinlichkeit des Befallenwerdens ab bis zu 100, aber der größte Abstand der Erreger-Kurve und der Menschen-Kurve liegt vermöge der Gestalt der Kurven nicht bei

100, sondern etwas links davon bei 82. Tragen wir uns die Differenzen der Ordinaten, d. h. die der hell schraffierten Fläche auf einer neuen Abscissenachse auf und fügen wir die rechtseitige, unschraffierte Fläche der Menschen-Kurve hinzu, so bekommen wir eine Kurve, die in der nebenstehenden Figur mit *I* bezeichnet ist, und die eine eigentümliche Form hat. Sie ist, wie der Augenschein sofort erkennen läßt und die Überlegung bestätigt, nicht symmetrisch; der Scheitel liegt bei 82 statt bei 100. Solche asymmetrische Kurven entstehen immer, wenn die natürliche Auslese auf einer Seite der Kurve eingreift, oder auch

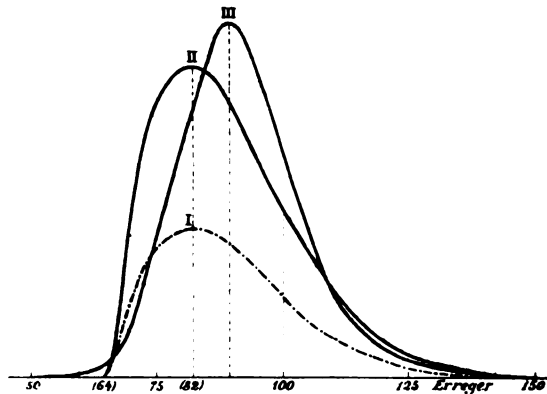


Fig. 5.

Wirkung der natürlichen Auslese und Entstehung neuer Menschen-Kurven in den nächsten Geschlechterfolgen.

dann, wenn dieselbe auf einer Seite tiefer eingreift als auf der anderen Seite des Abänderungsspielraumes. Hierauf braucht nicht weiter eingegangen zu werden, weil dies in meiner vorhin zitierten Schrift ausführlich dargelegt ist. Wir haben auf der Abscissenachse, links von der Scheitelordinate, nur 18 Einheiten, auf der rechten jedoch 68 Einheiten. Das ist die Folge davon, daß die natürliche Auslese auf der linken Seite einen großen Teil der Individuen weggerafft hat.

Ehe wir weiter gehen, müssen wir die Fläche der Kurve wieder auf 100% bringen, um für die weggefallenen Flächen Ersatz zu schaffen und einen gleichen Maßstab anzuwenden.

Wir haben deswegen alle Ordinaten entsprechend im gleichen Verhältnis zu erhöhen und bekommen dadurch die Kurve II, die wieder 100% einschließt.

Bei dieser Kurve bleibt aber die Art (hier der Mensch) nicht stehen, und bei dem ferneren Verlauf der Sache spielt die zweigeschlechtige Fortpflanzung eine bedeutsame Rolle.

Die Kurve II gilt im allgemeinen sowohl für Männer als für Frauen. Bei den Eheschließungen verbinden sich beliebige Individuen ohne Rücksicht auf die Grade ihrer Seuchenfestigkeit miteinander, d. h. es herrscht in dieser Beziehung Panmixie. Es paaren sich Individuen mit geringer Festigkeit mit solchen mit hoher Festigkeit und solche von mittlerer Festigkeit mit solchen von mittlerer, auch solche von niederer mit mittlerer.

Die Kinder eines Paares sind in der Regel sehr verschieden. Wenn ein Erzeuger geringe, der andere hohe Seuchenfestigkeit besitzt, so werden Kinder zum Vorschein kommen, die teils niedere, teils hohe, teils mittlere Festigkeit haben. Die letzteren werden jedoch an Zahl überwiegen, weil auch für diese Verhältnisse die Gaufssche Kurve mit ihrer Ausbauchung in der Mitte Geltung hat. Die Folge ist, daß in der nächsten Geschlechterfolge die mittelguten Individuen etwas zunehmen. Da die Kinder aus den Ehen von Eltern, die beide mittlere Festigkeit besitzen, ebenfalls zum größten Teil mittlere Festigkeit zeigen werden, und die Kinder der Paare mit mittlerer bis hoher, sowie der Paare von mittlerer bis niederer ebenfalls der Mittellinie nahe stehen, so kann man sich die Gestalt der entstehenden Kurve ungefähr vorstellen. Man muß aber dabei den Umstand berücksichtigen, daß die elterlichen Individuen unterhalb des Scheitels (links von demselben) an Zahl seltener sind als die oberhalb, weil die Kurve dort sich nur über 18 Einheiten erstreckt und steiler abfällt, als auf der oberen Seite (rechts), wo sie über 68 Einheiten geht und flacher verläuft. Deswegen wird der Gesamteinfluß der schlechten Seite auf die Gestaltung der Kurve der Nachkommenschaft geringer sein als der der guten Seite, und wir werden mehr gute als schlechte Individuen vor uns haben.

Wegen der Überzahl der mittelguten Individuen wird sich der Scheitel der neuen Kurve etwas heben, und wegen der geringeren Zahl der schlechten und der Überzahl der guten Individuen wird er nach rechts hinüber wandern.

Wir bekommen also für die erste Generation nach derjenigen, auf welche wir zuerst die Auslese wirken ließen, eine Kurve wie die mit III bezeichnete in Figur 5.

Diese Kurve würde von rechtswegen links bei Abscisse 64 endigen, aber nur, wenn es keine Rückschläge gäbe. Bei der Fortpflanzung treten jedoch immer Rückschläge auf, und namentlich die Individuen, die sich unmittelbar rechts von Abscisse 64 befinden, werden in ihrer Nachkommenschaft nicht wenige Individuen zählen, die auf die linke Seite von Abscisse 64 fallen. In der Fig. 5 haben wir deswegen die Kurve III mit ihrem linken Ast nicht bei 64 an die Abscissenachse angeschlossen, sondern sie noch ein Stückchen weiter nach links geführt. Der Punkt des schlechtesten Rückschlages läßt sich theoretisch nicht bestimmen, da man über Rückschläge wenig weiß. Ich habe die Kurve bei 50 in die Abscissenachse einmünden lassen, aber dieser Punkt ist willkürlich gewählt. Für die Theorie ist es gleichgültig, ob die Kurve etwas weiter nach links geht oder nicht.

Wirkt nun die natürliche Auslese auf die neue Generation, die durch die Kurve III dargestellt wird, ebenso ein, wie sie auf die ursprüngliche Kurve in Fig. 4 eingewirkt hat, so werden abermals alle Individuen von weniger als 64 Seuchenfestigkeit und zum Teil auch die zwischen 64 und 100 weggerafft, ganz so, wie es oben beschrieben wurde. Die Zahl derselben ist aber geringer als sie bei den Eltern war. Die Folge ist, daß mit jeder Generation der Gipfel der Kurve sich etwas erhöht und dabei um stets abnehmende Beträge immer weiter nach rechts rückt. Die zweigeschlechtige Fortpflanzung strebt darnach, die Individuen einander ähnlicher zu gestalten, die Abweichungen vom Typus an Zahl einzuschränken, und die Zahl derer, die durch ungenügende Seuchenfestigkeit und durch Rückschlag der Krankheit zum Opfer fallen, kleiner und kleiner zu machen.

Gäbe es keine Rückschläge, so würde bald ein Punkt erreicht werden, an dem alle lebenden Individuen seuchenfest sind und der Anfangspunkt der Kurve bei 50 würde bald über 64 hinaus bis nach 100 rücken, wobei der Gipfel ebenfalls immer weiter nach rechts geschoben würde, ohne jedoch die Mitte der Abscissen zu erreichen. Mit anderen Worten, die natürliche Auslese würde sich ganz rein in der ihr von Darwin zugeschriebenen Rolle zeigen, die Rasse zu verbessern. Die unvermeidlichen Rückschläge vermindern die erfolgreiche Wirksamkeit der Auslese und führen derselben immer neue Opfer in jeder Geschlechterfolge zu.

Wenn nicht alle Angesteckten sterben, sondern viele genesen, aber nun entweder für längere Zeit seuchenfest oder noch weniger widerstandsfähig sind als zuvor, so wird die Sache unübersichtlich. Wird die erlangte Seuchenfestigkeit nicht vererbt, so kann man nur so viel mit Gewissheit sagen, daß je höher die Zahl der Genesungen Befallener ist, desto größer die Zahl der Erkrankungen in den folgenden Generationen sein wird.

Besondere Verhältnisse.

Die Rückschläge sind nicht der einzige Faktor, welcher der natürlichen Auslese Opfer zuführt. Es ist jetzt Zeit, eines Umstandes zu gedenken, auf den schon im Eingang angespielt wurde, den wir aber absichtlich aufser acht ließen, um die Betrachtung nicht zu verwickelt zu machen. Dies sind die besonderen Verhältnisse, in denen die Individuen leben. Ein seuchenfester Mensch kann durch eine vorübergehende Überanstrengung oder schlechte Ernährung in seinem Widerstandsvermögen so geschwächt werden, daß eine geringere Zahl von Erregern hinreicht, um ihn anzustecken. Oft ist es auch eine leichtere, an sich unbedeutende Erkrankung, die den verhängnisvollen Ansteckungskeimen einer tödlichen Seuche den Boden bereitet. Wir erinnern nur daran, wie oft ein Katarrh oder eine leichte Lungenentzündung in Tuberkulose übergehen.

Deswegen sind die Seuchen auf zwei Wegen zu bekämpfen: Einmal durch möglichste Kräftigung der Individuen durch

Volkshygiene, wodurch die Widerstandsfähigkeit erhöht, also mit anderen Worten eine grössere Zahl von Erregern erforderlich wird, um eine Ansteckung hervorzurufen. Sodann durch Verminderung des Erregergehaltes der Luft etc. in der Umgebung der Menschen, wodurch ebenfalls eine bedeutende Zahl von weniger seuchefesten Individuen über die Gefahrgrenze gehoben wird. In diesen Folgerungen treffen wir wieder mit Hueppe zusammen.

Sehr bedeutende Gestaltsveränderungen erleidet die Menschenkurve jedenfalls dadurch, dass bei manchen Krankheiten das einmalige Überstehen derselben für eine gewisse Zeit immun macht, sowie auch durch die spezifische Impfung, die den gleichen Effekt hat. Dadurch werden mehr Individuen auf der rechten Seite der Kurve angehäuft, die vorher auf der linken standen, und es tritt eine Form hervor, die nicht mehr eine reine Gaußsche Kurve sein kann. Diese Verhältnisse sind jedoch so unbestimmt und verwickelt, dass sie sich einer allgemeinen Betrachtung entziehen.

Zum Schluss möchten wir die Aufmerksamkeit einem bis jetzt nicht immer beachteten Umstande zuwenden. Es ist ein grosser Unterschied, ob eine Seuche es namentlich auf das kindliche Alter abgesehen hat und die schwach widerstandsfähigen Individuen beseitigt, wie z. B. Scharlach, Diphtherie, Pocken u. a., oder ob sie, wie die Tuberkulose, einer grösseren Anzahl disponierter Individuen gestattet, das zeugungsfähige Alter zu erreichen und Nachkommenschaft zu hinterlassen. Dadurch wird die erbliche Anlage sozusagen verewigt, und es erklärt sich leicht, warum diese Krankheit eine um so viel grössere Rolle bei den Todesfällen spielt als jene vorgenannten. Die Vermeidung der Heirat Tuberkulöser oder mit tuberkulöser Anlage Behafteten müsste deswegen in den Kreis der prophylaktischen Ratschläge aufgenommen werden.

Ein Rückblick auf das Vorgetragene lehrt auch, warum Menschen, die in eine neue Umgebung versetzt werden, von den dort heimischen Volkskrankheiten viel öfter befallen werden als

die Einheimischen, z. B. Weiße von den bösen Fiebern in Afrika, Neger von der Tuberkulose in Europa. Ihr Zustand ist der von Fig. 4. Sind aber ihre Nachkommen längere Zeit der betreffenden Auslese unterworfen gewesen, so wird ihr Zustand durch Fig. 5 dargestellt mit der abnehmenden Zahl der Opfer. Das nennt man Anpassung.

Unsere Betrachtungsweise ist daher geeignet, über manches klarere und bestimmtere Vorstellungen hervorzurufen, die einigen theoretischen Wert haben, wenn sie auch schwer auf ganz specielle Krankheiten und sonstige specielle Verhältnisse anzuwenden sind.

Versuche über Typhusagglutinine und -Präcipitine

Von

Privatdozent Dr. **Oskar Bail**,
Assistenten des Institutes.

(Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität in Prag.
Vorstand: Prof. F. Hueppe.)

I. Historische Einleitung.

Die ältere Litteratur dieses Gegenstandes ist mehrfach in erschöpfender Weise zusammengestellt worden, so dafs es genügt, auf einige diesbezügliche Arbeiten¹⁾ zu verweisen. Die überaus zahlreichen, seither erschienenen Mitteilungen, die sich auf die durch Gruber-Widal begründete Verwertung des Agglutinationsphänomens zu diagnostischen Zwecken beziehen, kommen für das Folgende kaum in Betracht. Ebenso rückt die Frage nach der absolut qualitativen oder nur relativ quantitativen Specificität der Haufenbildung von Bakterien durch das zugehörige Immuserum mehr in den Hintergrund, während die Erörterung des Wesens der Agglutination und Präcipitation, der haufbildenden und niederschlagenden Eigenschaften des Serums vorbehandelter Tiere in erster Reihe steht.

In Anbetracht der kurzen Bekanntschaft mit diesen Eigenschaften ist die Zahl der mehr minder abweichenden Anschauungen, die von berufenen Forschern hierüber zum Ausdruck gebracht wurden, nicht gering.

1) Namentlich: Bensaude, R., *Le phénomène de l'agglutination des microbes et ses applications à la pathologie*, 1897, Paris. Carré et Naud. Trumpp, J., *Dieses Archiv*, Bd. 31, S. 70 ff.

Der eigentliche Entdecker der Agglutination, Gruber¹⁾, nahm an, daß die im Serum immunisierter Tiere vorhandenen Stoffe, die Agglutinine, die Hüllen der Bakterienleiber zum Verquellen bringen. Infolgedessen werden nunmehr die Bakterienzellen klebrig, haften aneinander, verkleben zu großen Klumpen, selbstverständlich unter Verlust ihrer Beweglichkeit.

Eine weitere Folge der Quellung der Bakterienmembran ist nun ihre leichte Durchgängigkeit für die bakterienfeindlichen Stoffe des Serums, die im normalen Organismus vorhandenen Alexine Buchners, die nunmehr zu einer erhöhten Wirkung ohne weiteres befähigt sind. Abgesehen von dieser, hier weniger interessierenden Erklärung der spezifischen Baktericidie der Immunsera, die sich an die kurz vorher erschienene Anschauungsweise Bordets²⁾ anschließt, machte schon damals Gruber die für die Folge überaus wichtige Beobachtung, daß die Agglutinine durch den Prozeß der Haufenbildung verbraucht werden.

Nach dieser Erklärungsweise ist somit sowohl das Unbeweglichwerden der Bakterien, wie ihr Zusammentreten zu Haufen, etwas Sekundäres, das nur eine notwendige, gewissermaßen mechanische Folge der primären Wirkung ist, welche lediglich die Bakterienmembranen zur Quellung bringt und klebrig macht.

Man kann sofort zugeben, daß eine so tiefgreifende Änderung der Leibeshülle, die zarten Leibesanhänge der Bakterien, die Geißeln vernichtet, und daß damit die Bewegungslosigkeit nach Zusatz von Immunserum aufs beste erklärt wird.

Unerklärt bleibt aber dabei die Erscheinung, daß die Bakterien nun, wie von einer unsichtbaren Gewalt, zu einander hingezogen werden, selbst dann, wenn sie vorher abgetötet³⁾ und in einer so dünnen Aufschwemmung vorhanden sind, daß große Zwischenräume die einzelnen Zellen trennen. Immerhin würde sich schließlich hierfür eine Erklärung vielleicht finden

1) Gruber, Wiener klinische Wochenschr., 1896, Nr. 11 ff., Münchener medicin. Wochenschr., 1896, Nr. 13 (mit Durham), ebenda, 1897, Nr. 17, Autoreferat im Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 19, Nr. 15.

2) Bordet, Annales de l'Institut Pasteur, 1895 u. 1896.

3) Widal et Sicard, Société de biologie, 1897, Januar, u. a.

lassen, etwa durch Flüssigkeitsströmungen, welche die Bakterien einander nähern, und die wohl schwer zu vermeiden sein werden. In der That hat ja Dineur Versuche angeführt, wonach eine Haufen- und Flockenbildung unter Umständen durch passive Bewegungen gefördert werden kann¹⁾.

Die unerläßliche Forderung aber, welche die Grubersche Erklärungsweise erfüllen muß, ist das sinnliche Sichtbarwerden der Quellung. Trotz der Kleinheit von Typhusbakterien oder Choleravibrionen müßte sich diese Erscheinung nachweisen lassen. Thatsächlich ist Ähnliches beobachtet worden²⁾ und besonders die Untersuchungen Rogers³⁾ über das Aufquellen von Soorpilzzellen im Serum dagegen immunisierter Tiere scheinen tiefen Eindruck gemacht zu haben.

Diese Beobachtungen verloren jedoch ihr Gewicht vollständig, als man erkannte, wie reine, nur die Agglutinine enthaltenden Sera wohl typische Haufenbildung, niemals aber Quellung von Bakterien hervorrufen konnten, während diese zu beobachten war, sobald noch Alexin im Serum vorhanden ist⁴⁾.

Die durch Belfanti und Carbone eingeleiteten, durch Bordet, Ehrlich u. v. a. zu hoher Vollkommenheit gebrachten Studien über die Auflösung von roten Blutkörperchen durch normale und spezifische Sera, welcher sehr oft eine Agglutination vorangeht, zeigten dann weiter, daß Haufenbildung auch an Zellen stattfindet, die einer Membran im üblichen Wortsinne entbehren, und die bei reiner Agglutinationswirkung in keiner sichtlichen Weise verändert werden.

Im wesentlichen nur eine Modifikation der Gruberschen Anschauungsweise stellt die Lehre von Dineur⁵⁾ dar, welche auf Veränderungen der Geißeln das Hauptgewicht legt. Eine

1) Dineur, cit. nach Bordet, Annales de l'Institut Pasteur, 1899, Nr. 3; daselbst auch Kritik der Versuche.

2) Reiche Litteraturangaben siehe bei Trumpp, Dieses Archiv, Bd. 31, S. 138 ff.

3) Roger, cit. nach Trumpp.

4) Bordet, Annales de l'Institut Pasteur, 1899, Nr. 3.

5) Dineur, Recherches sur le mécanisme de l'agglutination du bacille typhique. Cit. nach Bordet, a. a. O.; daselbst auch Kritik.

besondere Verbreitung hat diese Lehre, die sich nur auf einen speciellen Fall bezog und für welche z. B. die Haufenbildung der roten Blutkörperchen eine unüberwindliche Schwierigkeit bildet, nicht gefunden.

Auf einem ganz andern Prinzip fußt die Erklärung der Agglutinationsmechanik durch Paltauf¹⁾. Dieselbe wurde ermöglicht durch die schönen Entdeckungen von Kraus²⁾ über spezifische Fällungsreaktionen durch Immunsera. Setzte man nämlich Serum typhus- oder choleraimmuner Tiere zu Filtraten der entsprechenden Bakterienkulturen, so entstand nach einiger Zeit Trübung und Niederschlagsbildung. Diese »präcipitierende« Fähigkeit, die das Serum vorbehandelter Tiere annehmen kann, zurückgeführt auf eigene Stoffe, die Präcipitine, wurde in neuerer Zeit als weit verbreitet erkannt und zum Teil auch für praktische Zwecke diagnostischer Natur verwertet³⁾.

Solche Niederschlagsbildungen sollen nun nach Paltauf auch bei nicht filtrierten, bakterienhaltigen Kulturen entstehen, gewissermaßen mechanisch und sekundär die Bakterien einhüllen, bewegungslos machen und zu großen Haufen zusammenführen. Die überaus ansprechende Hypothese hat ihre ersten Schwierigkeiten in dem Mifsverhältnisse zwischen Stärke der Agglutination und der Niederschlagsbildung gefunden. Die Niederschläge des Krausschen Phänomens kann man mikroskopisch wahrnehmen, sie sind auch der Färbung zugänglich⁴⁾. Selbst bei stärkster Agglutination von Bakterien sieht man aber nichts davon. Ferner

1) Paltauf, Wiener klin. Wochenschrift, 1897, Nr. 10.

2) Kraus, Wiener klin. Wochenschrift, 1897, Nr. 16 u. 32.

3) Um nur einige Beispiele zu geben: Kaninchen mit Hühnerblut behandelt, liefern ein Serum, welches mit Hühnerserum, Kaninchen mit Menschenserum behandelt, geben ein solches, welches mit Menschenserum Trübung gibt. (Bordet, Uhlenhuth u. a.) Vorbehandlung mit verschiedenen Eiweißkörpern läßt ein diese Stoffe aus Lösungen fallendes Serum entstehen (Myers u. a.). In die Reihe dieser Präcipitationserscheinungen gehören wohl auch Versuchsergebnisse, die bisher mit Agglutination s. str. in Zusammenhang gebracht wurden, z. B. die caseinfällende Kraft des Serums von Kaninchen, die mit Milch vorbehandelt sind, sowie die »Agglutination von Tuberkelbacillen« nach Kochs neuesten Mitteilungen.

4) Nicolle, Annales de l'Institut Pasteur, 1898, Nr. 3.

findet die Agglutination gleich intensiv statt, ob man nun reine Bouillonkultur z. B. von Typhusbakterien verwendet, oder aus der gleichen Bouillon die Bakterien durch mehrmaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung reinigt. Wenn auch durch letzteren Vorgang eine Entfernung der niederschlaggebenden Stoffe nicht erreicht werden könnte, eine Verdünnung müßte doch eintreten. Gleichwohl ist kein Unterschied in der Schnelligkeit des Eintretens, wie in der Intensität der Haufenbildung wahrzunehmen. Ferner wurde das zeitliche Mißverhältnis zwischen Entstehung der Fällung und Eintritt der Haufenbildung betont. Erstere braucht oft viele Stunden, letztere tritt binnen wenigen Minuten ein. Diese Schwierigkeit wäre vielleicht nicht unüberwindlich, denn abgesehen davon, daß die Trübung durch Fällung zu einer Zeit, wo sie erst auf unsere Sinne einwirkt, schon vorher unsichtbar thätig gewesen sein kann, so gibt es auch Sera, bei denen Präcipitation wie Agglutination sehr rasch erfolgen, wie weiter unten gezeigt werden wird.

Der Paltaufsche Erklärungsversuch wurde aber unzulänglich, als gezeigt werden konnte, daß präcipitierende und agglutinierende Eigenschaften im Serum vollständig voneinander unabhängig seien, daß man die eine durch entsprechende Bindung aufheben könne, ohne die andere zu schädigen. Diesem Nachweise wird ein eigenes Kapitel gewidmet werden.

Eine eigentümliche Verbindung der Paltaufschen Hypothese mit der Gruberschen Vorstellung des Mechanismus der Haufenbildung findet sich bei Nicolle¹⁾. Der agglutinierenden Substanz im Serum des Immuntieres entspricht eine agglutinable Substanz (substance agglutinée), die sich in den Bakterien selbst, besonders in deren äußerer Schicht findet. Bei länger dauernder Kultur in flüssigen Nährböden, unter Umständen auch durch geeignete Auslaugeweisen, geht sie gelöst in das umgebende Medium über. Die agglutinable Substanz verbindet sich mit der agglutinierenden und dadurch entsteht in Kulturfiltraten Trübung

1) Nicolle. Ch., Recherches sur la substance agglutinée. Annales de l'Institut Pasteur, 1898, Nr. 3; sowie: Comptes rendus de la soc. de biol., 1898 (letztere Arbeit war leider nicht zu erhalten).

und Fällung, in bakterienhaltigen Flüssigkeiten aber, durch Aufquellen der agglutinablen Stoffe in den Zellmembranen und Zusammenfließen der äußeren Schichten benachbarter Mikroben Haufenbildung. Die sehr wertvollen Beobachtungen Nicolles über Beeinflussung seiner agglutinablen Stoffe durch verschiedene äußere Einflüsse werden gelegentlich erwähnt werden. Seine Anschauung über das Wesen der Agglutination steht und fällt mit der Beantwortung der Frage der Selbständigkeit oder gegenseitigen Abhängigkeit der niederschlag- und haufbildenden Fähigkeit des Immunserums.

In anderer Weise als die bisherigen Forscher faßte Bordet¹⁾ das Agglutinationsphänomen auf. Er betrachtete zunächst das Eintreten der Haufenbildung als den Ausdruck der molekularen Attraktion zwischen körperlichen, kleinen Partikeln und der umgebenden Flüssigkeit. Eine solche Veränderung der normalen Attraktion gibt das alte Beispiel einer feinen Thonauflschwemmung, die an sich lange Zeit trübe bleibend, schon nach kurzer Zeit Klärung unter Flockenbildung zeigt, sobald man Kochsalz zusetzt. Später unterschied Bordet zwei Phasen der Agglutination: Die erste ist eine biologische, gekennzeichnet namentlich durch die ausgesprochene Specificität des Vorganges, bei welchem das Agglutinin auf den Bakterien fixiert wird. Erst dadurch, unter dem Einflusse der Agglutinine, wird in der jetzt folgenden zweiten Phase die Molekularattraktion der Bakterien untereinander und mit der umgebenden Flüssigkeit geändert und dadurch das Zusammenfließen zu großen Haufen bewirkt. Letztere Anschauungsweise stimmt überein mit der von Duclaux²⁾ vertretenen Ansicht über das Wesen des Gerinnungsvorganges.

Die Arbeit Bordets bedeutet einen sehr wesentlichen Fortschritt; namentlich die Trennung des Vorganges in zwei Phasen, deren erstere bedingt ist durch die von Gruber entdeckte, lange Zeit nicht genügend beachtete Bindung (Fixation) des Agglutinins an die zugehörigen Bakterien und die erst dadurch

1) Bordet, Le mécanisme de l'agglutination. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, Nr. 3.

2) Duclaux, *Traité de microbiologie*, Bd. II, 1899, Chap. XV u. XVI.

bedingte Ermöglichung der Haufenbildung ist von größter Bedeutung und findet in den folgenden Versuchen ihre Erklärung. Für dieselbe lagen übrigens bereits Versuche in der Litteratur vor, die aber fast ganz vernachlässigt wurden, weil eine Deutung z. Z. unmöglich sein mußte. Hierher gehört die von Ransom und Kitashima¹⁾ beobachtete Thatsache, daß Choleravibrionen, in agglutininhaltiger Bouillon gezüchtet, die Fähigkeit zur Haufenbildung mehr weniger einbüßen.

Die Bordetsche Anschauungsweise macht auch die Bedeutung der Salze einigermaßen verständlich, welche in neuester Zeit in den Vordergrund der Diskussion getreten ist²⁾. Was man den Bordetschen Arbeiten zum Vorwurfe machen kann, ist die nicht genügend scharfe Auseinanderhaltung von Präcipitation und Agglutination, obwohl Bordet selbst es gewesen ist, der diesen Unterschied gegen Palt auf hervorgehoben hat. Allerdings gibt hierfür die weitgehende Analogie, welche er und noch mehr Duclaux (»l'agglutination est une coagulation«) in der Haufenbildung mit der Gerinnung (nach Duclaux' Hypothese) suchen, eine Erklärung. Das von Bordet bei Erklärung der Agglutination herangezogene Beispiel, die Caseinausfällung durch das Serum von Tieren, die mit Milch vorbehandelt wurden, gehört wohl sicher in das Gebiet der Präcipitationserscheinungen.

Gerade für die Untersuchungen an Bakterien muß Haufen- und Niederschlagsbildung auf das Strengste auseinandergelassen werden; denn die Unabhängigkeit der sie bewirkenden Eigenschaften des Serums läßt sich Fall für Fall nachweisen. Das hindert nicht, einen nahen genetischen Zusammenhang beider anzunehmen; denn beide wirken jedenfalls auf nahe verwandte Stoffe der Bakterienzelle, die bei der Agglutination ungelöst im Zusammenhange mit der lebenden oder frisch getöteten Bakterienzelle, bei der Niederschlagsbildung von der Zelle getrennt, im gelösten Zustande in der Flüssigkeit vorhanden sind.

1) Mitteilungen aus dem Institute für experimentelle Therapie in Marburg. III. Deutsche mediz. Wochenschrift, 1898, Nr. 19.

2) Bordet, a. a. O. Joos, Zeitschrift f. Hygiene, XXXVI.

Diese Auseinanderhaltung beider Vorgänge hindert auch nicht, für beide den analogen Mechanismus des Zustandekommens von Haufen und Niederschlagsbildung anzunehmen und zwar im Sinne der Erklärung Bordets, welche von allen bisherigen Versuchen den Thatsachen am meisten gerecht wird.

In welchem Zusammenhange die Versuche der neueren Zeit, die Agglutination als Wirkung von Ausscheidungsprodukten der Mikroorganismen selbst zu betrachten, mit den Befunden im Immuserum stehen, läßt sich gegenwärtig wohl kaum noch entscheiden. Emmerich und Löw¹⁾, die eigentlichen Begründer dieser Anschauung, haben in Müller²⁾ einen Widersacher gefunden, dessen Gründe dagegen nicht leicht zu entkräften sein dürften. Aus eigener Anschauung läßt sich behaupten, daß die Zusammenballung von *Pyocyanusbakterien* am Grunde alter Bouillonkulturen, denn doch mit dem, was wir sonst Agglutination nennen, nur eine sehr oberflächliche Ähnlichkeit besitzt.

Jedoch finden sich ähnliche Angaben in der Litteratur häufig genug, um diese Frage noch als eine offene bezeichnen zu können. Die Angaben von Malvoz³⁾ und Nicolle⁴⁾ gehören u. a. hierher.

II. Teil. Eigene Versuche.

Vorbemerkungen.

Der Verlauf einer intraperitonealen Typhusinfektion beim Meerschweinchen ist bekannt und im allgemeinen so regelmäßig, daß bemerkenswerte Eigentümlichkeiten kaum je auftreten. Ist die Menge der eingespritzten Bakterien groß genug, so sind die Krankheitserscheinungen und der Sektionsbefund völlig übereinstimmend, gleichgültig, ob es sich um virulente oder abgeschwächte Typhusbakterien handelt. Die Tiere werden sehr bald matt, sitzen mit gestäubten Haaren unbeweglich in einer

1) Zeitschr. f. Hygiene, XXXI.

2) Centralblatt f. Bakteriologie, 1900, Nr. 18.

3) Malvoz, Annales de l'Institut Pasteur, 1899, S. 630.

4) Nicolle, siehe Anmerkung S. 311.

Ecke, die Temperatur ist anfangs meist, aber nicht immer, erhöht, um späterhin subnormale Werte anzunehmen. Die Schnelligkeit des Eintretens dieser Symptome, sowie des Todes hängt nur von der Menge der injizierten Bakterien, die natürlich je nach der Virulenz derselben eine ganz verschiedene sein kann, ab.

Das nach dem Tode entnommene Exsudat ist dicht trüb und wimmelt von lebhaft beweglichen Typhusbakterien. Die Zahl der zelligen Elemente ist in der Regel eine mäßige. Polynucleäre Leukocyten herrschen weitaus vor. Häufig zeigen dieselben schon im ungefärbten Präparate unzweideutige Zeichen des Zerfalles.

Immerhin fand sich einige Male ein abweichender Befund. Dies war namentlich der Fall bei Verwendung eines sehr lange auf künstlichen Nährböden fortgezüchteten, wenig virulenten Typhusstammes. Hier kam es, auch nach Anwendung hoher Dosen (1. Agarkultur und mehr) vor, daß die Tiere das gewöhnliche Krankheitsbild darboten, innerhalb 20 Stunden starben, im Peritoneum reichlich Exsudat aufwiesen; aber in diesem waren nur sehr spärliche Bakterien vorhanden, so daß sie zum Versuche nicht hinreichten. Seit den ersten Versuchen Pfeiffers ist dieses Verhalten für Cholera bekannt genug geworden. Bei Verwendung des zweiten, viel virulenteren Typhusstammes, der, in zweiter Generation aus der Galle einer Typhusleiche gezüchtet, hauptsächlich zu den Versuchen benutzt wurde, ereignete sich dieses Vorkommnis niemals, weder nach Anwendung großer noch kleiner Kulturmengen. Die Virulenz betrug zu Beginn der Versuche weniger als eine halbe Öse 20 stündiger Agarkultur. Auf eine genaue Virulenzbestimmung wurde der zahlreichen Tieropfer wegen, sowohl zu Anfang der Versuche, wie auch nach vielfachen Tierpassagen, Verzicht geleistet, da dieselbe für den beabsichtigten Zweck — Erlangung frischen, bakterienreichen Exsudates — in keiner Weise erforderlich schien. Ebenso wurden stets relativ große Kulturmengen, 1 Öse bis $\frac{1}{4}$ Agarkultur (selten mehr) intraperitoneal injiziert, d. h. soviel, um ein Meerschweinchen bis zu 400 g Gewicht sicher binnen längstens 24 Stunden zu töten.

Die Absicht der Versuche war auf die Gewinnung möglichst frischen Peritonealexsudates gerichtet, und es war daher notwendig, sofort nach dem erfolgten Tode des Tieres die Entnahme desselben zu veranlassen. Abgesehen von dem eigenartigen Zustande der »Exsudatbakterien«, der nicht allzulange vorhält, war dies schon mit Rücksicht auf die Möglichkeit eines Durchwachsens der Darmwand von Colonbakterien in der warmen Jahreszeit dringend geboten. Deshalb wurde vielfach der natürliche Tod der Versuchstiere gar nicht erst abgewartet, sondern dieselben wurden in agone, zu einer Zeit, wo sie nicht mehr imstande waren, sich, auf die Seite gelegt, aufzurichten, durch Aufschneiden der Halsadern getötet. Das Exsudat wurde mit steriler Pipette, aus der, mit den erforderlichen Vorsichtsmaßregeln eröffneten Bauchhöhle entnommen. Der Menge nach wechselte es nicht allzusehr: 2 ccm ließen sich fast immer, mehr wie 5 ccm nur selten gewinnen. Die Neigung desselben zu Gerinnung war immer nur sehr gering und kurz dauerndes Schütteln oder Schlagen mit einem dicken Platindraht genügte stets, um es dauernd flüssig zu erhalten.

Wenn übrigens der Zweck des Versuches die Gewinnung des reinen Exsudates nicht geradezu verlangte, so wurde auf das mühsame, oft tropfenweise erfolgende Ansaugen verzichtet, und die Bauchhöhle von vornherein mit physiologischer Kochsalzlösung, bisweilen auch mit keimfreiem destilliertem Wasser ausgespült. In der Regel konnten 20—30 ccm Flüssigkeit nach und nach eingebracht, Därme und Organoberflächen damit abgespült und wieder aufgesaugt werden, ehe die geringe Trübung eine Fortsetzung der Spülung als nicht mehr ergiebig genug erscheinen liefs.

Enthielt das Exsudat gröfsere Mengen von Blut beigemischt, so wurde es nicht verwendet; dies war nur sehr selten der Fall. Sonst sind rote Blutkörperchen nur so spärlich aufgetreten, daß sie erst beim Centrifugieren als dünnste Fleckchen überhaupt bemerklich wurden.

Immer wurden aus dem Exsudate direkt Kulturen (Verdünnung auf schrägen Agarröhrchen) angelegt und so die Rein-

heit geprüft. Das Verfahren reicht übrigens hier nicht aus, wie ein zu Anfang der Versuchsreihe vorgekommener Fall, der Verunreinigung mit *Bacterium coli commune*, lehrte. Ein solches, für eine dem Studium stärkerer oder schwächerer Agglutinierbarkeit gewidmete Versuchsreihe höchst unangenehmes Ereignis läßt sich am frühesten erkennen, wenn man eine volle Öse Exsudats direkt in Bouillon impft und die Kultur sofort in den Brutschrank einsetzt. Nach 3—5 Stunden ist die Trübung stark genug, um einen Agglutinationsversuch mit Immuns Serum zu zulassen, der dann sofort Aufschluss über eine etwaige Verunreinigung giebt.

Was die zunächst verwendeten, agglutinierenden Immuns sera betrifft, so waren sie ausschliesslich von Kaninchen durch intravenöse Einspritzung von bei 60° getöteten Agarkulturen gewonnen. Erst in den späteren Versuchszeiten wurden auch die Sera von auf andere Weise immunisierten Kaninchen sowie die von Hunden in Verwendung genommen. Soweit die diesbezüglichen Erfahrungen reichen, — genaue vergleichende Versuche wurden nicht angestellt, — ist der Hund weit weniger als das Kaninchen befähigt, Agglutinine in seinem Blute auszubilden. Es gelang auch durch oft wiederholte Typhusinjektionen nicht, Hundesera mit einem Wirkungswerte über 1 : 1000 zu erhalten, was bei Kaninchen oft schon nach einer oder wenigen Einspritzungen erreicht wurde.

Was die Anstellung der Agglutinationsversuche betrifft, so standen die üblichen beiden Methoden der mikroskopischen und makroskopischen Beobachtung zur Verfügung. Beide wurden meist gleichzeitig angewendet, so daß die eine Beobachtungsweise die andere kontrollierte. Doch brachte es die ganze Versuchsordnung mit sich, daß in den späteren Stadien der Experimente immer mehr die makroskopische Methode in den Vordergrund trat. Durch das für viele Experimente notwendige Waschen von Bakterien auf der Centrifuge, durch Verwendung größerer Mengen Agarkultur u. dgl. kommt es oft zur Bildung von falschen Häufchen (*»pseudo-amas«* der französischen Autoren), die sich nicht zerschütteln lassen. Filtration durch dichtes Papier, die übrigens sehr vielfach angewendet wurde, bedingt jedesmal

große Verluste an Bakterienmaterial, ganz abgesehen davon, daß sie auch nicht vollständig hilft. Bei mikroskopischer Beobachtung wirkt dies alles sehr störend, wenngleich reichliche Anfertigung von Kontrollpräparaten einigermaßen schützt. Das makroskopisch sichtbare Eintreten der Agglutinationsreaktion wird dagegen durch diese kleinen, falschen Haufenbildungen nicht beeinträchtigt, da sich dieselben nicht zu Boden setzen und überdies das Entstehen der Flockenbildung unter Klärung der zwischen den Flocken liegenden Flüssigkeit unter dem Einflusse eines Immunerums so charakteristisch ist, daß es kaum mit etwas Anderem verwechselt werden kann.

Die schon in den ersten Arbeiten Grubers hervorgehobene, allseitig bestätigte Thatsache, daß die mikroskopische Beobachtung der makroskopischen an Empfindlichkeit weit überlegen sei, kam bei den hochwertigen Seris, die in Verwendung genommen wurden, nicht in Betracht.

Zur Ausführung der Reaktion wurden kleine, schmale Eprovetten, welche sich übersichtlicher aufstellen lassen als die sonst für die Gruber-Widalsche Reaktion vielfach beliebten Standgläschen verwendet. Mischung von gleichviel Tropfen Bakterienaufschwemmung und Serum oder sonstiger Flüssigkeiten gestattet die gleichzeitige Herstellung zahlreicher Proben mit verhältnismäßig geringen Mengen Materials.

Von Wichtigkeit ist weiterhin die Aufbewahrung der Versuchsproben (sowohl der Mischungen für die makroskopische, als der hängenden Tropfen für die mikroskopische Beobachtung), sowie die Zeitdauer der Versuche. Durchgehends wurde immer bei 37° gearbeitet. Die hängenden Tropfen wurden sofort nach ihrer Anfertigung in geeigneten Gestellen aus durchbrochenem Eisenblech in den Brutschrank gestellt, nach bestimmten Zeitabschnitten so rasch wie möglich durchmustert und wieder in die erhöhte Temperatur zurückgebracht. Die Anfertigung oft sehr zahlreicher hängender Tropfen mit den notwendigen Kontrollen bedingt eine, oft recht beträchtliche Zeitungleichmäßigkeit, da naturgemäß zwischen Fertigstellung des ersten und letzten Präparates eine gewisse Zeit verfließen muß. So kann es ge-

schehen, daß die Bakterien des einen Präparates wohl eine Viertelstunde länger der Serumwirkung ausgesetzt sind als die eines zweiten. Da sich dieser Übelstand auch bei raschestem Arbeiten nicht beseitigen läßt, so wurde wenigstens als Regel eingehalten, daß die Präparate, welche voraussichtlich die schwerer agglutinierbaren Bakterien enthielten, zuerst angefertigt wurden und dann erst die Kontrollpräparate. Die Zeit wurde vom Augenblicke des Einsetzens in den Brutschrank an gerechnet.

Bei der makroskopischen Arbeitsweise fällt auch dieser Übelstand viel weniger ins Gewicht, da der Zusatz der Bakterien-suspension zu den sonstigen, bereits fertiggestellten Mischungen nur sehr wenig Zeit in Anspruch nimmt.

Was die Beobachtungsdauer betrifft, so konnte diese, schon aus den im Versuche liegenden, später näher auszuführenden Gründen, nicht allzusehr ausgedehnt werden. Aber auch sonst dürfte sich bei Anstellung der Versuche bei Körpertemperatur eine Ausdehnung der Beobachtung über 2 Stunden hinaus nicht empfehlen. Die überaus zahlreichen Versuche mit allen möglichen Serumverdünnungen und sonstigen Körperflüssigkeiten haben gelehrt, daß wenn eine Haufenbildung im hängenden Tropfen bei 37° nach $\frac{1}{2}$ Stunde nicht eingetreten ist, sie überhaupt ausbleibt oder jedenfalls nicht mehr als sicher beweisend angesehen werden kann. Wohl aber kann es zweckmäßig sein, zum Studium besonderer Wachstumsverhältnisse unter dem Einflusse eines agglutinierenden Serums, namentlich der in der vorliegenden Versuchsreihe so oft beobachteten Pfaunderschen Fadenreaktion, die Präparate längere Zeit bei 37° zu belassen. Was für die mikroskopische Beobachtung gilt, kann nicht ohne weiteres auf die makroskopische im Reagenzglase übertragen werden. Hier wird eine Haufenbildung thatsächlich oft erst nach 2 Stunden und nach noch längerer Zeit erst deutlich. Wenn trotzdem auch hier in der Regel der eigentliche Versuch nach zweistündigem Aufenthalt bei 37° abgebrochen wurde, so liegt der Grund hierfür teils in besonderen, erst später zu würdigenden Verhältnissen, teils in der starken Wirkung der hier meist konzentriert verwendeten Sera, welche in normalen Kontroll-

proben schon nach Verlauf von Minuten vollständige Agglutination bewirkten.

Die Herstellung der Kontrollproben war von besonderer Wichtigkeit. Im ersten Teile der Versuche, wo es sich darum handelte, die Wirkung eines und desselben Immuserums einerseits auf Typhusbakterien aus dem Peritonealexsudate von Meerschweinchen, anderseits auf künstlich gezüchtete Kulturen zu vergleichen, wurden dazu Impfungen in Bouillon benutzt. Das Impfmateriel bildete dieselbe Agarkultur, welche auch zur Infektion des betreffenden Versuchstieres diente. Dabei standen die Proben ebensolange bei 37° als das Tier lebte, im ungefähren Mittel also 20 Stunden. Sie wurden darauf ganz denselben Manipulationen unterworfen, die sich für die Gewinnung und Verarbeitung der Bakterien aus dem Meerschweinchenexsudate als notwendig erwiesen, z. B. Centrifugieren, Waschungen u. dgl.

Später, als alle Versuche ohne Verwendung von Tieren vorgenommen werden konnten, dienten die gleichen, höchstens 18 Stunden alten Agarkulturen sowohl zum Versuche, wie zur Kontrolle.

A. Versuche an tierischen, bacillenreichen Exsudaten.

Den Ausgangspunkt aller weiteren Untersuchungen bildete die Erscheinung, daß Typhusbakterien aus dem Exsudate intraperitoneal inficierter Meerschweinchen viel weniger Neigung zeigen, auf Zusatz eines Immuserums zu Haufen zusammenzutreten, als gewöhnliche, etwa in Bouillon gezüchtete.

Von den ersten, mit dem sehr wenig virulenten, lange auf künstlichen Nährböden gezüchteten »Typhus Prag« angestellten Versuchen sei der folgende angeführt. Das dabei verwendete, sehr hochwertige Immuserum stammte von einem, mit toten Agarkulturen immunisierten Kaninchen.

Versuch I.

Meerschweinchen 6, 240 g, erhält 1 Agarkultur Typhus in 5 ccm Bouillon intraperitoneal. Stirbt nachts. Aus der Bauchhöhle lassen sich ca. 4 ccm trüben Exsudates mit relativ wenigen Zellen, aber sehr zahlreichen, mächtig beweglichen Bakterien entnehmen.

a) Mikroskopische Beobachtung. Das Exsudat wird ohne weiter verändert zu sein, in hängenden Tropfen mit Serumkochsalzverdünnung 1 : 7500,

10 000, 12 500, 15 000, 20 000, 30 000 versetzt. Ebenso eine gleichzeitig mit der Tierimpfung angelegte Bouillonkultur. Beobachtung bei Zimmertemperatur.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. ist in allen Tropfen mit Bouillonkultur typische Agglutination eingetreten, doch sind die Häufchen von der Verdünnung 1 : 15 000 an noch klein. Das Exsudat zeigt nur bei 1 : 7500 durch teilweise Immobilisation einen Unterschied gegen die serumfreie Kontrollprobe.

Nach $\frac{3}{4}$ Stunden: Unverändert.

Nach 1 Stunde: Alle Bouillonkulturproben typisch agglutiniert. Exsudat unverändert, jedenfalls von 1 : 10 000 an keinerlei Serumwirkung.

Die Verhältnisse ändern sich weiterhin nicht mehr.

Hängende Tropfen mit Serumverdünnungen 1 : 1000 zeigten schon nach $\frac{1}{2}$ Std. deutliche Serumwirkung, bestehend in Immobilisation, sowie später in Bildung sehr großer lockerer Haufen, unter denen aber noch überall freie, z. T. bewegliche Bakterien vorhanden waren.

Das Resultat des Versuches war, daß die Typhusbakterien im Exsudate erst bei einer Serumverdünnung 1 : 1000 — 7500 beeinflusst wurden, während das gleiche Serum Bouillonkultur noch bei 1 : 40 000 in typischer Weise agglutinierte.

b) Makroskopische Beobachtung. Je 1 ccm verdünnten Exsudates bzw. Bouillonkultur erhält einen Zusatz von 0,2 ccm der Serumverdünnung 1 : 100, 1000, 5000. Versuch bei 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Bouillon: Agglutination bei Serum 1 : 100 und 1000 weit vorgeschritten, bei 1 : 5000 undeutlicher Beginn. Exsudat: keine Serumwirkung.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. Bouillon: Beendete oder weit vorgeschrittene Agglutination. Exsudat: ohne Veränderung.

Nach $\frac{3}{4}$ Std.: Bouillon völlig geklärt, Exsudat unverändert.

Nach 1 Std.: zeigt erst das Exsudat mit Serum 1 : 100 schwach sichtbare Häufchen.

Nach 1 $\frac{1}{2}$ Std. sind sie deutlicher geworden und auch Exsudat mit Serum 1 : 1000 zeigt spurenweise ein Beginnen der Reaktion, das bei 1 : 5000 erst nach 2 Std. zu konstatieren ist. Erst nach 5 Std. ist die Reaktion in allen Proben vollständig geworden.

Schon in diesem Versuche tritt die charakteristische Unempfindlichkeit der Exsudatbakterien gegen die Agglutinine des Immuserums sehr deutlich hervor. Noch viel schöner tritt dies bei dem folgenden Versuche mit dem frisch aus der Leiche gezüchteten Typhusstamme hervor, mit dem dann alle weiteren Experimente angestellt wurden.

Meerschweinchen 16. Erhält 19./I. 1901 2 Ösen Typhusagarkultur intraperitoneal. Stirbt 20./I. 7 Uhr a. m. Aus der Bauchhöhle des noch warmen Tieres lassen sich 5 ccm dicht trüben Exsudates mit zahllosen, mächtig beweglichen Bakterien und wenig roten und teilweise zerfallenden weißen Blutkörperchen entnehmen.

Versuch II.

Es werden sofort hängende Tropfen mit dem frischen Exsudate und Serumverdünnungen 1 : 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 angelegt. Kontrolle mit Bouillonkultur wie beim ersterwähnten Versuche. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Bouillonkulturen sämtlich vollständig agglutiniert. Exsudat mit Serumverdünnung 1:100: Massenhaft freie zum großen Teil bewegliche Bakterien. Daneben aber auch Bildung ziemlich lockerer, großer, in die Länge gestreckter Haufen, die unmittelbar an der Unterseite des Deckglases haften, während die tieferen Schichten des Tropfens von freien Bakterien wimmeln. Dasselbe Verhalten zeigen die Präparate mit den Serumverdünnungen 1 : 250, 500 und teilweise noch 1 : 750, von 1 : 1000 an fehlt jede Serumwirkung.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. ebenso.

Nach 1 Stunde: Auch in den Exsudatproben 1 : 1000 und 2000 sind die eigenartigen Haufen unter der Oberfläche aufgetreten, aber in viel schwächerer Ausbildung. Weitere wesentliche Veränderungen treten nicht ein.

Versuch III.

Das gleiche Exsudat mit Verdünnungen desselben Serums 1 : 10, 20, 40, 60, 80 und mit reinem Serum. Kontrolle Bouillonkultur 1 : 80.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Bouillonkultur vollständig agglutiniert. Exsudat mit reinem Serum zeigt überall nur größere und kleinere typische Haufen mit freien Zwischenräumen, vollständige Agglutination. Ein ähnliches Bild liefert die Serumverdünnung 1 : 10, doch finden sich hier schon freie, aber unbewegliche Bakterien in ziemlicher Zahl zwischen den Haufen. Die übrigen Serumverdünnungen haben die vorhin beschriebenen langgestreckten Anhäufungen an der Unterseite des Deckglases hervorgerufen, während in den tiefen Flüssigkeitsschichten nur freie bewegliche Bakterien vorhanden sind.

Nach 1 Stunde. Nur das reine Serum und die Serumverdünnungen 1 : 10 und 1 : 20 haben vollständige Agglutination hervorgerufen, d. h. außer den oberflächlichen großen, langgestreckten Anhäufungen zeigen auch die tieferen Schichten vorwiegend kleinere und größere typische Haufen, während freie unbewegliche Bakterien in den Zwischenräumen an Menge zurücktreten. Doch ist die Zahl dieser letzteren bei Serum 1 : 20 bereits eine ansehnliche. Die übrigen Proben wie vorher.

Nach 2 Std. keine wesentliche Veränderung.

Bezeichnet man als vollständige Agglutination eine solche, bei welcher die Bildung von fest zusammenschließenden Bakterienhaufen so überwiegt, daß die von ihnen freigelassenen Zwischenräume keine oder nur wenige, nicht zusammengeballte und jedenfalls keine beweglichen Bakterien mehr enthalten, so hat die Wirkung des Serums, über 1 : 20 hinaus verdünnt, den Exsudatbakterien gegenüber versagt. Da das verwendete Serum Bouillon-

kulturen vom Typhus bis 1:10000 noch vollständig zu agglutinieren vermochte, so war seine Wirkung gegen die im Tiere gebildete Typhusgeneration etwa 400mal schwächer. Jegliche Haufenbildung im Exsudate blieb bei ca. 1:2000 bis 1:3000 Serumverdünnung aus, also auch dann noch ergibt sich eine ca. 5mal geringere Wirkung des Serums.

Immerhin ist aber die Wirkungslosigkeit des Immunserums und die Nichtagglutinierbarkeit der Bakterien nur relativ. Denn einerseits bringt reines und wenig verdünntes Serum eine vollständige Agglutination hervor und andererseits bewirken auch stärkere Verdünnungen eine rudimentäre Haufenbildung. Diese sieht allerdings etwas anders aus als diejenige, welche in Bouillonkulturen eintritt. Erreicht man mit solchen in hängenden Tropfen die Grenze der Serumwirkung, so entstehen die bekannten Bilder der kleinen Häufchen neben beweglichen Bakterien, oder wenn grössere Haufen entstehen, so enthalten sie selbst noch mehr oder weniger mobile Stäbchen. Bei der unvollständigen Agglutination aber, wie sie bei den Exsudatbakterien eintritt, handelt es sich um sehr grosse, außerordentlich in die Länge gestreckte, untereinander vielfach verbundene Haufen von unbeweglichen, ziemlich dicht gedrängten Zellen, die in den oberflächlichsten Schichten des Tropfens eine Art Netzwerk bilden, während in den tieferen Schichten jede durch Serumwirkung veranlasste Zusammenballung vollständig fehlt. Der Umstand, daß diese sonderbare Erscheinung in gleicher Weise bei sehr verschiedener Verdünnung des Serums (im vorliegenden Versuche z. B. ebenso bei 1:50 wie bei 1:500) auftritt, weist jedenfalls darauf hin, daß es sich dabei nicht um eine Grenz Wirkung des Serums handeln kann.

An dem abweichenden Verhalten der Exsudatbakterien der Wirkung des Typhus-Immunserums gegenüber könnten äußere Verhältnisse Schuld sein. Thatsächlich stellte sich zunächst bei allen Versuchen heraus, daß das Exsudat der mit so reichlichen Mengen Typhuskultur geimpften Meerschweinchen in dem gleichen Flüssigkeitsquantum sehr viel mehr Bakterien enthielt als die entsprechende gleich alte Bouillonkultur. Durch entsprechende

Verdünnung des Exsudates liefs sich diese Ungleichmäfsigkeit beseitigen.

Versuch IV.

Exsudat von demselben Meerschweinchen wie auf S. 321 wird im Verhältnisse 1 : 25 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Im mikroskopischen Präparate zeigt es sich, dafs darnach im hängenden Tropfen weniger Bakterien vorhanden sind als in der unverdünnten Bouillonkultur. Es werden Präparate mit Serumverdünnung 1 : 100, 250, 500, 750, 1000, 3000 und 5000 angelegt. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Alle Bouillonpräparate in vollständiger, starrer Agglutination. Exsudat: In den Verdünnungen bis 1 : 500 vielfach, aber nicht durchgehends Immobilisation, aber keine Haufenbildung. Von 1 : 750 an fehlt jede Serumwirkung.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. unverändert.

Nach 1 Std. Bouillonpräparate wie vorher. Exsudatverdünnung mit Serum 1 : 100: Fast vollständige Immobilisation, sehr kleine Häufchen in geringer Zahl. Das Bild ist das einer Endreaktion bei der Gruber-Widalschen Probe. Exsudatverdünnung mit Serum 1 : 250: Sehr wenige kleine Häufchen, sehr viele Bakterien beweglich. Die übrigen Proben enthalten nur freie, bei 1 : 500 noch zum kleinen Teil unbewegliche, sonst wimmelnde Bakterien.

Nach 2 Std. keine wesentliche Veränderung.

Versuch V.

Meerschweinchen 17, mit 1 Öse Agarkultur intraperitoneal infiziert, nach 16 Std. gestorben. Aus der Bauchhöhle des noch warmen Tieres lassen sich 3 ccm trüben Exsudates entnehmen. Danach wird die Bauchhöhle nach und nach mit 20 ccm physiologischer NaCl-Lösung ausgespült, das noch stark trübe Spülwasser durch dichtes Fließpapier filtriert und zu hängenden Tropfen mit reinem Serum und Verdünnungen desselben 1 : 10, 25, 50, 75, 100, 500, 1000 verarbeitet. Kontrolle mit Bouillonkultur und Serumverdünnungen 1 : 100, 1000, 5000, 6000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Bouillonkultur mit Serum 1 : 100 vollständige Agglutination mit grofsen, 1 : 1000 mit kleinen Haufen, 1 : 5000 sehr unvollständige, 1 : 6000 keine Agglutination. Spülwasser mit reinem Serum und Verdünnung 1 : 10 Immobilisation, keine Häufchenbildung. Die übrigen Präparate enthalten meist bewegliche Bakterien.

Nach $\frac{1}{2}$ Std: Bouillonkultur durch alle Serumverdünnungen vollständig agglutiniert bis auf 1 : 6000, wo noch viele freie, aber unbewegliche Bakterien vorhanden sind. Spülwasser mit reinem Serum: Häufchen von 5—10 Individuen, daneben freie, unbewegliche Bakterien in grofser Zahl. Ähnlich, aber mit noch spärlicheren Zusammenlagerungen bei Verdünnung 1 : 10 und 1 : 25. Bei 1 : 50 tritt bereits an vielen Individuen eine träge Beweglichkeit auf; von 1 : 100 an keine Beeinflussung durch das Serum mehr.

Nach 1 Std. hat die Haufenbildung durch die Serumverdünnungen bis 1 : 50 weitere Fortschritte gemacht, doch treten schon bei 1 : 50 viele bewegliche auf, die in den stärkeren Verdünnungen das Gesichtsfeld völlig beherrschen.

Nach 2 Stunden: Agglutination im Spülwasser ziemlich vollständig bis zur Serumverdünnung 1 : 25, von da an alles von frei beweglichen Bakterien wimmelnd

Nach 5 Std. ist überall Vermehrung festzustellen und zwar in den Spülwasserpräparaten mit Serumverdünnungen bis 1 : 75 mit ausgesprochenem Pfaunderschen Phänomen.

Die angeführten Versuche zeigen bereits deutlich, daß die größere Zahl der Bacillen im Exsudate das Versagen der Serumwirkung nicht erklären kann. Es geht aber daraus auch hervor, daß bei starker Verdünnung die Bildung der oberflächlichen, an der Unterseite des Deckglases haftenden langgestreckten Haufen entweder vollständig ausbleibt oder, wie in anderen Versuchen, doch wesentlich schwächer ist, wie im unverdünnten Exsudate, wo sie niemals fehlte.

Es wäre nun daran zu denken, daß diese merkwürdige Anordnung der Bakterien durch Gerinnen des Exsudates veranlaßt werde. Das Aussehen dieser Haufen würde allerdings einige Ähnlichkeit mit Zusammenballungen von Bakterien darbieten, die etwa durch Fibrinfäden zusammengehalten werden. Damit würde übereinstimmen, daß diese Haufenbildung im verdünnten Exsudate ausbleibt. Nun ist allerdings von einer eigentlichen Gerinnung des Exsudates in der Regel nichts zu bemerken, aber es wäre immerhin möglich, daß in der kleinen Flüssigkeitsmenge des hängenden Tropfens physikalische Verhältnisse herrschen, die eine volle Wirkung des Serums nicht zulassen. Daß aber die bloße Gerinnung weder die Nichtagglutinierbarkeit der Exsudatbakterien noch die Bildung der oberflächlichen Haufen erklärt, beweisen jene seltenen Fälle, wo auch im verdünnten Exsudate, bezw. im Spülwasser, aus der Bauchhöhle noch eine makroskopisch sichtbare Gerinnung eintrat und die Agglutination vor und nach Beseitigung derselben beobachtet wurde.

Versuch VI.

Meerschweinchen 19 war noch intraperitonealer Infektion mit $\frac{1}{4}$ Öse Agarkultur binnen 18 Std. gestorben. Aus der Bauchhöhle ließen sich 3 ccm dicht trüben Exsudates entnehmen, dessen Bakterien nach Filtration durch Fließpapier durch Immunsrum (das gleiche wie im Versuch V) nur bis zur Verdünnung 1 : 10 vollständig, bei 1 : 50 bereits ganz unvollständig agglutiniert wurden. Die Bauchhöhle wurde mit 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung

ausgespült, das trübe Spülwasser durch Papier filtriert und das Filtrat mit reinem Serum und den Verdünnungen 1 : 10, 25, 50, 100, 500 versetzt. Kontrolle mit Bouillonkultur in der bisherigen Weise. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Proben mit Bouillonkultur vollständig agglutiniert. Spülwasserfiltrat mit reinem Serum zeigt fast durchgehende Immobilisation mit Bildung weniger, kleiner Häufchen. Verdünnung 1 : 10 hat nur einen Teil der Bakterien unbeweglich machen können, sonst fehlt jede Serumwirkung.

Nach 1 Std. ist im Spülwasser mit konzentriertem Serum ziemlich vollständige Agglutination eingetreten, bei 1 : 10 ist die Zahl der meist sehr kleinen Häufchen sehr gering, nur wenig Serumwirkung ist bei 1 : 25 zu sehen.

Nach 2 Stunden kann man im reinen und 1 : 10 verdünnten Serum von vollständiger, bei 1 : 25 von unvollständiger Agglutination sprechen, die übrigen Proben lassen eine Serumwirkung nicht erkennen.

Während der Beobachtung der hängenden Tropfen war das bei Zimmer-temperatur aufbewahrte Spülwasser durch Gerinnung zu einer zitternden, gallertigen Masse erstarrt. Durch Schlagen mit einem starken Platindraht werden aus derselben große Mengen am Drahte anhaftender viscoser Substanz entfernt; dann wird noch heftig geschüttelt und neuerdings durch Papier filtriert. Das viel weniger wie beim ersten Versuche trübe Filtrat wird im hängenden Tropfen mit reinem Serum und den Verdünnungen 1 : 20, 25, 50 und 100 versetzt. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. hat das reine Serum die meisten Bakterien, noch ohne Haufenbildung immobilisiert; in 1 : 10 sind noch viele Stäbchen beweglich, in den übrigen Proben ist nichts von einer Serumwirkung zu beobachten.

Nach 1 Stunde. Im reinen Serum durchwegs Immobilisation mit Bildung von kleinen Häufchen, die auch bei Verdünnung 1 : 10 im schwächeren Grade vorhanden sind, in den übrigen Proben fehlen.

Nach 2 Stunden ist im reinen und 1 : 10 verdünnten Serum ziemlich vollständige Agglutination eingetreten, die übrigen Proben sind unbeeinflusst geblieben.

Es können somit nicht die physikalischen Verhältnisse des Exsudates sein, welche die Wirkungslosigkeit des agglutinierenden Immuserums erklären. Jedenfalls ist auch bei der Bildung der oberflächlichen Haufen im unverdünnten Exsudate die etwaige Gerinnung nicht direkt beteiligt. Das zeigt sich übrigens am deutlichsten bei der makroskopischen Beobachtungsmethode, wo eine etwa doch auftretende Gerinnung nicht unbemerkt bleiben kann.

Versuch VII.

Das nach dem Gerinnen zerschüttelte, somit 2 mal filtrierte Spülwasser des Versuches VI wird zu je 1 ccm mit je 0,25 ccm reinen sowie 1 : 10, 25, 50, 75, 100, 500 verdünnten Serums versetzt. Kontrolle mit auf den gleichen Trübungsgrad gebrachter Bouillonkultur. 37°.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. sind die Bouillonon mit reinem Serum und den Verdünnungen 1 : 10 — 1 : 75 fast ganz geklärt, die übrigen mit schönen, aber noch nicht vollständig abgesetzten Flocken. Alle Exsudatproben sind gleichmäßig trüb.

Nach 1 Std. ist die Agglutination in den Bouillonkulturen durchweg vollendet, im Spülwasser fehlt sie ganz.

Nach 2 Std. beginnt nur im reinen Serum eine schwache Flockenbildung, die übrigen Proben sind gleichmäßig trüb.

Ohne vorläufig auf den Mechanismus der Ausbildung der großen oberflächlichen Haufen im Exsudate näher einzugehen, möge nunmehr die Frage beantwortet werden, auf welchen Anteil des Typhusexsudates die relative Unwirksamkeit des Immunsersums zurückzuführen wäre. Es wäre möglich, daß der Exsudatflüssigkeit selbst eine antiagglutinative Fähigkeit zukäme. Die im Exsudate angesammelten Zellen sind natürlich ohne Einfluß, wie schon daraus hervorgeht, daß man dieselben, wenigstens der größten Mehrzahl nach, durch Filtration entfernen kann, ohne dadurch irgend etwas zu ändern. Viel Wahrscheinlichkeit besitzt diese Annahme allerdings von vornherein nicht, da aus den bereits mitgeteilten Versuchen bereits hervorgeht, daß starke Verdünnung des Exsudates die Wirkung des Immunsersums in keiner Weise deutlicher hervortreten läßt.

Weiterhin könnte die Ursache des Nichteintretens der Agglutination in den Bakterien selbst liegen. Dafür würde einmal die Beobachtung des Ausbleibens oder doch nur rudimentären Auftretens der Haufenbildung im aktiv oder passiv immunisierten Tiere sprechen, dann aber auch das Weiterbestehen der Nichtagglutinierbarkeit der Bakterien nach Verdünnung des Exsudates.

Die endgültige Entscheidung war leicht zu treffen, sobald es gelang, die Bakterien eines Exsudates aus diesem zu entfernen, von den anhaftenden Resten tierischer Flüssigkeit zu befreien und nun ihr Verhalten in einem indifferenten Medium gegen die Agglutination des Immunsersums zu studieren. Dies läßt sich durch Centrifugieren des Exsudates leicht erreichen. Allerdings gelangen dabei nicht nur die Typhusbakterien, sondern auch alle anderen geformten Elemente des Exsudates in den beim Centrifugieren gebildeten Bodensatz. Ein Teil dieser kann

durch vorhergehende Filtration mittels dichten Filtrierpapiers entfernt werden, aber auch die durchs Filter gegangenen Zellen lassen sich dann noch beseitigen, wenn man den Bodensatz mit destilliertem Wasser bei 37° eine kurze Zeit lang behandelt. Dabei lösen sich rote Blutkörperchen auf, ihre Stroma, sowie die nebenbei noch vorhandenen farblosen Blutzellen quellen so auf, daß sie bei einer weiteren Filtration nunmehr mit ziemlicher Sicherheit zurückgehalten werden. Freilich sind diese Manipulationen auch mit einem bedeutenden Verluste an Bakterien verbunden; dieser Übelstand läßt sich aber nicht vermeiden und wird dadurch wieder einigermaßen gut gemacht, daß man es in der Hand hat, die durch das Filter gegangenen Bakterien neuerdings durch Centrifugieren zu konzentrieren, und dann durch Eintragen von größeren oder kleineren Flüssigkeitsmengen sich Aufschwemmungen von der jeweils erforderlichen Dichte zu bereiten.

Es wurde daher das aus der Bauchhöhle typhusinfizierter Meerschweinchen gewonnene Exsudat sofort filtriert, centrifugiert, der Satz in destilliertem Wasser bei 37° aufgeschwemmt, neuerdings filtriert und centrifugiert und die danach ziemlich rein erhaltenen Bakterien, eventuell nach nochmaliger Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung entweder in dieser oder in steriler Bouillon aufgeschwemmt. War die Erlangung reinen, konzentrierten Exsudates nicht notwendig, so wurden in die Bauchhöhle des eben gestorbenen oder in agone getöteten Tieres sofort physiologische Kochsalzlösung oder auch steriles destilliertes Wasser eingegossen, und die erlangte trübe Flüssigkeit in gleicher Weise weiter verarbeitet. Namentlich nach dieser letzteren Methode erhält man ohne Mühe so große Mengen von Bakterien von einem einzigen Tiere, daß sie zu allen notwendigen Versuchen ausreichen.

Es zeigte sich nun sogleich, daß das Versagen der Serumwirkung in einem besonderen Zustande der Bakterien des Typhus exsudates seinen Grund haben müsse.

Versuch VIII.

Meerschweinchen 23 war nach intraperitonealer Infektion mit 1 Öse Typhusagarkultur nach 14 Std. gestorben. Aus der sofort eröffneten Bauchhöhle lassen sich 7 ccm dicht trüben Exsudates entnehmen, das nach Defibrinieren mit dem Platinstabe filtriert und zentrifugiert wird. Die schwach gelbliche, klare Exsudatflüssigkeit wird abgegossen, der Bodensatz in destilliertem Wasser von 37° aufgeschwemmt und darin ca. $\frac{1}{4}$ Std. im Brutschrank belassen. Hierauf wird neuerdings filtriert, zentrifugiert, abgegossen und der aus Bakterien bestehende Satz in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. In gleicher Weise werden auch 2 Bouillonkulturen (von je 5 ccm Flüssigkeit), die wie bisher immer angelegt waren, filtriert, zentrifugiert, mit destilliertem Wasser behandelt etc.

Die Präparate wurden in der Weise angefertigt, daß je ein Tröpfchen Bakteriensuspension aus dem Typhusexsudate, steriler Bouillon und Serumverdünnung in der einen, je ein Tröpfchen Bakteriensuspension aus Bouillonkultur, Exsudatflüssigkeit und Serumverdünnung in der zweiten Reihe auf dem Deckglase gemischt und zum hängenden Tropfen verarbeitet wurden. Das zum Versuche verwendete Serum agglutinierte Kulturtyphus bis 1 : 5000 und kam in den Verdünnungen 1 : 10, 25, 50, 100 und 1000 zur Verwendung. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind sämtliche Bakterien aus den Bouillonkulturen in meist großen Haufen agglutiniert. Sämtliche Exsudatbakterien sind frei und nur durch die Serumverdünnung 1 : 10 teilweise gelähmt.

Nach 1 Std. Nur in der Serumverdünnung 1 : 10 finden sich neben durchgreifender Immobilisation kleine Häufchen.

Nach 2 Std. In der Serumverdünnung 1 : 10 sind alle Exsudatbakterien unbeweglich und vielfach zu kleinen Haufen von wenigen Individuen vereint. Ungefähr das gleiche Bild bietet die Serumverdünnung 1 : 25. Alle anderen Proben sind ohne jede Serumwirkung geblieben. Die Bouillonbakterien beharren wie vorher in vollständiger Agglutination.

Versuch IX.

Dieselbe sehr dichten Suspensionen von Exsudat und Bouillontyphusbakterien werden zu je 10 Tropfen je $\frac{1}{2}$ ccm Serumverdünnung 1 : 1000 zugesetzt. 37°.

Nach $\frac{1}{2}$ Stunde sind alle Bouillonbakterien zu groben Flocken vereinigt und teilweise schon abgesetzt. Die Exsudatbakterien trüben gleichmäßig.

Nach 1 Stunde sind die Flüssigkeiten mit den Bouillonbakterien völlig geklärt, die Exsudatbakterien nicht beeinflusst.

Nach 2 und 3 Std. der gleiche Befund.

Versuch X.

Meerschweinchen 24 war nach Infektion mit 1 Öse Typhusagarkultur noch 16 Std. agonisierend und wurde durch Aufschneiden der Halsadern getötet. Die Bauchhöhle wird sofort mit destilliertem Wasser von 37° ausgespült, das Spülwasser (ca. 20 ccm) filtriert und zentrifugiert. Vom Bodensatz wird abgegossen, derselbe nochmals in destilliertem Wasser auf-

geschwemmt, filtriert und wieder centrifugiert. Der schliesslich erhaltene Satz wird in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt. In gleicher Weise werden 2 Bouillonkulturen behandelt. Hängende Tropfen, wie bei Versuch VIII, werden mit reinem Serum und den Verdünnungen 1 : 10, 25, 50, 100, 500 und 1000 angelegt. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Bouillonbakterien typisch agglutiniert, alle Exsudatbakterien frei; dabei aber unbeweglich im reinen und im 1 : 10 verdünnten Serum.

Nach 1 Std. sind die Exsudatbakterien im reinen und 1 : 10 verdünnten Serum vielfach zu kleinen, individuenarmen Häufchen zusammengeballt, die bereits viel spärlicher bei 1 : 25 auftreten, aber auch bei 1 : 50 noch nicht ganz fehlen. Von da an keinerlei Serumwirkung mehr sichtbar.

Nach 2 Std. wesentlich unverändert, im reinen Serum zeigt sich Pfaundersches Phänomen.

Versuch XI.

Die gleichen, gewaschenen Bakterien werden zu je 10 Tropfen in je $\frac{1}{2}$ ccm einer Serumverdünnung 1 : 100 gebracht. 37°.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. sind die Bouillonbakterien vollständig agglutiniert, die Exsudatbakterien trüben gleichmässig.

Nach 1, 2 und 3 Std. ist bei den Exsudatbakterien nirgends eine Haufenbildung zu konstatieren.

Der Ausfall der Versuche lässt nicht daran zweifeln, dass der Grund der Nichtagglutinierbarkeit in einem besonderen Zustande der Bakterien im tierischen Exsudate gesucht werden müsse.

Nebenbei sei darauf aufmerksam gemacht, dass sich die Typhusbakterien aus den Exsudaten der beiden Meerschweinchen 23 und 24 zwar im Vergleich zu Bouillonbakterien qualitativ gegenüber der Wirkung eines und desselben Serums identisch verhielten, dass aber geringe quantitative Unterschiede nicht zu verkennen sind. Denn ganz entschieden erwies sich das Serum gegen die Bakterien aus dem Exsudate von Nr. 24 etwas wirksamer. Derartige kleine quantitative Differenzen, die natürlich an der Bedeutung des Gesamtbefundes nichts ändern, wurden mehrfach beobachtet.

Die Ursache der Wirkungslosigkeit des Typhus-Immunserums konnte nur eine zweifache sein. Entweder sind die Agglutinine desselben überhaupt nicht imstande, die Exsudatbakterien anzugreifen; dann dürfen sie auch durch Berührung mit denselben nicht aufgebraucht, nicht gebunden werden. Oder aber, es ist

die Wirkungslosigkeit des Immunserums nur eine scheinbare; dann müßten die Bakterien eine ungewöhnlich starke Bindungsfähigkeit für Agglutinine besitzen, so daß die Anwesenheit einiger weniger Bakterien genügen würde, um die Wirksamkeit des Serums zu erschöpfen, wonach natürlich dann alle anderen Bakterien unbeeinflusst bleiben würden. Für die letztere Möglichkeit schien namentlich das Auftreten der eigentümlichen Haufenbildungen im reinen Exsudate zu sprechen.

Aufschluß konnten naturgemäß nur Bindungsversuche geben, die ja überhaupt für den Nachweis und das Studium der von der modernen Immunitätslehre geforderten hypothetischen Stoffe von so hoher Bedeutung geworden sind.

Versuch XIa.

Meerschweinchen 27 nach Injektion von $\frac{1}{4}$ Typhusagarkultur nach 12 Std. in agone. Wird durch Aufschneiden der Halsadern getötet, die Bauchhöhle mit 20 ccm destillierten Wassers ausgespült. Das Spülwasser wird filtriert, centrifugiert, nochmals mit Wasser aufgeschwemmt, filtriert und centrifugiert. Der Bodensatz wird in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Prüfung der Agglutinationsfähigkeit der so erhaltenen Exsudatbakterien und in gleicher Weise behandelter Bouillonbakterien erfolgte im hängenden Tropfen mit reinem und 1 : 10, 25, 50, 100, 500 und 1000 verdünntem Serum vom ungefähren Wirkungswerte 1 : 10 000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Proben mit Bouillonbakterien vollständig agglutiniert. Exsudatbakterien zeigen in reinem Serum Immobilisation ohne Häufchenbildung, in der Verdünnung 1 : 10 nur teilweise Unbeweglichkeit.

Nach 1 Std. sind die Exsudatbakterien im reinen Serum fast durchaus, in der Verdünnung 1 : 10 zum kleineren Teil zu Häufchen vereint; in allen anderen Proben fehlen Haufenbildungen, doch ist bis zur Verdünnung 1 : 50 vielfach Immobilisation zu finden.

Nach 2 Stunden herrscht im reinen Serum vollständige Agglutination, in der Verdünnung 1 : 10 finden sich kleine Häufchen neben vielen einzelnen, unbeweglichen Stäbchen, auch bei 1 : 25 noch spärliche Häufchen. Die übrigen Präparate sind von wimmelnden Bakterien erfüllt.

Die Aufschwemmung der gewaschenen Exsudat- und Bouillonbakterien wird in der Menge von 5, 10, 15, 20 Tropfen zu je 0,5 ccm einer Serumverdünnung 1 : 800 zugesetzt. 37°. Schon nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Bouillonbakterien zu groben Flocken vereinigt, die sich nach $\frac{3}{4}$ Std. unter vollständiger Klärung der Flüssigkeit abgesetzt haben. Die Exsudatbakterien trüben um diese Zeit und auch noch nach 3stünd. Aufenthalt bei 37° vollkommen gleichmäßig.

Nach dieser Zeit wurden sämtliche Proben centrifugiert, die obenstehenden klaren Flüssigkeiten werden abgossen und mit Bouillonkultur zu hängenden Tropfen verarbeitet.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. ist in allen Proben, bei denen die Serumverdünnung Exsudatbakterien enthalten hatte, vollständige Agglutination eingetreten; von den Proben, denen Bouillonbakterien zugesetzt gewesen waren, haben nur die mit den geringsten Zusätzen (5 und 10 Tropfen) kleine Häufchen bilden können.

Nach 1 Std. finden sich in den Serumproben, auf welche 5 und 10 Tropfen Bouillonbakteriensuspension gewirkt hatten, kleine Häufchen neben beweglichen Bakterien, die mit 15 und 20 Tropfen sind völlig wirkungslos geworden. Alle Präparate, die mit Serum angefertigt sind, auf welches Exsudatbakterien gewirkt hatten, zeigen vollständige, starre Agglutination.

Der übrig gebliebene Rest, der durch Centrifugieren wiedergewonnenen Sera wird in schmale Eprouvetten gefüllt und jedes Röhrchen mit 15 Tropfen trüber Typhusbouillon versetzt. 37°.

Nach 1 Std. sind alle Bakterien der Serumproben, die früher Exsudatbakterien erhalten hatten, zu groben Flocken vereinigt, die Serumproben, welche dem Einflusse von Bouillonbakterien ausgesetzt gewesen waren, sind gleichmäßig trüb.

Nach 2 Std. ist die Agglutination der ersteren Serie überall beendet, die zweite Serie ist gleichmäßig trüb.

Plattenkulturen der Aufschwemmungen (hergestellt durch Eintragen von 1 Tropfen Aufschwemmung in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, davon 1 Öse zur Platte verarbeitet) ergaben für Exsudatbakterien 24 300, für Bouillonbakterien 17 200 Kolonien.

Versuch XII.

Meerschweinchen 80 stirbt nach Impfung mit $\frac{1}{4}$ Typhusagarkultur in weniger wie 24 Std. Die Bauchhöhle wird mit 25 ccm physiologischer NaCl-Lösung ausgespült, das trübe Spülwasser durch Papier filtriert und centrifugiert. Der Bodensatz wird in der gewöhnlichen Weise mit destilliertem Wasser bei 37° behandelt, abermals filtriert und centrifugiert. Der schließlich erhaltene Bodensatz wird wie der von 2 in gleicher Weise behandelten Bouillonkulturen in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Der Bindungsversuch erfolgt in der Weise, daß zu je 5 Tropfen der Verdünnung 1 : 50 und 1 : 100 eines bis 1 : 12 500 wirksamen Kaninchenserums tropfenweise die Aufschwemmungen der tierischen und der Kulturbakterien bei 37° zugesetzt werden. Dabei erfolgt jedesmal bei Zusatz der letzteren prompte Agglutination, während die ersteren andauernd trüben. Der Zusatz wird so lange fortgesetzt, bis auch die Bouillonbakterien nicht mehr agglutiniert werden, und die Flüssigkeit neben den starken agglutinierten Flocken des Bodensatzes noch eine bleibende Trübung aus freien Typhusbakterien aufweist. Dazu waren nötig für 5 Tropfen Serum 1 : 50 im ganzen 27 Tropfen Aufschwemmung von Bouillon bzw. Exsudatbakterien, für 5 Tropfen Serum 1 : 100 16 Tropfen betreffenden Suspensionen. Darauf wurde centrifugiert und mit den überstehenden klaren Flüssigkeiten wurden hängende Tropfen mit empfindlicher Typhusbouillonkultur angelegt.

Schon nach $\frac{1}{4}$ Std. bei 37° hatten alle Proben, welche vorher Exsudatbakterien erhalten hatten, vollständige Agglutination erzeugt, in den anderen war jetzt und auch noch nach weiteren 2 Std. die Beweglichkeit ungehemmt.

Weiter wurden je 10 Tropfen der abcentrifugierten klaren Flüssigkeiten mit einer Aufschwemmung gewaschener Bouillonbakterien in engen Eprorvetten versetzt. 37° .

Nach $\frac{1}{2}$ Std. hatten sich in den Serumverdünnungen, die der Einwirkung von Exsudatbakterien ausgesetzt gewesen waren, grobe Flocken gebildet, die nach einer weiteren halben Stunde unter völliger Klärung der Flüssigkeit zu Boden gesunken waren, während alle anderen Proben auch nach 3 Std. gleichmäßig trüb blieben.

Das Ergebnis dieser Versuche ist ein vollkommen eindeutiges. Die Typhusbakterien im Meerschweinchenexsudate sind inagglutinabel, weil die Agglutinine eines Immuserums nicht imstande sind, sie anzugreifen. Die Bindung der Agglutinine an die Bakterienzellen bleibt vollständig aus.

Dieser Befund schien in bester Weise mit der bereits in der Einleitung gewürdigten Thatsache des Nichtauftretens der Haufenbildung im Körper aktiv oder passiv immunisierter Tiere übereinzustimmen. Auch hier könne eine Agglutination nicht eintreten, nicht etwa deshalb, weil das Immuserum im lebenden Tierkörper anders wirkt als außerhalb desselben *in vitro*, sondern deshalb, weil die Bakterien selbst die Eigenschaft erlangen, der agglutinierenden Serumkomponente zu widerstehen. Da aber das Immuserum, wie später zu zeigen sein wird, auch gegen diese inagglutinablen Bakterien ebenso schützt, wie gegen gewöhnliche Kulturen von Typhus, so schien der in diesem Stadium der Versuchsreihe gezogene Schluss berechtigt, dass das Agglutinationsphänomen nur eine sehr geringe Bedeutung für die Erklärung des Wesens der Typhusimmunität besitzen könne¹⁾.

Nun besitzen aber die einem Meerschweinchen intraperitoneal beigebrachten Typhusbakterien die Eigenschaft der Nichtagglutinierbarkeit nicht von vornherein. Sie müssen sie vielmehr erst in jenen Generationen erlangen, welche in der Bauchhöhle des inficierten Tieres erzeugt werden. Den Zeitpunkt, in welchem

1) Prager mediz. Wochenschrift, 1901, Nr. 7.

dies geschieht, kann man leicht feststellen, wenn man Exsudatproben von Zeit zu Zeit mittels Glaskapillaren entnimmt und mit Typhusserum prüft. Dafs die Nichtagglutinierbarkeit bereits im noch lebenden Tiere vorhanden ist, beweisen einige sehr frühzeitig angestellte Versuche, wo das Exsudat des bereits schwer kranken Meerschweinchens untersucht wurde.

Versuch XIII.

Meerschweinchen 18 ist nach intraperitonealer Infektion mit 1 Öse Typhusagarkultur nach 14 Std. schwer krank. Dem Tiere wird mit Glaskapillaren Exsudat entnommen und dasselbe sofort mit reinem, sowie 1 : 10, 25, 50, 75, 100, 500, 1000, 2500 verdünntem Serum zu hängenden Tropfen verarbeitet. Um die dazu hinreichende Menge Exsudats zu erhalten, waren 3 Entnahmen notwendig. Kontrolle mit in gewöhnlicher Weise hergestellter Typhusbouillonkultur und Serum 1 : 500, 1000, 2500 und 5000.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Bouillonproben agglutiniert, doch sind die Häufchen bei Serum 1 : 2500 und 5000 erst sehr klein.

Exsudat mit reinem Serum zeigt die Bakterien immobilisiert, aber ohne Haufenbildung. Diese fehlt auch in den übrigen Präparaten.

Nach 1 Std. Alle Bouillonproben agglutiniert.

Exsudat mit reinem Serum zeigt grofse, oberflächliche Haufen, darunter einzelne, aber immobilisierte Bakterien und spärliche kleine Häufchen.

Ähnlich, aber schwächer ausgebildet, bei 1 : 10. Die Verdünnungen 1 : 25 und 1 : 50 zeigen durchaus Immobilisation, aber keine Haufenbildung. Alle übrigen Präparate bieten keinen Unterschied gegen die serumfreie Kontrolle dar, in welcher diesmal die Beweglichkeit der Bakterien auch nur gering ist.

Nach 2 Std. Reines Serum hat neben den grofsen oberflächlichen Haufen in der Tiefe der Flüssigkeit nur kleine Häufchen bilden können. Auch sind einzelnliegende, unbewegliche Bakterien in grofser Zahl vorhanden.

In der Verdünnung 1 : 10 haben sich spärliche oberflächliche Haufen gebildet, sonst beschränkt sich die Serumwirkung ebenso wie bei den Verdünnungen 1 : 25 und 50 wesentlich auf Unbeweglichwerden der Bakterien. Im übrigen fehlt jede Serumwirkung.

Die folgenden Versuche, welche die fortlaufende Prüfung des Verhaltens der Bakterien während der Typhusinfektion zum Gegenstande haben, werden später noch einmal besprochen und erweitert werden müssen. Vorläufig handelt es sich dabei nur um die Feststellung des Eintretens der schweren Agglutinierbarkeit. Die Mengen der den Versuchstieren injizierten Agarkulturen waren stets sehr beträchtlich. Die Aufschwemmungen wurden vor der Injektion durch Fließpapier filtriert.

Versuch XIV.

Meerschweinchen 26 erhält $\frac{1}{4}$ filtrierte Agarkultur intraperitoneal.

Die Prüfung der verwendeten Aufschwemmung mit Serumverdünnungen 1 : 10, 100, 500 und 1000 ergab nach $\frac{1}{4}$ Std. bereits überall vollständige, typische Agglutination, die nach 1 und 2 Std. bestehen bleibt.

1. Entnahme sofort nach der Injektion. (Die hängenden Tropfen mit den Serumverdünnungen und mit physikalischer NaCl-Lösung allein wurden so rasch als möglich angefertigt, besichtigt und dann in 37° gebracht.)

Die entnommene Flüssigkeit enthält eine Anzahl roter, wenig weißer Blutkörperchen und wimmelt von einzeln liegenden Typhusbakterien.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Exsudat ohne Serum unverändert.

Die Verdünnungen 1 : 10, 100, 500 haben bereits typische, vollständige Agglutination in großen Häufchen hervorgebracht. Bei 1 : 1000 finden sich neben zahlreichen Häufchen noch freie unbewegliche Bakterien.

Nach 1 Std. vollständige Agglutination überall. Serumfreie Kontrolle wie vorher.

Nach 2 Std. nicht wesentlich verändert.

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 2. Entnahme, $\frac{1}{4}$ Std. nach der Injektion, | } bieten wesentlich das gleiche Bild. |
| 3. Entnahme, $\frac{1}{2}$ Std. nach der Injektion, | |
| 4. Entnahme, 1 Std. nach der Injektion : | |

Das Exsudat enthält spärliche rote und weiße Blutkörperchen, neben massenhaft wimmelnden Bakterien finden sich kleine Häufchen.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Serumfreie Kontrolle zeigt vielfach kleine und mitunter auch recht ansehnliche Häufchen, mehrfach um offenbar zerfallende Leucocyten herum, neben wimmelnden Bakterien.

Exsudat mit Serumverdünnungen zeigt überall typische Agglutination. Nach 1 Std. wesentlich wie vorher.

Nach 2 Std. In der serumfreien Kontrolle ist unzweifelhaft Agglutination und zwar mit recht vielen, z. T. großen Häufchen eingetreten. Von der wirklichen Agglutination, die in allen anderen Proben herrscht, unterscheidet sich das Präparat nur durch die überall neben den Haufen sich bewegenden freien Bakterien.

5. Entnahme. 2 Std. nach der Infektion.

Das leicht in die Kapillare aufsteigende Exsudat ist wenig trübe, enthält mäÙig zahlreiche rote, wenig weiÙe Blutkörperchen und massenhaft Bakterien, die meist lebhaft schwärmen, hie und da aber auch kleine Häufchen von 4—8 Individuen bilden. Immerhin scheint es, als ob die Beweglichkeit gegenüber der bisher an den Bakterien der toten Tiere beobachteten etwas vermindert wäre.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Serumfreie Kontrolle zeigt neben zahllosen beweglichen Bakterien viele Häufchen, teils frei, teils um Leucocyten herum, mitunter von ansehnlicher Größe. Innerhalb dieser größeren Haufen herrscht vielfach noch wackelnde Beweglichkeit.

Alle Serumverdünnungen haben typisch agglutiniert.

Nach 1 Std. herrscht in der serumfreien Kontrolle sicher Agglutination, durch sehr zahlreiche Häufchen gekennzeichnet.

Die übrigen Proben agglutiniert.

Nach 2 Std. ist die bisher vorhandene Agglutination in der serumfreien Kontrolle zum größten Teile gelöst. Dasselbe ist in geringerem Grade bei der Serumverdünnung 1 : 1000 der Fall. Die übrigen Präparate in starrer Agglutination.

6. Entnahme, 3 Std. nach der Infektion.

Exsudat dicht trüb, leicht zu entnehmen. Es hat sich nunmehr das gewohnte typische Bild, wie es das Exsudat eines eben gestorbenen Tieres bietet, entwickelt: relativ spärliche, z. T. degenerierte Leukocyten, massenhaft schwärmende Bakterien, die nur sehr spärlich zu kleinsten Häufchen vereinigt sind.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. zeigt die serumfreie Kontrolle nur wimmelnde Bakterien. Serumverdünnung 1 : 1000 keine Haufenbildung, fast überall freie Beweglichkeit.

Serumverdünnung 1 : 500 und 1 : 100 nur spärliche lockere Haufen. Mehrzahl der Bakterien gehemmt beweglich.

Serumverdünnung 1 : 10 ziemlich vollständige Agglutination.

Nach 1 Std. ist die serumfreie Kontrolle nicht wesentlich verändert.

Serumverdünnung 1 : 1000 sehr spärliche kleine Häufchen, meist freie, zum größten Teil unbewegliche Bakterien.

Serumverdünnung 1 : 100 und 500 ähnlich, aber mit mehr hervortretender Haufenbildung.

Serumverdünnung 1 : 10 fast vollständige Agglutination.

Nach 2 Std. wesentlich das gleiche Bild.

7. Entnahme, 4 Std. nach der Infektion.

Das Exsudat trüb, mit wenig Leukocyten und wimmelnden Bakterien, keine Haufenbildung.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. serumfreie Kontrolle unverändert.

Serumverdünnungen 1 : 100, 500, 1000 haben keine Haufenbildung, wohl aber vielfach Immobilisation hervorrufen können.

Serumverdünnung 1 : 10 vielfach, aber nur sehr kleine Häufchen, viele freie, immobile Bakterien.

Nach 1 Std. und 2 Std. ist das Aussehen der Präparate wenig verändert; nur bei Serumverdünnung 1 : 10 kann von Agglutination gesprochen werden.

8. Entnahme, 5 Std. nach der Infektion.

Das entnommene Exsudat zeigt im wesentlichen das gleiche Verhalten wie bei der 7. Entnahme.

9. Entnahme, 16 Std. nach der Infektion.

Das Tier ist agonisierend. Das Exsudat ist dicht trüb, die Bakterien sind, neben wenig Leukocyten, so massenhaft vorhanden, daß eine ausgiebige Bewegung, rein mechanisch unmöglich erscheint.

Hängende Tropfen mit reinem, sowie 1 : 10, 50, 100, 500 verdünntem Serum lassen nach $\frac{1}{4}$ Std. nur bei reinem Serum grobe, oberflächliche Haufen erkennen; nach 1 Std. ist hier ziemlich vollständige Agglutination, bei 1 : 10 spurenweise eingetreten. Nach 2 Std. zeigt sich in den durch reines Serum gebildeten Haufen schwaches P aundlersches Phänomen, bei Serum 1 : 10

ist die Wirkung äußerst schwach, bei den übrigen Verdünnungen überhaupt (vielleicht von einer Hemmung der Beweglichkeit abgesehen) nicht vorhanden

Versuch XV.

Meerschweinchen 29 erhält $\frac{1}{8}$ Typhusagarkultur intraperitoneal

1. Entnahme sofort nach der Infektion.

Das Exsudat enthält wenig rote und weiße Blutkörperchen, überaus zahlreiche bewegliche Bakterien. Haufenbildung tritt während der 2stünd. Beobachtung bei 37° erst ganz zum Schlusse, um einige wenige Leukocyten herum, ein.

Die angewendeten Serumverdünnungen 1 : 10, 50, 100 und 500 agglutinieren sowohl die Bakterien des Exsudates, wie die der zur Injektion verwendeten Suspension binnen $\frac{1}{4}$ Std. vollständig.

2. Entnahme, 1 Std. nach der Infektion.

Liefert ein wie vorher beschaffenes Exsudat. Dasselbe zeigt nach $\frac{1}{4}$ Std. spärliche, nach 1 und 2 Std. ziemlich zahlreiche kleine Häufchen, neben wimmelnden, freien Typhusbakterien.

Die Serumverdünnungen agglutinieren binnen $\frac{1}{4}$ Std.

3. Entnahme, 2 Std. nach der Infektion.

Leukocyten sind im Exsudate zahlreicher geworden. Nach 1 und 2 Std. haben sich, wie bei der 2. Entnahme, reichlich kleine Häufchen gebildet.

Agglutination tritt bei allen Serumverdünnungen ein, aber bei 1 : 500 nur unvollständig, bei 1 : 100 etwas verspätet.

4. Entnahme, 3 Std. nach der Infektion.

Häufchenbildung kommt im reinen Exsudate zu allen Beobachtungszeiten vor, ist aber weniger ausgesprochen wie vorher.

Die Serumverdünnungen 1 : 100 und 500 sind, außer daß sie vielfach Immobilisation hervorbringen, wirkungslos. 1 : 50 erzeugt kleine Häufchen, wobei die Mehrzahl der immobilisierten Bakterien frei bleibt. 1 : 10 macht stärkere, aber ebenfalls nur unvollständige Agglutination.

5. Entnahme, 4 Std. nach der Infektion und

6. Entnahme, 6 Std. nach der Infektion:

Im Reinexsudat ist das Auftreten von Häufchen äußerst geringfügig oder bleibt ganz aus. Die Serumverdünnungen bleiben wirkungslos, bis auf 1 : 10, wo kleine Häufchen neben der Mehrzahl freier Bakterien zu finden sind.

6 $\frac{1}{2}$ Std. nach der Infektion werden dem bereits deutlich kranken Tiere 6 ccm einer Serumverdünnung 1 : 10 injiziert.

5 Minuten später wird Exsudat entnommen und teils rein, teils mit normalem Kaninchenserum und den Immuserumverdünnungen 1 : 10, 50 und 100 zu hängenden Tropfen verarbeitet. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. zeigt sich nirgends, nach $\frac{1}{2}$ Std. nur bei Immuserum 1 : 10 schwache Haufenbildung. Doch finden sich nach 2stünd. Aufenthalt im Brutschrank in allen Proben kleine Häufchen, am reichlichsten bei den 1 : 10 und 1 : 50 verdünnten Immuseris.

Zwei weitere Entnahmen, $\frac{1}{4}$ und 1 Std. nach der Seruminjektion, zeigen nur bei Immuserumverdünnung 1 : 10 unvollständige Agglutination.

Das Tier stirbt 9 Std. nach der Typhusinfektion. Der Befund an den Bakterien des Exsudates ist der gewöhnliche.

Das Resultat dieser Versuche ist ebenfalls ziemlich eindeutig. Die injicierten Typhusbakterien bleiben während der ersten Zeit der Infektion der Wirkung der Serumagglutinine vollständig zugänglich. Erst ungefähr 3 Stunden nach der Impfung — die Zeit ist nicht völlig gleich, doch gibt das Intervall von 3 Stunden für die verwendeten grossen Kulturmengen eine gute Mittelzahl — hört die Agglutinationsfähigkeit der Typhusbakterien des Exsudates auf. Dabei erfolgt aber dieser Wechsel ziemlich unvermittelt: die Bakterien sind auf einmal gegen die verschiedenen Serumkonzentrationen unempfindlich geworden; nur andeutungsweise bemerkt man, wie in dem als Nr. XIV mitgeteilten Versuche, das zunächst nur die Wirkung der stärksten Verdünnungen aufhört.

Es müssen also während der ersten drei Stunden die Typhusbakterien unter dem Einflusse einer Körperreaktion gestanden haben, welche dann das Ausbleiben der Agglutination zur Folge hat. Das eine derartige Reaktion bestehen muß, beweist das Auftreten von kleinen, agglutinierten Häufchen im Exsudate, ohne das Serum zugesetzt wurde. Freilich ist die Bildung dieser im übrigen ganz typischen Agglutinationen insofern nur eine rudimentäre, als sie mitten unter Bakterien erfolgt, die sich andauernd in vollster Bewegungsfreiheit befinden. Interessant war es zu beobachten, wie sehr oft Leukocyten, und zwar soweit darauf geachtet wurde, immer zerfallende Leukocyten den Ausgangspunkt dieser Häufchen bildeten. Es wäre nicht unmöglich, das bei diesem Zerfall Stoffe frei würden, welche späterhin die Haufenbildung veranlassen oder unterstützen könnten. Das sich auch Häufchen finden, deren Mittelpunkte farblose Blutzellen nicht abgeben, wurde bereits bemerkt; es ist aber möglich, das hier doch ursprünglich ein Leukocyt vorhanden war, der dann durch vollständige Auflösung unsichtbar wurde.

Die vorläufig noch nicht näher zu definierenden Einflüsse, denen die Typhusbakterien im lebenden Tierkörper, einige Zeit nach erfolgter Infektion ausgesetzt sind, müssen bei verschiedenen

Tierarten verschieden mächtig sein. Denn die Widerstandsfähigkeit der Typhusbakterien gegen die Serumagglutinine ist im Exsudate verschiedener Tiere deutlich wechselnd. Ähnlich wie in der Bauchhöhle von Meerschweinchen verhalten sich die Bakterien im Körper von weissen Mäusen.

Versuch XVI.

Große weiße Maus erhält 1 Öse Typhusagarkultur intraperitoneal; ist innerhalb 13 Std. gestorben. Durch vorsichtiges Ausspülen der Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung lassen sich etwa 5 ccm trüber, sehr bakterienreicher Flüssigkeit gewinnen. Es werden hängende Tropfen mit reinem und 1 : 10, 50, 100, 500 und 1000 verdünntem Serum angelegt. Kontrolle mit in gewöhnlicher Weise hergestellter Bouillonkultur und Serum 1 : 100, 500, 1000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Alle Tropfen mit Bouillonkultur agglutiniert, doch sind bei der Serumverdünnung 1 : 1000 die gebildeten Häufchen nur klein.

Exsudat mit reinem Serum zeigt fast durchwegs große, schöne oberflächliche und tiefe Haufen.

In der Serumverdünnung 1 : 10 finden sich neben vielen Haufen zahlreiche einzelne, meist immobile Bakterien.

Bei 1 : 50 sind nur wenige Oberflächenhaufen vorhanden, sonst ist das Serum überall wirkungslos geblieben.

Nach 1 Std. wesentlich unverändert. Vollständige Agglutination findet eigentlich nur im reinen Serum statt, doch reicht die sichtbare, wenn auch unvollkommene Serumwirkung bis zur Verdünnung 1 : 50.

Das Exsudat wird zentrifugiert, der Satz in Wasser aufgeschwemmt, filtriert, wieder zentrifugiert und schliesslich in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Hängende Tropfen mit reinem, sowie 1 : 10, 50, 100, 500 verdünntem Serum. Kontrolle mit dem Satze einer in gleicher Weise behandelten Bouillonkultur. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Bakterien der Bouillon vollständig agglutiniert.

Das reine Serum hat ziemlich vollständige Agglutination, das 1 : 10 verdünnte nur die Bildung einiger weniger, typischer Häufchen hervorrufen können, neben denen viele freie, zum grossen Teil bewegliche Bakterien vorhanden sind.

Nach 1 Std. im wesentlichen wie vorher. Die Serumverdünnung 1 : 10 ist nur unvollständig wirksam, die 1 : 50 wirkungslos.

Ein wesentlich anderes Resultat lieferte ein Versuch mit dem Exsudate der Ratte.

Versuch XVII.

Große bunte Ratte erhält 4 Ösen Typhusagarkultur intraperitoneal und stirbt darnach in weniger als 13 Std. Die mit 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung ausgespülte Bauchhöhle ergibt eine äusserst zellarme und dabei sehr bakterienreiche Flüssigkeit von rötlicher Färbung, die offenbar durch gelöstes

Hämoglobin bedingt ist, da Erythrocyten sowohl im Exsudate selbst, wie in dem daraus abcentrifugierten Satze vollständig fehlen.

Es werden hängende Tropfen mit 1 : 10, 100, 500, 1000, 2500 verdünntem Serum angefertigt. Kontrolle Bouillonkultur. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std zeigt die Bouillonkultur überall Agglutination in großen Haufen. Die Exsudatbakterien sind durch die Verdünnungen bis 1 : 500 vollständig, durch 1 : 1000 unvollständig agglutiniert, sonst frei und beweglich.

Nach 1 Std. ist auch die Agglutination durch das 1000 fach verdünnte Serum ziemlich vollständig. Von da an fehlt jede Wirkung.

Das Exsudat wird centrifugiert und der in üblicher Weise gereinigte Satz in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Kontrolle mit den Bakterien einer in gleicher Weise behandelten Bouillonkultur. Hängende Tropfen mit Serumverdünnungen 1 : 500, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind alle Bouillonpräparate agglutiniert.

Exsudatpräparate zeigen bei 1 : 500 verdünntem Serum viele Häufchen, bei 1 : 1000 wenige, sonst keine Beeinflussung.

Nach 1 Std. hat das 500 fach verdünnte Serum ziemlich vollständige, das 1 : 1000 verdünnte eine teilweise Agglutination hervorgerufen. Sonst keine Wirkung.

Obwohl somit auch hier die Thatsache der schwierigen Agglutinierbarkeit der tierischen Bakterien qualitativ in derselben Weise zu konstatieren ist, bestehen quantitativ immerhin merkbare Unterschiede.

Bei Verwendung von kleinen Kaninchen, die man intrapleural mit Typhus impft, kann man in der Regel eine noch höhere Widerstandskraft der Exsudatbakterien gegen die Serumagglutinine beobachten. Doch kamen hier auch Ausnahmen vor.

Versuch XVIII.

Kleines Kaninchen erhält 1 Typhusagarkultur intrapleural. Aus der Pleurahöhle des innerhalb 14 Std. gestorbenen Tieres können 5 ccm trüben, sehr leukocytenreichen Exsudates entnommen werden, das aber nur relativ wenige und dabei schwach bewegliche Typhusbakterien enthält. Dieselben zeigen im Exsudate, selbst in hängenden Tropfen untersucht, auch bei der Serumverdünnung 1 : 10 nur wenige Häufchen und unvollständige Agglutination, während Bouillonkultur durch Serum 1 : 5000 binnen $\frac{1}{4}$ Std. vollständig agglutiniert wird.

Im gewaschenen Satze besteht das gleiche Verhalten.

Die bisher mitgeteilten Versuche geben über die nähere Ursache des Versagens der Agglutininwirkung eines Typhusimmunserums noch kaum Aufschlüsse. Nur das Eine erscheint sicher, daß im Tierkörper während der Infektion etwas zu den

Bakterien hinzutreten muß, was dieselben nunmehr bis zu einem gewissen Grade inagglutinabel macht. Dieser unbekannte Einfluß ist aber jedenfalls nur kurzdauernd wirksam und betrifft wahrscheinlich nur die im Tiere selbst entstandenen oder nur wenige, nachher im Exsudate selbst in vitro erzeugte Generationen. Jedenfalls ist die Nichtagglutinierbarkeit nicht etwa zum Merkmale einer neuen Rasse von Typhusbakterien geworden. Denn impft man Exsudattröpfchen in Bouillon, so wird die dasselbst entstandene Typhuskultur sofort durch Zusatz von Immunsérum agglutiniert.

Versuch XIX.

Mit einer Öse des Exsudates des mit 1 Öse Typhusagarkultur geimpften Meerschweinchens 17 werden 5 ccm Bouillon infiziert. Nach 5 Std. Aufenthalt bei 37° ist die Flüssigkeit deutlich trüb. Es werden hängende Tropfen mit einem 1:5000 sicher wirksamen Serum angelegt und zwar in den Verdünnungen 1:1000, 2500, 5000. Kontrolle mit gewöhnlicher Bouillonkultur. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ und 1 Std. sind alle Proben unterschiedslos vollständig agglutiniert.

Im Gegensatze dazu hält sich die Widerstandskraft der Bakterien im Exsudate selbst ziemlich lange Zeit; dabei ist allerdings zu bemerken, daß die Vermehrung der Typhusbakterien darin sich innerhalb enger Grenzen hält. Aber auch dann, wenn man zum Exsudate Nährstoffe in Gestalt von wenig Bouillon hinzufügt, bleiben die Bakterien eine Zeitlang inagglutinabel.

Versuch XX.

Meerschweinchen 25 hatte 1 Öse Typhusagarkultur intraperitoneal erhalten. Je 4 Tropfen des frischen, unveränderten Exsudates kamen in 6 schmale, mit Stöpsel verschlossene Eprouvetten. Zu 3 derselben werden je 8 Tropfen Bouillon zugesetzt.

Die Untersuchung des frischen Exsudates mit Serumverdünnungen 1:50, 100, 500 und 1000 zeigte, daß sich nach 2 Std. bei 37° nur in der Verdünnung 1:50 einige oberflächliche und wenige kleinste tiefe Häufchen gebildet hatten.

Nach 1 stünd. Aufenthalt bei 37° wurde je eine Eprouvette mit reinem und eine mit bouillonverdünntem Exsudate entnommen und in der gleichen Weise mit Serum in hängenden Tropfen geprüft. Die Verhältnisse zeigten sich nicht wesentlich verändert.

Nach 3 Std. wurde eine 2. Serie geprüft. Das reine Exsudat zeigte mit reinen Typhusbakterien ungefähr dieselbe Widerstandskraft wie vorher, das

mit Bouillon verdünnte, in dem nach Maßgabe des mikroskopischen Bildes massenhaft Vermehrung eingetreten war, zeigte insofern ein charakteristisches Bild, als bei allen Serumverdünnungen Häufchenbildung stattgefunden hatte, daneben aber reichlich freie und bewegliche Bakterien vorhanden waren.

Das gleiche Verhalten, aber mit Vorwiegen der Haufenbildung, zeigen in der 3., nach 8stünd. Aufenthalte bei 37° entnommenen Serie, beide Proben derselben.

In anderen Versuchen hielt sich die Widerstandskraft der Typhusbakterien im Exsudate noch länger, namentlich dann, wenn dasselbe kühl aufbewahrt und dadurch eine starke Vermehrung verzögert wurde.

Es sah ganz so aus, als ob ein Stoff im Exsudate in sehr geringer Menge vorhanden sei, der auch einigen wenigen, außerhalb des Tieres entstandenen Bakteriengenerationen die Nichtagglutinierbarkeit verleihen könne, aber bald aufgebraucht werde.

Dafs dieser, wie sich weiterhin zeigen wird, zum richtigen Wege führende Schluss zunächst nicht verfolgt wurde, hatte seinen Grund einmal in dem, durch die bereits unter Nr. VIII und X mitgeteilten Versuche geführten Nachweise des Mangels einer antiagglutinativen Fähigkeit der Exsudatflüssigkeit; dann aber imponierte zu dieser Zeit auch das ganz ungewöhnliche Versagen der haufenbildenden Serumwirkung so sehr, dafs daraus gefolgert wurde, es müsse ein inagglutinables Typhusbakterium auch in sonstiger Hinsicht von den gewöhnlichen Kulturbakterien verschieden sein.¹⁾ Dabei wurde namentlich an die Virulenz solcher »tierischer Mikroorganismen« gedacht, sowie an die Wirkung der schützenden Anteile eines Typhusimmunserums auf dieselben. Die Folge dieser irrigen Annahme war eine lange Reihe von zum Teil vergeblichen, jedenfalls dem Ziele einer Erklärung der beobachteten Grundthatsache nicht näher führenden Versuchen, über die nur insoweit ausführlicher berichtet werden soll, als sie einigermaßen neue Ergebnisse hatten. Vorher aber sei noch einer eigenartigen Erscheinung gedacht. Schon 1897 hatten Widal und Siccard²⁾ gezeigt, dafs die Abtötung der

1) Prager medicin. Wochenschrift, Nr. 12.

2) Widal und Siccard, Soc. de Biologie, 30 janv. 1897, cit. nach Bensoude.

Typhusbakterien bei 57—60° die Agglutinationsreaktion nicht stört. Davon kann man sich jederzeit an gewöhnlichen, auf künstlichen Nährböden gezüchteten Bakterien überzeugen. Doch ist dazu zu bemerken, daß die Haufenbildung nie so schön und groß ausfällt, wie das bei Anwendung lebender Kulturen in ausgezeichneter Weise der Fall zu sein pflegt. Auch bilden sich, namentlich in Bouillonkulturen, durch das Erwärmen leicht von selbst kleine Häufchen, welche die Beobachtung sehr stören. Überdies fällt dabei das sehr wertvolle Merkmal der Beweglichkeitsstörung weg.

Es zeigte sich nun, daß Typhusbakterien aus tierischen Exsudaten, welche 1 Stunde lang auf 60° erhitzt worden waren, leichter agglutiniert wurden als im lebenden Zustande.

Versuch XXI.

Meerschweinchen 32 war nach Injektion von $\frac{1}{2}$ Typhusagarkultur innerhalb 12 Std. gestorben. Aus dem mit physiologischer NaCl-Lösung ausgespülten Peritonealexsudate werden die Bakterien in der üblichen Weise rein gewonnen und in NaCl-Lösung aufgeschwemmt. In gleicher Weise wird eine Suspension von Bouillonbakterien hergestellt. Je eine Hälfte dieser 2 Suspensionen wird $\frac{1}{2}$ Std. auf 60° erhitzt. Darauf wird in hängenden Tropfen mit lebenden und toten Bakterien und den Serumverdünnungen 1 : 10, 50, 100, 500, 1000 und 2500 angefertigt. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Alle Bouillonbakterien agglutiniert, die toten in wesentlich kleineren Häufchen als die lebenden.

Lebende Exsudatbakterien sämtlich frei und zum großen Teil beweglich. Von den erhitzten Exsudatbakterien sind die in den Präparaten mit Serumverdünnungen 1 : 10, 50, 100 zweifellos zu kleinen Häufchen vereint. In den übrigen Präparaten finden sich wenige Häufchen neben freien Bakterien. Auch eine serumfreie Kontrolle zeigt kleine Häufchen.

Nach 1 Std. Lebende Exsudatbakterien nur bei Serum 1 : 10 immobilisiert und teilweise agglutiniert, tote bei Serum 1 : 10 und 50 in schönen Haufen, bei 1 : 300 und 500 ebenfalls agglutiniert, aber nur in kleinen Häufchen, bei den übrigen ist das Resultat aus dem bereits angegebenen Grunde zweifelhaft.

Versuch XXII.

Meerschweinchen 34 war 12 Std. nach der Infektion mit $\frac{1}{4}$ Agarkultur gestorben. Die reichlich freies Exsudat enthaltende Bauchhöhle wird nach und nach mit 30 ccm destillierten Wassers ausgespült, das noch immer enorm bakterienreiche Spülwasser wird filtriert, zentrifugiert, der Satz neuerdings in Wasser aufgenommen, filtriert und zentrifugiert. Schließlich wird er in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; die eine Hälfte dieser und einer gleich bereiteten Suspension der Bakterien einer Bouillonkultur wird

1 Std. auf 60° erhitzt. Mit den lebenden und toten Bakterien werden hängende Tropfen unter Zusatz der Verdünnungen 1 : 10, 25, 50, 100, 250 und 500 eines bis 1 : 5000 wirksamen Serums angefertigt. 37°.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. sind alle Bouillonbakterien, lebende wie tote agglutiniert.

Lebende Exsudatbakterien zeigen nur bei Serum 1 : 10 teilweise Immobilisation, sonst keine Beeinflussung; die toten zeigen neben freien Bakterien viele Häufchen, bis zur Serumverdünnung 1 : 100. Von da an kein Unterschied gegen eine serumfreie Kontrolle.

Nach 2 Std. ist bei den Präparaten mit lebenden Exsudatbakterien und Serum 1 : 10 und 25 ganz unvollständige Agglutination eingetreten, während die toten bis 1 : 250 unzweideutige Serumwirkung erkennen lassen.

Die übrigen Präparate sind unbeeinflusst.

Durch das Erwärmen ist also zweifellos der die schwere Agglutinierbarkeit der Exsudatbakterien bedingende Umstand, wenigstens teilweise, in Wegfall gekommen.

Ein Versuch, die Virulenz der aus dem Exsudate inficierter Meerschweinchen direkt erhaltenen Typhusbakterien zu bestimmen, hat natürlich nur dann einen Sinn, wenn es gelingt, in Kontrollversuchen die genau gleiche Menge von entsprechend gezüchteten Kulturbakterien Tieren beizubringen. Dafs die Mitübertragung anhaftender Exsudatreste auf das Sorgfältigste vermieden werden muß, bedarf nicht erst eines Hinweises.

Es ist aber, wenn überhaupt möglich, jedenfalls sehr schwer, sowohl von gewaschenem Exsudat, wie von Kulturbakterien Aufschwemmungen herzustellen, welche eine gleich grofse Anzahl lebender Zellen enthalten. Das einzige Verfahren, welches einige Aussicht auf Erfolg darbietet, ist die Aussaat gleicher Flüssigkeitsmengen in Agar, Zählung der aufwachsenden Kolonien und eine, je nach dem Ergebnis derselben geregelte Verdünnung. Um dies aber durchzuführen, bedarf es wenigstens eines Zeitraumes von 24 Stunden, während welchen die Exsudatbakterien unkontrollierbare Veränderungen eingehen können.

Auffallend schlechte Resultate gab der Versuch, die Zahl der Bakterien in Aufschwemmungen von Exsudat und Bouillonbakterien im gefärbten Deckglaspräparate festzustellen und im Verhältnis der gewonnenen Werte, Verdünnungen vorzunehmen. Einige derart vorgenommene, ungemein zeitraubende Feststellungen wurden durch das Plattenzählverfahren nachgeprüft und

ergaben Differenzen von vielen Tausenden Kolonien für 1 Öse Aufschwemmung.

Noch die relativ besten Ergebnisse hatte die anscheinend grösste Methode, die darin bestand, die gleich dicht zu machenden Aufschwemmungen in zwei völlig gleichartigen Eprovetten bis auf den gleichen optischen Trübungsgrad zu verdünnen. Dieses Verfahren lieferte halbwegs brauchbare Resultate, als es sich darum handelte, die Bindungskraft von Exsudat und Kulturbakterien zu bestimmen, wozu es ebenfalls notwendig war, von beiden ungefähr gleich viel in Anwendung zu bringen. Dabei kam es freilich nur auf sehr annähernde Genauigkeit an, denn es genügte schliesslich festzustellen, dass von den Exsudatbakterien nicht weniger als von den Kulturmikroben verwendet worden waren. Bedenkt man aber, eine wie geringe Flüssigkeitsmenge man zahlenmässig auf ihren Bakteriengehalt prüfen kann, und wie viel derselben man injizieren muss, so ergibt eine einfache Überlegung, dass Differenzen von einigen hundert Kolonien auf der Platte thatsächlich Verschiedenheiten von vielen Hunderttausenden Bakterien im Tierversuche entsprechen.

So wird es erklärlich, dass trotz vieler angewandeter Mühe keine wirklich einwandfreien Versuche angestellt werden konnten. Es würde wohl bei Verschwendung von Tieren und Anlage sehr grosser Versuchsreihen, vielleicht mehr zufällig, gelingen, Tierpaare zu erhalten, denen genau gleich grosse Mengen des verschiedenartigen Bakterienmaterials einverleibt worden sind; so unbeschränkte Mengen von Tieren standen aber nicht zur Verfügung und ihr Verbrauch würde sich kaum lohnen haben. Denn jedenfalls sind die Unterschiede in der Virulenz, falls solche überhaupt vorhanden sind, nicht sehr bedeutend. Ähnlich liegen die Schwierigkeiten auch dann, wenn es sich darum handelt, die schützende Wirkung eines auf die gewöhnliche Weise, durch Immunisieren mit abgetöteten Agarkulturen, gewonnenen Immunserums gegenüber Exsudat und Kulturbakterien zu vergleichen. Doch liegen hier die Verhältnisse insofern günstiger, als die Feststellung der früher oder später erfolgenden Sterilisation der Meerschweinchenbauchhöhle, nicht in so aufser-

ordentlich hohem Grade von der Zahl der injicierten Bakterien abhängt, vorausgesetzt, daß das verwendete Serum genügend wirksam ist.

Es ergab sich auch hier, daß wesentliche Unterschiede bei Anwendung von Exsudat und Kulturbakterien nicht vorhanden sein können. Die Tiere waren durch die gleiche Menge Serums zu schützen und die eingespritzten Bakterien verschwanden ungefähr um dieselbe Zeit aus der Bauchhöhle. Ganz genaue Feststellungen mußten allerdings auch hier mit Rücksicht auf das relativ geringe, verfügbare Meerschweinchenmaterial unterbleiben, doch läßt sich trotzdem mit Sicherheit aussagen, daß im großen und ganzen die Abweichung der Exsudatbakterien von künstlich gezüchteten gegenüber der Wirkung eines Immunsersums sich hauptsächlich nur auf ihr Verhalten gegen die Agglutinine desselben beziehen kann.

Es mußte nun von Interesse sein, festzustellen, ob die Vorbehandlung von Kaninchen mit solchen, schwer agglutinablen Bakterien ein Serum liefern könne, welches in Bezug auf seine haufbildende Kraft Besonderheiten zeigt. Hier hatten die Versuche in der That Erfolge zu verzeichnen. Freilich sind dieselben auch hier nicht leicht anzustellen. Zu jedem mußten zwei Tiere von genau gleicher Größe und gleichem Ernährungszustande genommen werden. Die immunisierenden Injektionen mußten ungefähr gleichviel Bakterien in jedes der Tiere hineinbringen, Gewichtsverluste, die das eine Tier zeigte, nötigten auch zur Aussetzung der Behandlung des zweiten, auch dann, wenn es selbst gut gedieh.

Die von dem Tierpaare gewonnenen beiden Sera konnten aber nur dann verwendet werden, wenn sie gegenüber Bakterien aus künstlichen Kulturen ungefähr die gleiche agglutinierende Wirksamkeit besaßen. Nur dann hatte eine stärkere haufbildende Eigenschaft bei dem Serum des mit Exsudatbakterien behandelten Tieres beweisende Kraft.

Die Berücksichtigung aller dieser Umstände hatte zur Folge, daß schliesslich nur zwei Serum liefernde Kaninchenpaare zur Verwendung kommen konnten. Die Resultate, die damit

erhalten wurden, waren zwar vollkommen eindeutig und die in mehrfacher Hinsicht vorhandenen Unterschiede ihrer Wirksamkeit waren so auffallende, daß an Zufälligkeiten nicht gut zu denken ist; immerhin aber ist wegen dieser geringen Anzahl der verwendeten Sera eine gewisse Vorsicht bei der Verallgemeinerung der erlangten Ergebnisse geboten.

Die Immunisierungstabelle eines derartigen Kaninchenpaares sei angeführt. Die injizierten Bakterien waren lebend und wurden so frisch als möglich verwendet. Gewichtsabnahmen erfolgten entweder gar nicht oder glichen sich bald aus. Erst ganz am Ende sank das Gewicht des einen Tieres ohne besonders bekannte Veranlassung so rapid ab, daß beide Tiere vorzeitig verblutet werden mußten.

Kaninchen d erhielt intravenös Bakterien aus dem Exsudate von Meerschweinchen, Kaninchen e die entsprechend behandelten und gewaschenen aus Bouillonkulturen.

- 6. II. 1901 1 Öse aus dem gewaschenen, zentrifugierten Satze des Typhusmeerschweinchens 23, bezw. ebensoviel Bouillonbakterien,
- 13. II. 1901 1 Öse aus dem gewaschenen, zentrifugierten Satze des Typhusmeerschweinchens 26, bezw. ebensoviel Bouillonbakterien,
- 19. II. 1901 2 Ösen aus dem gewaschenen, zentrifugierten Satze des Typhusmeerschweinchens 29, bezw. ebensoviel Bouillonbakterien,
- 22. II. 1901 den halben Bodensatz aus dem Exsudate von Nr. 30, bezw. Satz aus 5 ccm Bouillonkultur,
- 27. II. 1901 den halben Bodensatz aus dem Exsudate von Nr. 32, bezw. Satz aus 5 ccm Bouillonkultur,
- 3. III. 1901 fast der ganze Bakteriensatz aus dem Exsudate von Meerschweinchen 34, bezw. Satz aus 10 ccm Bouillonkultur,
- 6. III. 1901 Blut aus den rechten Jugularvenen entnommen: Serum d und e.
- 7. III. 1901 Fast den ganzen Satz aus dem Exsudate von Meerschweinchen 36, bezw. Satz von 10 ccm Bouillonkultur,
- 11. IV. 1901 Ebensoviel aus dem Exsudate von Meerschweinchen 38, bezw. Bouillonkultur.
- 16. IV. 1901 Ebensoviel aus dem Exsudate von Meerschweinchen 45, bezw. Bouillonkultur.
- 22. IV. 1901 Aus den rechten Carotiden Blut entzogen: Serum d I und e I.

Im Anschlusse an die Blutentnahme magert Kaninchen d ohne sonstigen sichtbaren Grund so rasch ab, daß es am 6. V. ebenso wie Kaninchen c ganz verblutet wird: Serum d II und e II.

Ähnlich ist die Immunisierungstabelle des Kaninchenpaares g und h. Die erste Blutentnahme erfolgte nach 14 tägiger Behandlung mit ca. 6 Ösen Bakterienmaterials, die zweite nach weiterer ebensolangen mit größeren Mengen.

Die Verschiedenheit beider Sera gab sich zunächst in ihrem Verhalten gegen Exsudatbakterien zu erkennen.

Versuch XXIII.

Meerschweinchen 36 starb nach Infektion mit 1 Öse Typhusagarkultur in ca. 20 Std. Hängende Tropfen mit dem defibrinierten Vollexsudate und den Serumverdünnungen von c und d 1 : 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000. Kontrolle mit Bouillonkultur und den Verdünnungen 1 : 1000, 2500, 5000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Bouillonkultur durch beide Sera vollständig agglutiniert.

Serum des mit Bouillonbakterien immunisierten Tieres hat bis 1 : 50 vollständig, von da bis 1 : 500 sehr unvollständig, von da an gar nicht mehr agglutiniert. Das andere Serum d hat bis 1 : 2500 durchgreifend agglutiniert.

Nach 1 und 2 Std. hat auch das Serum c bis 1 : 250 ziemlich vollständig agglutiniert und auch noch bei 1 : 500 viele Haufen gebildet, das Serum d hat bei 1 : 2500 vollständige, bei 1 : 5000 noch teilweise Agglutination hervor gebracht.

Die Überlegenheit des Serums d, das von dem mit Exsudatbakterien behandelten Tiere stammt, ist ganz auffallend. Zu bemerken ist, daß beide Sera c und d gegenüber Bouillonkulturen von Typhus ungefähr gleich wirksam waren, bei geringfügiger Überlegenheit des Serums d. Beide agglutinierten um diese Zeit bei der Verdünnung 1 : 10000 und 12500 noch vollständig; bei 1 : 15000 war die Haufenbildung bei Serum c bereits unvollständig, darüber hinaus auch bei Serum d. Doch erzeugte dieses auch noch bei 1 : 20 und 24000 teilweise Agglutination, während das andere in dieser Verdünnung bereits versagte. Ein derartiges Verhalten wurde noch bei anderen Seris konstatiert, doch ist es bisher nicht gelungen, eine Gesetzmäßigkeit aufzufinden.

Der mitgeteilte Versuch ist aber auch noch in anderer Hinsicht interessant. Er zeigt nämlich, daß das durch Behandlung mit Kulturbakterien gewonnene Serum gegen Exsudatbakterien ganz ungewohnt starke Wirkungen entfaltete. Ganz deutlich anders war das Resultat, als das Serum zwei Tage älter war, im folgenden Versuche. Diese, auch sonst beobachtete Eigentümlichkeit, die hier besonders klar hervortritt, wird späterhin von Wichtigkeit werden.

Versuch XXIV.

Vollexsudat eines der intraperitonealen Impfung mit $\frac{1}{4}$ Typhusagarkultur nach 18 Std. erlegenen Meerschweinchens 37 mit den Verdünnungen 1 : 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 der beiden 3 Tage alten Sera c und d. Kontrolle mit Bouillonkultur und den Serumverdünnungen 1 : 5000, 7500, 10000. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Stunde: Bouillonkultur in allen Präparaten agglutiniert, doch durch die Verdünnungen beider Sera auf 1 : 10000 nur unvollständig.

Gegen Exsudatbakterien hatte Serum c nur bei der Verdünnung 1 : 25 vollständig gewirkt, schon bei 1 : 50 fast ganz versagt.

Serum d hatte bis 1 : 500 typische Agglutination bewirkt, bei 1 : 1000 waren viele, aber nur kleine Häufchen vorhanden, sonst war es wirkungslos.

Nach 1 und 2 Std. war das Bild im wesentlichen dasselbe.

Unerwartet rasch war hier die haufenbildende Kraft gegenüber Bouillonkulturen gesunken und zwar glücklicherweise derart dafs jetzt beide Sera bei dem gleichen Verdünnungsgrade aufhörten, vollständige Agglutination herbeizuführen. Um so schöner tritt die Überlegenheit des Serums d gegen Exsudatbakterien hervor. Dennoch hatte dasselbe auch hierin gegen früher eine merkbare Einbusse erlitten und ganz gewaltig war die auch bei Serum c rudimentär vorhanden gewesene Wirkung gegen die tierischen Exsudate zurückgegangen.

Ähnlich, wenn auch nicht so schön, zeigen dies die beiden folgenden Versuche mit den letzten Seris, die von den Tieren c und d gewonnen worden waren.

Versuch XXV.

In der üblichen Weise erhaltene und gewaschene Bakterien aus dem Exsudate des Meerschweinchens 67, das der intraperitonealen Impfung mit $\frac{1}{4}$ Agarkultur in 13 Std. erlegen war, werden mit den Verdünnungen 1 : 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 und 10000 der ganz frischen Sera c II und d II zu hängenden Tropfen verarbeitet. Kontrolle mit ebenso erhaltenen Bouillonbakterien. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind die Bouillonbakterien durch alle Verdünnungen des Serums d II vollständig agglutiniert, während c II bei 1 : 10000 nur eine unvollkommene Haufenbildung geliefert hat.

Exsudatbakterien sind durch Serum d II bis 1 : 1000 agglutiniert, auch 1 : 5000 hat noch viele Häufchen erzeugen können. Serum c II zeigt bei 1 : 10 vollständige, bei 1 : 50 und 100 unvollständige, aber unzweifelhafte Wirkung.

Nach 2 Std. hat Serum d II auch bei 1 : 5000 ziemlich vollständige Haufenbildung hervorgebracht, Serum c II vollständige bei 1 : 50, ziemlich umfassende bei 1 : 100.

Die Wirkung der beiden Sera ist also:

Serum c II für Exsudat	bis 1 : 100	für Bouillon	bis 1 : 5000.
„ d II „ „	„ 1 : 5000 „	„ „	„ 1 : 10000.

Versuch XXVI.

In der üblichen Weise gewaschene Bakterien aus dem Exsudate des der intraperitonealen Impfung nach $\frac{1}{2}$ Typhusagarkultur nach weniger als 12 Std. erlegenen Meerschweinchens 74 werden mit Verdünnungen 1 : 10, 100, 500, 1000, 2500 und 5000 der nunmehr 9 Tage alten Sera c II und d II zu hängenden Tropfen verarbeitet. Kontrolle mit ebenso behandelten Bouillonbakterien. 37°.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. haben beide Sera bei 1 : 2500 noch vollständig agglutiniert, doch sind bei Serum c II nur sehr kleine Häufchen vorhanden. In den Verdünnungen 1 : 5000 ist die Haufenbildung unvollständig.

Exsudatbakterien sind durch Serum c II nur bei 1 : 10 teilweise agglutiniert durch Serum d II bis 1 : 1000, in letzterer Verdünnung aber nicht mehr vollständig.

Nach 1 Std. sind Bouillonbakterien durch beide Sera zu Haufen verwandelt.

Exsudatbakterien sind durch Serum c II bei 1 : 10 vollständig, bei 1 : 100 fast gar nicht mehr beeinflusst worden, von Serum d II noch bei 1 : 1000 doch sind die gebildeten Häufchen hier nur klein.

Die Wirkung der beiden Sera ist somit beträchtlich gesunken.

Was die agglutinative Wirkung der Sera g und h des zweiten verwertbaren Kaninchenpaares betrifft, so war sie nach der ersten Blutentnahme nicht wesentlich verschieden. Die Wirkung gegen Bouillonkulturen hörte für beide bei der Verdünnung 1 : 10000 auf; Exsudatbakterien gegenüber veranlafste das Serum g des mit Bouillonbakterien immunisierten Tieres nur bei der Verdünnung 1 : 10 Haufenbildung, das des mit Exsudatbakterien behandelten Kaninchens h bis zur Verdünnung 1 : 100. Die zweite Entnahme zeigte die gleichen Differenzen beider Sera im Verhalten gegen Exsudatbakterien, indem Serum g I bei 1 : 25 gerade noch vollständig agglutinierte, Serum h I dagegen noch bei 1 : 500. Dabei waren auffallenderweise die haufbildenden Werte gegen Bouillonkulturen gegen die Bestimmung der Sera der ersten Entnahme fast genau die gleichen geblieben.

B. Die Entstehung von Fällungen in Typhusexsudaten und Filtraten von Bouillonkulturen durch Immunserum.

Seitdem Kraus im Jahre 1897 zuerst die Aufmerksamkeit auf die Bildung von Niederschlägen in Filtraten von flüssigen Kulturen nach Zusatz des Serums gegen die betreffenden Mikroorganismen immunisierter Tiere gelenkt hatte, hat dieses

Phänomen in der Immunitätslehre stets eine große Rolle gespielt. Paltauf und Kraus selbst verwerteten dasselbe zunächst zu einem Erklärungsversuche des Mechanismus der Agglutination, indem sie annahmen, daß die Haufenbildung von Bakterien nichts anderes sei als eine sekundäre Zusammenballung infolge der Entstehung von Niederschlägen in der Kulturflüssigkeit.

Diesem Erklärungsversuche nähert sich die Auffassung Nicolles. Nicolle nimmt an, daß eine Agglutination nur beim Vorhandensein zweier Stoffe erfolgen könne, die sich gewissermaßen zu einer unlöslichen neuen Verbindung vereinigen. Die eine dieser Substanzen, die »agglutinierende« bilde einen Bestandteil des Immunserums, die zweite, die »agglutinierte« (wohl besser gesagt die »agglutinable«) sei ursprünglich nur in dem Bakterienleibe vorhanden und zwar in dessen äußeren Schichten. Bei länger dauernder Kultur gehe sie teilweise in Lösung und befinde sich auch in der Kulturflüssigkeit. Setzt man Immunserum zu Bakterien, so verbinde sich die agglutinierende Substanz in der Zelle selbst mit der agglutinablen, wodurch die Membran der Bakterien nunmehr fähig werde, mit der anderen, in gleicher Weise beeinflufster zu verkleben. Erfolgt der Zusatz des spezifischen Serums zu älteren flüssigen Kulturen, so verbindet sich die gelöste agglutinable Substanz mit der agglutinierenden zu einem makroskopisch sichtbaren, der Färbung zugänglichen Niederschlag. In einer späteren Arbeit von Kraus und Seng¹⁾ wird nochmals betont, daß die Entstehung von Niederschlägen bei der Agglutination das Wesentliche sei; durch diese werden erst die Bakterien passiv zu Haufen vereinigt.

Kritische Bemerkungen zu diesen Ansichten finden sich, mehr gelegentlich bei Nolf²⁾, ferner bei Bordet³⁾ und namentlich in der Arbeit Radzievskys⁴⁾.

Radzievsky betont zunächst das zeitliche Mißverhältnis zwischen dem Eintreten der Agglutination und dem Entstehen

1) Kraus und Seng, Wiener klin. Wochenschrift, 1899, Nr. 1.

2) Nolf, Annales de l'Inst. Pasteur, 1900.

3) Bordet, a. a. O.

4) Radzievsky, Centralblatt f. Bakteriologie, 1899, Nr. 24; Zeitschrift f. Hygiene, 1900, S. 369 ff.

der Niederschläge; ersteres sei innerhalb von zwei Stunden im wesentlichen beendet, letzteres bedürfe zum bloßen Sichtbarwerden mindestens eines Zeitraumes von 6 Stunden. Ferner weist er darauf hin, daß junge Kulturen in ihrem Filtrate überhaupt noch keine Niederschläge entstehen lassen, während sie, so lange sie noch bakterienhaltig sind, schöne Agglutination liefern, ein Einwand, der weniger Nicolle, als namentlich die Kraus-Paltaufsche Hypothese trifft.

Durch direkte Versuche wies er nach, daß in einem Kulturfiltrate, dem Serum und durch dieses nicht agglutinable Bakterien zugesetzt worden sind, dennoch eine Klärung der Flüssigkeit nicht zu erfolgen braucht, daß also »ein spezifischer Bodensatz sich bilden kann, ohne die Mikroben mit sich niederzureißen«.

Die größte Bedeutung kommt jedoch einem Versuche Radzievskys zu, der die Unabhängigkeit des Agglutinationsphänomens von der Bildung spezifischer Fällungen in zwingender Weise klarlegt. Er versetzte Filtrat einer fünf Wochen alten Kultur von *Bacterium coli* mit dem zugehörigen Immunserum; nach 24 Stunden hatte sich ein üppiger Bodensatz gebildet. Die über demselben stehende klare Flüssigkeit vermochte aber wiederum in Röhrchen mit frischer Bouillonkultur Agglutination hervorzurufen, was nicht mehr hätte der Fall sein dürfen, wenn die niederschlagsbildende und agglutinierende Kraft des Immunserums auf denselben Stoff zurückgeführt werde. Man kann Radzievsky nur vollständig beistimmen, wenn er neben der bakteriolytischen und der agglutinativen Eigenschaft eines Immunserums noch ein drittes, selbständiges Vermögen annimmt, das: »eine Reaktion der spezifischen Bodensätze im Filtrate alter Kulturen hervorzurufen«. In diesem Sinne stimmen die Anschauungen Radzievskys völlig mit den mehr minder deutlich ausgesprochenen Versuchsergebnissen Bordets und Nofls überein. Immerhin läßt sich gegen den erwähnten Versuch Radzievskys noch der Einwand erheben, daß die quantitativen Ausfällungsverhältnisse nicht genügend exakt berücksichtigt worden seien. Es geht aus seiner Mitteilung nicht hervor, daß

die ausfällende Substanz seines Coliserums wirklich durch das Colifiltrat erschöpft wurde. Zusammengehalten mit der Angabe, daß die Agglutination von lebenden Bakterien, durch das mit dem Filtrat in Berührung gewesene Serum verlangsamt eingetreten und etwas schwächer verlaufen sei, bleibt immer noch der Vermutung Raum, daß in dem Versuche von Radzievsky die Fällungskraft nicht wirklich erschöpft war. Damit würde natürlich der an sich vollständig richtige Versuch wesentlich an Beweiskraft verlieren. Gelegenheit zu eigenen Versuchen über die niederschlagbildende Komponente eines Typhusimmunsersums gab die Beobachtung, daß das Serum des mit Typhus-exsudatbakterien vorbehandelten Tieres in außerordentlich hohem Maße die Fähigkeit besaß, Fällungen bei Zusatz von Filtraten alter Typhusbouillonkulturen zu geben. Ein wesentlich höheres Interesse gewannen dieselben, als es sich zeigte, daß auf Zusatz von Immuns serum zu bakterienfrei gemachten Typhus-exsudaten ebenfalls eine außerordentlich starke Fällungsreaktion auftritt. Alle bisherigen Angaben über die Entstehung der Niederschläge in Filtraten von Bouillonkulturen stimmen darin überein, daß bis zum Sichtbarwerden einer Trübung in der vorher ganz klaren Flüssigkeit und weiterhin bis zur Zusammenballung der Trübung zu Flocken eine lange Zeit vergeht. Kraus stellte seine Versuchsproben 24 Stunden lang in den Brutschrank, Nicolle dehnte seine Versuche ebenfalls auf Stunden hinaus aus und Radzievsky, der offenbar bisher die stärksten Reaktionen erhalten hatte, giebt an, daß der Niederschlag, gleichgültig ob bei Zimmer- oder Bruttemperatur, gewöhnlich nach 5—6 und nur mitunter schon nach 3 Stunden entstand.

Alle zwölf untersuchten, auf gewöhnliche Weise, d. h. durch Behandlung mit toten oder lebenden Bakterien gewonnene, Typhusimmunsere verhielten sich ähnlich. Doch wurde bemerkt, daß sich auf Zusatz größerer Mengen von Immuns serum zu relativ geringen Quantitäten Kulturfiltrates die Bildung einer Trübung wesentlich beschleunigen liefs.

Ebenso konnten die bisherigen Angaben dahin bestätigt werden, daß der Niederschlag um so reichlicher ausfällt, je älter

und je üppiger gewachsen die Kultur war, aus welcher das Filtrat hergestellt wurde.

Die Art und Weise der Ausbildung und Absetzung des Niederschlags wird in den folgenden Versuchsprotokollen angegeben werden. Die erste Beobachtung starker Fällungseigenschaften geschah bei Untersuchung des erstentnommenen Serums des mit Exsudatbakterien vorbehandelten Kaninchens d.

Versuch XXVII.

Zu je 5 ccm Filtrat einer 1 Monat alten Typhusbouillonkultur (die Filtration erfolgte in diesem wie in allen anderen Versuchen durch Berkefeldfilter) werden 0,2, 0,1 und 0,05 ccm Serum d und c (s. die Immunisierungstabelle auf S. 347) zugesetzt.

In allen Röhren entsteht fast unmittelbar nach dem Zusatz von Serum d dichte Trübung, die bei den Proben mit 0,2 und 0,1 ccm Serum nach $\frac{1}{2}$ Std., bei der mit 0,05 ccm erst nach etwa 1 Std. bei Zimmertemperatur flockig wird und sich dann rasch absetzt. Nach 12 Std. ist überall ein starker Bodensatz gebildet, der aber deutlich an Menge von der Probe mit 0,2 zu der mit 0,05 ccm Serum abnimmt.

Serum c hatte bei Zusatz von 0,2 ccm nach 2 Std. eine spurenweise Trübung gezeigt, nach 12 Std. hatte sich darin ein geringfügiger Satz gebildet, das Röhren mit 0,1 ccm war leicht trüb, das mit 0,05 ccm blieb klar.

Das Wichtigste, was aus diesem sowie den folgenden Versuchen neben Feststellung der ungemein starken fallenden Wirkung des Serums d hervorgeht, ist die Thatsache, dafs ein auf gewöhnliche Weise durch Immunisation mit Kulturbakterien gewonnenes Serum überhaupt nur relativ sehr wenig präcipitierende Kraft besitzt. Wenn trotzdem beide Sera, d und c, nahezu gleich stark lebende Bakterien agglutinierten, so folgt daraus unmittelbar der Schluss einer völligen Unabhängigkeit der niederschlags- und der haufenbildenden Wirkung.

Versuch XXVIII.

Mit dem zweiten, den Kaninchen c und d entnommenen Seris (als Serum c I und d I bezeichnet; s. die Immunisierungstabelle auf S. 347). Das selbe wird in der Menge von 0,4, 0,2, 0,1 ccm zu je 4 ccm Filtrat einer 2 Monate alten Typhusbouillonkultur zugesetzt.

Auf Zusatz von Serum d I entsteht in allen Proben sofort eine starke Trübung, die nach 2stünd. Stehen bei Zimmertemperatur bereits dicht flockig und nach 4 Std. bereits ganz unter Klärung der Flüssigkeit abgesetzt ist. Zusatz von 0,4 ccm Serum c I erzeugt nach etwa 10 Minuten eine leichte Trübung, die nach 2 Std. stärker ist, nach 6 Std. unverändert besteht. Bei

Zusatz von 0,2 ccm Serum e I wird erst nach 2 Std. eine leichte Trübung bemerkt, die nach 6 Std. unverändert ist. Nach 24 Std. hat sich bei 0,4 und 0,2 ccm Serum c I ein geringfügiger Bodensatz gebildet; Zusatz von 0,1 ccm Serum c I hat überhaupt weder Trübung noch Niederschlag erzeugt.

Versuch XXIX.

Mit dem dritten, den Kaninchen c und d entnommenen Seris (Serum c II und d II), welche in den Mengen von 0,1, 0,05 und 0,01 ccm zu je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat von einer fast 2 Monate alten Kultur zugesetzt werden. Die Proben mit Serum d II werden fast sofort trüb, die Trübung wird nach 0,1 Serum binnen 2 Std. bei Zimmertemperatur grobflockig und setzt sich ab, viel schwerer erfolgt der Absatz bei 0,05 ccm, wo er nach 4 Std. noch nicht beendet ist. Zusatz von 0,01 ccm hat zwar die Flüssigkeit dicht getrübt, aber Flocken sind um diese Zeit noch nicht gebildet. Nach 24 Std. sind alle Röhrchen klar mit reichlichen, aber an Menge deutlich von 0,1 zu 0,01 Serum abnehmendem Satze. Serum c II hat erst bei 0,1 ccm nach 24 Std. eine zweifelhafte Trübung erzeugt und ist sonst wirkungslos geblieben.

Wie bereits erwähnt, waren bei der Immunisierung eines zweiten Kaninchenpaares, g und h, die zuerst entnommenen Sera beider Tiere wenig voneinander verschieden; jedenfalls war das des mit Exsudatbakterien vorbehandelten Tieres h lange nicht so agglutinativ wirksam gegen Typhusexsudat wie das des früher in gleicher Weise immunisierten Tieres d.

Ganz in Übereinstimmung damit waren auch seine fällenden Eigenschaften wenig ausgesprochen.

Versuch XXX.

Zu je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat werden 0,25, 0,1 und 0,05 ccm Serum g und h zugesetzt. Nach ca. 10 Minuten zeigt sich schwache Trübung bei 0,25 ccm Serum h. Nach 1/2 stünd. Aufenthalte bei 37° erscheint eine ebensolche bei 0,1 ccm Serum h und 0,25 ccm Serum g. Die Trübungen werden binnen 3 Std. bei 37° nicht merkbar stärker. Nach weiterer 12 stünd. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur hat sich in der Probe mit 0,25 Serum h ein ziemlich starker, in 0,1 ein wesentlich geringerer, in 0,05 ein sehr unbedeutender Satz gebildet. Serum g hat in der Menge von 0,25 ccm einen geringen Satz erzeugt und war sonst wirkungslos.

Mit dem Steigen der agglutinierenden Wirkung gegen Exsudatbakterien war auch eine vermehrte Fällungskraft für Typhusfiltrate verbunden. Dieses auffallende Zusammentreffen macht es, trotz der zu geringen Zahl untersuchter Sera wahrscheinlich, daß die Behandlung von Tieren mit Exsudatbakterien regelmäßig mit einer wesentlichen Steigerung der niederschlagsbildenden Wirkung einhergeht.

Versuch XXXI.

Zu je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat werden 0,5, 0,25, 0,1 und 0,05 ccm Serum h I bzw. g I zugefügt. Bei 0,5 und 0,25 ccm Serum h I entsteht fast sofort Trübung, die nach $\frac{1}{2}$ Std. sehr stark und nach 1 Std. (Zimmertemperatur) flockig wird. Bei 0,1 ccm Serum h I bedarf es 5, bei 0,05 ccm etwa 10 Minuten, ehe Trübung entsteht, die nach $\frac{5}{4}$ Std. stärker und wenigstens bei 0,1 ccm Serum flockig wird. Serum g I erzeugt mit 0,5 ccm nach etwa $\frac{1}{4}$ Std. leichte Trübung, die ebenso wie die etwas später bei 0,25 und die nach ca. 1 Std. entstehende, bei 0,1 ccm durch 2 Std. ohne stärker zu werden, bestehen bleibt. Nach weiteren 18 Std. bei Zimmertemperatur zeigen alle Proben mit Serum h I reichlichen Satz, der aber von 0,25 ccm Serum an bis 0,05 ccm an Menge deutlich abnimmt. Serum g I hat bei 0,5 und 0,25 ccm nur einen sehr geringen Satz, bei 0,1 ccm nur eine Trübung erzeugen können, 0,05 ccm sind wirkungslos geblieben.

Die starken fällenden Wirkungen des Serums d wurden dazu benutzt, um einige auf die Niederschlagsbildung bezügliche Fragen zu studieren. Zunächst galt es, die Abhängigkeit der agglutinierenden und präcipitierenden Serumwirkung voneinander festzustellen. Die dabei leitende Überlegung war dieselbe, welche auch den bereits besprochenen Versuch von Radzievsky veranlaßt hatte. Wenn die fällende Wirkung mit der haufenbildenden enge verbunden oder gar mit ihr identisch ist, so muß nach Erschöpfung eines Serums mit dem Filtrat von Typhusbouillonkulturen auch die bakterienagglutinierende Eigenschaft verschwunden oder doch wesentlich herabgemindert sein. Der Gang der Versuche ist aus den nachfolgenden Protokollen ersichtlich; zur Prüfung der etwa geschwächten agglutinierenden Wirkung wurden empfindliche junge Typhusbouillonkulturen und das der makroskopischen Beobachtung überlegene Verfahren¹⁾ der mikroskopischen Prüfung im hängenden Tropfen angewendet.

Versuch XXXII.

10 ccm Typhusbouillonfiltrates werden mit 0,1 ccm Serum d versetzt ebenso 10 ccm physiologische NaCl-Lösung zur Kontrolle. Es entsteht im Augenblicke des Einfallens der Serumtropfen eine weißliche Trübung, die sich sehr bald der ganzen Flüssigkeit mitteilt, nach $\frac{1}{2}$ Std. sehr stark und nach 3 Std. (Zimmertemperatur) bereits ganz flockig geworden ist. Nach 20 Std. hat sich unter Klärung ein sehr reichlicher Satz gebildet.

1) Gruber, Münchner mediz. Wochenschrift, 1897, Nr. 17.

Die Probe wird centrifugiert, die überstehende, völlig klare Flüssigkeit abgossen und gleichzeitig mit der Kontrolle auf ihre agglutinierende Kraft geprüft; ihr Serumgehalt (0,1 ccm zu 10 ccm Flüssigkeit) entspricht einer Verdünnung 1 : 100. Die mit 14 stünd. Bouillonkultur angelegten hängenden Tropfen zeigen hier wie in der Kontrolle nach $\frac{1}{4}$ Std. vollkommene Agglutination.

Versuchsprobe wie Kontrolle werden nun nach und nach auf die Verdünnungen 1 : 1000, 5000, 7500, 10 000, 12 500, 15 000 gebracht und erzeugten unterschiedslos Agglutination. Von da an erzeugten die Verdünnungen 1 : 16-, 17-, 18-, 19-, 20-, 22- und 24 000 noch unvollständige Agglutination, 1 : 25 000 war wirkungslos bei beiden.

Inzwischen war 1,5 ccm sowohl der abgossenen Flüssigkeit als der Kontrollprobe mit 1,5 ccm frischen Typhusfiltrates versetzt. In der Kontrollprobe entsteht Trübung, die Versuchsprobe blieb klar. Es war somit alle fallende Substanz des Serums verbraucht worden. Schliesslich wurden 4,5 ccm der abcentrifugierten Flüssigkeit mit 0,05 ccm frischen Serums d versetzt. Es entsteht nach Verlauf von $\frac{1}{2}$ Std. eine leichte Trübung, die nach 3 Std. viel deutlicher wird und sich nach 24 Std. flockig abgesetzt hat. Ihre Intensität ist aber wesentlich geringer als die, die früher in einem unveränderten Filtrate aufgetreten war. Es hatte somit die zugesetzte Serummenge von 0,1 ccm die in 10 ccm Typhusfiltrat enthaltene Menge ausfällbarer Substanz nicht völlig niederschlagen können. Von einem etwa im Überschusse zugesetzten Serum ist also keine Rede.

Versuch XXXIII.

Je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat erhalten einen Zusatz von 0,2, 0,1, 0,05 ccm Serum d. Kontrolle mit ebensoviel Serum in 5 ccm steriler Bouillon.

Die fast augenblicklich trübe gewordenen und rasch abgesetzten Proben werden nach 24 stünd. Stehen bei Zimmertemperatur centrifugiert und die obestehenden Flüssigkeiten im hängenden Tropfen geprüft; sie agglutinieren unterschiedslos bei 1 : 15 000 vollständig. Je 2 ccm der abcentrifugierten klaren Flüssigkeiten werden neuerdings mit je 1 ccm Typhusbouillonfiltrat versetzt. Die serumhaltige Kontrollbouillon wird fast augenblicklich trüb, von den Versuchsproben bleibt die, welche 0,05 ccm Serum d enthalten hatte, überhaupt klar, die mit 0,2 ccm Serum gibt nach $\frac{1}{2}$ Std., die mit 0,1 ccm erst nach 2 Std. Trübung. Nach 24 stünd. Stehen wird centrifugiert, und die abgossenen Flüssigkeiten werden insgesamt nochmals mit frischer Typhusbouillonkultur im hängenden Tropfen geprüft. Es zeigt sich unterschiedslos vollständige Agglutination bis 1 : 10 000. Bei 1 : 15 000 ist die Haufenbildung in allen Proben unvollständig, wohl infolge des 2 tägigen Stehens in verdünntem Zustande.

Danach kann es wohl keinem Zweifel mehr unterliegen, dass das Kraus'sche Phänomen mit der Agglutination in keinerlei engerem Zusammenhange steht, und dass die, eine Fällung veranlassenden, präcipitierenden Substanzen des Typhusimmunserums

völlig unabhängig von den die Zusammenballung der Bakterien bewirkenden, agglutinierenden sind. Zusammengehalten mit den Erfahrungen Nofls, Tchistowichs und Bordets an roten Blutkörperchen, sowie denen Radzievskys an Colibakterien dürfte diesem Satze wohl Allgemeingültigkeit für sämtliche Immunsera zukommen.

Ganz entsprechende Fällungen wie im Filtrat von Typhuskulturen in künstlichen Medien erhält man nun auch in Typhus-exsudaten, welche durch Filtration oder ausgiebiges Centrifugieren von ihrem Bakteriengehalte befreit worden sind. Diese Niederschläge wurden schon mit gewöhnlichen Immunsereis erhalten, viel schöner und schneller aber traten sie wieder bei Verwendung von Seris des Kaninchens *d* auf.

Versuch XXXIV.

Die Bauchhöhle des der Infektion mit 3 Ösen Typhusagarkultur in weniger als 15 Std. erlegenen Meerschweinchens 33 wurde mit 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, das Spülwasser centrifugiert und die abgegossene, leicht opalisierende Flüssigkeit durch Berkefeldfilter filtriert. Das ganz klare, wenig gelbe Filtrat wurde zu je 1 ccm mit 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 und 0,001 ccm eines auf gewöhnliche Weise gewonnenen bis 1 : 2500 agglutinierenden Serums versetzt. Kontrolle 1 ccm Exsudat mit 0,2 ccm Normalserum. Nach 3stünd Aufenthalt bei 37° war nichts Besonderes zu bemerken, nach 20stünd. Stehen waren bei 0,1 und 0,05 ccm Serum grobflockige starke, bei 0,01 und 0,005 ebensolche, aber schwächere Bodensätze gebildet, die aus feinkörniger Masse bestanden. 0,001 ccm Serum hatte ebenso wie das Normalserum nicht gewirkt.

Versuch XXXV.

Exsudat der im Versuche XVI verwendeten Maus mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, 2fach centrifugiert, wird zu je 1 ccm mit 0,2, 0,1 und 0,05 ccm desselben Serums wie im vorigen Versuche versetzt. Kontrolle 2 Röhrchen mit 1 ccm Exsudat und 0,2 und 0,1 ccm Normalserum. 37°.

Nach 1 Std. ist in allen Proben mit Immunsereum dicke Flockenbildung eingetreten, der bald Absetzung und Klärung folgt. Das Normalserum hat keine Veränderung hervorgerufen.

Versuch XXXVII.

Vereinte Spülwässer der Peritonealhöhlen zweier Meerschweinchen werden centrifugiert und durch Berkefeldt filtriert. Die durch die starke Verdünnung nur mehr wenig gelb gefärbten Filtrate werden in Eproutetten zu je 5 ccm eingefüllt und mit 0,2, 0,1 und 0,05 ccm Serum c und d versetzt. Zimmertemperatur.

Binnen $\frac{1}{4}$ Std. entsteht in den Proben mit 0,2 und 0,1 innerhalb 1 Std. in der mit 0,05 ccm Serum d Trübung. Nach Verlauf von 3 Std., innerhalb welcher Zeit die Trübung immer stärker wurde, entsteht Flockenbildung und rascher Absatz. Serum c hat während dieser Zeit eine sichtbare Änderung nicht hervorgerufen.

Nach 20 Std. sind die Proben mit Serum d klar mit an Menge deutlich abgestuften Bodensätzen. Serum c hat nur bei 0,2 ccm Bodensatz erzeugt.

Die Prüfung der überstehenden klaren Flüssigkeiten ergab unveränderte Agglutinationskraft gegen Typhusbouillonkultur

Die Thatsache der Niederschlagsbildung in selbst sehr stark verdünnten Typhusexsudaten hat an sich nichts Auffälliges. Denn offenbar beruht die Fällung auf dem Vorhandensein von Produkten des Typhusbakteriums, gleichgültig zunächst, ob das von vornherein lösliche Stoffwechselerzeugnisse sind, oder aber sekundär aufgelöste Bakterien-substanzen. Beide müssen sich im Exsudate ebensogut wie in der Kultur finden. Die Besonderheit liegt nur darin, daß die Exsudate in so kurzer Zeit, 12 bis 20 Stunden, fertig gebildet sind und schon starke Niederschläge geben, während junge, 24 Stunden alte Kulturen, wenn sie überhaupt eine Fällungsreaktion erkennen lassen, auf Zusatz auch von Serum d, dI und dII, nur äußerst wenig reagieren. Es muß also die Ausbildung der mit Immuserum fällbaren Stoffe im Exsudate ungewöhnlich reichlich vor sich gehen.

Weitere Untersuchungen befaßten sich mit der Widerstandsfähigkeit der fällenden Stoffe des Immuserums und der ausgefällten der Kulturfiltrate gegen Hitze.

Was die ersteren betrifft, so vertragen sie jedenfalls Temperaturen von 60°, ohne zerstört zu werden.

Versuch XXXIX.

Serum dI wird $\frac{1}{2}$ Std. und 1 Std. auf 60° erhitzt und zu je 0,25 ccm je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat zugesetzt. 37°.

In allen Proben entsteht sofortige Trübung, ohne Unterschied gegen die Kontrolle, welche nicht erhitztes Serum enthielt. Schon nach $\frac{1}{2}$ Std. beginnt Flockenbildung, nach 2 Std. ist der größte Teil der Flocken bereits am Boden abgesetzt.

Vielleicht findet aber doch durch die Temperatur von 60° eine gewisse Schädigung statt, wofür der folgende Versuch zu sprechen scheint. Diese betrifft vornehmlich das wenig fällende Serum c.

Versuch XL.

a) Je 4 ccm Typhusbouillonfiltrat werden mit 0,4, 0,2, 0,1 ccm Serum d I bzw. c I versetzt. In der einen Hälfte der Proben ist dasselbe unverändert, in der andern $\frac{1}{2}$ Std. auf 60° erhitzt. (Für das unerhitzte Serum d I und c I bereits teilweise im Versuch XXIX mitgeteilt.) Die Proben mit erhitztem Serum d I werden fast augenblicklich trübe, doch ist die Trübung nach 2 Std. schwächer als in den nicht erhitzten Proben, und auch nach 4 und 6 Std. noch nicht flockig abgesetzt. Das erhitzte Serum e I hat binnen 6 Std. nur in der Menge von 0,4 ccm eine leichte Trübung erzeugt. Nach 24 Stunden haben alle Proben mit Serum d I Bodensatz gebildet, und unterscheiden sich nicht von den Proben mit normalem Serum. Wie die Trübung der mit 0,4 und 0,2 ccm erhitzten Serums e I versetzten Proben beweist, ist auch hier die Serumwirkung hervorgetreten, 0,1 ccm Serum c I hat in keinem Falle eine Wirkung geübt.

b) Spülwasser aus der Bauchhöhle des Typhusmeerschweinchens 49 wird durch Berkefeldtfilter filtriert, und zu je 3 ccm mit 0,3 ccm teils normalem, teils $\frac{1}{2}$ Std. auf 60° erhitztem Serum c I und d I versetzt. Bei Zusatz von Serum d I entsteht sofortige Trübung, die schon nach $\frac{1}{2}$ Std. flockig wird und nach 3 Std. ganz abgesetzt ist; dabei besteht keinerlei Unterschied in der Wirkung erhitzten und normalen Serums. Unerhitztes Serum c I erzeugt nach 1 Stunde Trübung, die nach 3 Std. stärker geworden ist und nach 24 Std. einen schwachen Bodensatz bildet, das erhitzte Serum ruft erst nach 2 Std. eine schwache Trübung hervor, die auch nach 24 Std. stationär bleibt.

Bestimmtere Resultate ergaben sich bei der Untersuchung der Hitzebeständigkeit der aus Kultur- und Exsudatfiltraten ausfallenden Stoffe. Dieselben widersprechen aber den bisher über diesen Gegenstand vorliegenden Angaben, wobei zu bemerken ist, daß diese Angaben selbst nicht untereinander übereinstimmen.

Nicolle fand, daß seine »substance agglutinée« hitzebeständig sei und durch 120° nicht geschädigt werde. Nur die aus Typhuskulturen ausfällbare Substanz sei etwas empfindlicher.

Im Gegensatze dazu fand Spiegelberg¹⁾, daß Erwärmung der Kulturfiltrate die Entstehung der Krausschen Niederschläge verhindere.

Im direkten Gegensatze zu diesen Angaben lieferte das Studium der Ausfällungserscheinungen mit Serum d das Resultat einer geradezu absoluten Hitzebeständigkeit der aus Typhuskulturen fällbaren Stoffe, ein Resultat, das durch die Unter-

1) Zeitschrift f. Hygiene, 1899.

suchung der Art dieser Substanzen eine Bestätigung und Erklärung fand.

Versuch XLI.

Je 5 ccm Typhusbouillonfiltrat werden folgenden Erwärmungen ausgesetzt:

1. $\frac{1}{2}$ Std. auf 60°
2. 1 „ „ „
3. 2 „ „ „
4. $\frac{1}{2}$ „ „ „ 75°
5. 1 „ „ „
6. 2 „ „ „
7. $\frac{1}{4}$ „ im siedenden Wasserbade
8. $\frac{1}{2}$ „ „ „ „
9. 2 „ „ „ „
10. ohne jede Erhitzung, als Kontrolle.

Danach werden jedem Röhrchen 0,25 ccm Serum d1 zugesetzt.

Die Trübung erfolgt in allen Proben fast sofort nach Zusatz des Serums, ist nach $\frac{1}{2}$ stünd. Aufenthalt bei Zimmertemperatur dichter geworden, zeigt nach 2 Std. überall weit vorgeschrittene Flockenbildung und mehr oder weniger vollständigen Absatz, der am frühesten bei den auf 100° erhitzten Proben beendet wird.

Mit diesem Ergebnis stimmt völlig die Thatsache überein, daß man eine ältere Typhusbouillonkultur erst im strömenden Dampfe ($\frac{1}{2}$ —1 Stunde) sterilisieren und dann erst filtrieren kann, ohne die Ausfällbarkeit derselben durch Immuns Serum sinnfällig zu schädigen.

Diese Hitzebeständigkeit gab durch folgende Überlegung Veranlassung zur Ermittlung der Natur der ausfallenden Stoffe. Von allen bisher bekannten Stoffen der Bakterienzelle sind es die Bakterienproteine im Sinne Buchners allein, welche ohne Schaden über 100° hinaus erwärmt werden können. Da sowohl in alten Bouillonkulturen, wie auch sehr rasch im Tierkörper eine Auflösung der Bakterienleiber stattfindet, so müssen sowohl in Kulturfiltraten, wie in tierischen Exsudaten derartige Proteine vorhanden sein. Sind sie es aber wirklich, welche auf Zusatz von Immuns Serum einen unlöslichen Niederschlag geben, so muß auch eine künstlich hergestellte Typhusproteinlösung durch Immuns Serum fällbar sein.

Teilweise hat schon Kraus in seiner ersten Mitteilung den Beweis für diese Anschauung erbracht. Denn was er durch das

Antrocknen von Bakterien und nachheriges Auslaugen in alkalischer Bouillon in Lösung brachte, waren wohl zum guten Teile Buchnersche Proteine.

Zur Herstellung der Proteine wurde ein schon bei früheren Untersuchungen verwendetes, dem Buchnerschen nachgebildetes Verfahren benutzt.

Versuch XLII.

12 üppig gewachsene Typhusagarkulturen werden in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zentrifugiert. Nach vollständigem Abgießen der spurenweise gelblichen (infolge ihres Kondenswassergehaltes) Flüssigkeit wird der weissgraue Satz in 24 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und in einer Druckflasche im Ölbad 3 Std. lang bei 120 bis 130° gehalten. Nach dem Abkühlen resultiert eine trübe Flüssigkeit, die auffallend leicht durch Berkefeldfilter hindurchgeht. Das Filtrat, welches das Aussehen einer lichten Bouillon hat und völlig klar ist, wird zu je 2 ccm in Eprouvetten verteilt und mit 0,2, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 und 0,001 ccm Serum d II versetzt.

Es entsteht auf Zusatz von 0,2, 0,1 und 0,05 ccm Serum fast augenblicklich dichte Trübung, die teilweise schon nach $\frac{1}{4}$ Std. flockig wird. Bei 0,01 ccm Serum braucht es etwa eine, bei 0,005 ccm 10 Min. (37°), ehe Trübung eintritt. 0,001 ccm ist wirkungslos. Nach 24stünd. Aufenthalte bei 37° ist überall Bodensatz gebildet, reichlich und gleich stark in den Röhren mit 0,2, 0,1, 0,05 ccm Serum, viel geringer bei 0,01 und 0,005 ccm. Nur die Probe mit 0,001 ccm Serum ist unverändert klar geblieben.

Versuch XLIII.

Je 5 ccm in der gleichen Weise wie im vorigen Versuche gewonnenen Typhusproteins erhalten einen Zusatz von je 0,1 ccm Serum d II und e II.

Das Serum d II ruft sofort Trübung hervor, die zusehends stärker und nach ca. $1\frac{1}{2}$ Std. flockig wird; Serum e II bleibt ohne Wirkung. Nach 20stünd. Aufenthalt bei Zimmertemperatur hat sich in den Röhren mit Serum d II ein starker Bodensatz gebildet, das andere ist unverändert.

Es tritt also auch die sehr charakteristische Differenz der Fällungsfähigkeit der beiden Immunsere in Proteinlösungen gerade so gut auf wie in Typhusbouillonfiltraten, eine sehr wertvolle Stütze der Annahme einer Proteinnatur der mit spezifischem Serum fällbaren Stoffe.

Diese wird noch weiter wahrscheinlich gemacht durch folgende Versuche, deren Prinzip ein sehr durchsichtiges ist. Die Versuche XXXII und XXXIII zeigen deutlich an, daß die agglutinierende Substanz eines Serums unabhängig ist

von der ausfallenden; denn die Erschöpfung der letzteren hat keine Schwächung der ersteren zur Folge. Theoretisch könnte nun auch umgekehrt ein durch Bakterienzusatz an Agglutininen erschöpftes Serum seine fallende Kraft beibehalten. Sind es aber die Proteine, welche durch die Serumpräcipitine ausgefällt werden, so muß dieser Fall nicht eintreten, da ein mit Typhusbakterien versetztes Serum Gelegenheit hat, sich mit den noch in den Zelleibern vorhandenen Proteinen zu verbinden. Falls wirklich die Verbindung Bakterienprotein-Serumpräcipitin ebenso gut bei den noch im Zelleibe vorhandenen Proteinen erfolgt, wie bei den gelösten, so muß ein mit Bakterien versetzt gewesenes Serum auch an präcipitirender Kraft verloren haben.

Versuch XLIV.

Je 1 ccm Serum d II wird mit 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung versetzt. In diesen 2 ccm sind das eine Mal zehn mäsig gewachsene Typhusagarkulturen aufgeschwemmt, die andern reinen 2 ccm dienen als Kontrollzusatz. Binnen kurzer Zeit erfolgt Agglutination. Hierauf wird centrifugiert, in der klar abgegossenen Flüssigkeit wird wieder eine Agarkultur aufgeschwemmt und die trübe Flüssigkeit mit dem früheren Bodensatz wieder vereint. In dieser Weise wurden nach und nach 17 Agarkulturen verwendet, ohne daß das Serum an Agglutininen völlig erschöpft gewesen wäre. Danach wird die durch Centrifugieren neuerdings geklärte Flüssigkeit zu je 2 ccm Typhusbouillonfiltrat zugesetzt; ebenso die bakterienfrei gebliebene Kontrolle, und zwar:

1. Je 2 ccm Typhusfiltrat	+ 0,1 ccm Versuchs-	bzw. 1 a)	Kontrollflüssigkeit
2. „ 2 „	„ + 0,2 „	„ 2 a)	„
3. „ 2 „	„ + 0,3 „	„ 3 a)	„
4. „ 2 „	„ + 0,5 „	„ 4 a)	„
5. „ 2 „	„ + 0,75 „	„ 5 a)	„
6. „ 2 „	„ + 1 „	„ 6 a)	„

Sämtliche Proben mit der Kontrollflüssigkeit werden fast sofort trübe, in 4 a bis 6 a bilden sich binnen $\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur grobe Flocken. Nach 1 Std. sind die Flocken in 3 a bis 6 a abgesetzt, 2 a ist grobflockig, 1 a dicht trüb.

Bei Zusatz der Versuchsflüssigkeit tritt in 5 und 6 nach 5 Min., in 4 nach $\frac{1}{4}$ Std., in 3 und 2 nach $\frac{1}{2}$ Std. schwache Trübung auf, die nach 2 Std. weder stärker geworden ist, noch Flockenbildung zeigt. Probe 1 bleibt überhaupt unverändert.

Versuch XLV.

6 frische, üppige Typhusagarkulturen werden in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und $\frac{1}{4}$ Std. lang im siedenden Wasserbade gehalten. Hierauf wird centrifugiert und vom Bodensatz so gut als möglich

abgegossen. Derselbe wird in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und ebenso wie 2 ccm reiner Kochsalzlösung mit 0,075 ccm Serum d II versetzt. Schon nach 10 Min. ist die obenstehende Flüssigkeit bei 37° ziemlich geklärt und der aus groben Flocken bestehende Bodensatz zeigt mikroskopisch typisch agglutinierte Bakterienhaufen, die sich nach Zerschütteln immer wieder neu bilden.

Die Proben bleiben 10 Std. bei Zimmertemperatur und dann über Nacht auf Eis stehen. Dann wird centrifugiert und die obenstehende Flüssigkeit in 3 ccm frisches Typhusbouillonfiltrat eingetragen, ebenso die Kontrolle.

Wie immer bei stark verdünntem Serum dauert es einige Zeit, ehe Trübung sichtbar wird. Doch ist nach 10 Min. die Kontrolle deutlich, nach 1 Std. bei 37° dicht trüb, beginnt nach 2½ Std. Flocken zu bilden und ist nach 4 Std. grolsenteils, nach 8 Std. ganz abgesetzt. Die Versuchsprobe hat während der ganzen Zeit nicht die geringste Veränderung erlitten!).

Durch solche Versuche wird die Proteinnatur der aus Typhuskulturfiltraten ausgefällten Stoffe überaus wahrscheinlich und es läge kein Anstand vor, sie mit Sicherheit zu behaupten, wenn der bereits gewürdigte Widerspruch in den Angaben über die Hitzebeständigkeit nicht vorhanden wäre oder befriedigend aufgeklärt werden könnte. Vermutlich ist die geringe Fällungskraft der von den erwähnten Autoren benutzten Immunsera dabei irgendwie beteiligt.

Was dann noch weiter gefolgert werden müfste, wäre, dafs bei der eigentlichen Agglutination die Bakterienproteine nur passiv und sekundär eine Rolle spielen. Denn sonst müfste die Erschöpfung der Immunsera durch Typhusfiltrate, also durch Proteine, einen Einfluss auf die Agglutination haben, was nicht der Fall ist.

Da man aber mit keimfrei gemachten Bouillonkulturen agglutinierende Sera erzeugen kann, so mufs in solchen Kulturfiltraten neben den Proteinen noch der wirksame Bestandteil vorhanden sein. Da ferner auch mit bei 100° sterilisierten Bouillonkulturen Agglutinine erzeugt werden können, so mufs die wirksame Substanz, bis zu einem gewissen Grade wenigstens, hitzebeständig sein.

Durch fraktionierte Fällungen und Immunisation mittels der partiell ausgefällten Substanzen wird sich möglicherweise noch

!) Die Versuche wurden in der Julisitzung des Vereines »Lotos« vortragen.

ein genauerer Einblick in das Wesen der Agglutination erhalten lassen. Derartige Versuche beanspruchen aber lange Zeit, da sie nur dann beweisend sind, wenn sie gleichzeitig an vielen Tieren angestellt werden. Merkwürdigerweise vertragen aber Kaninchen derartige Behandlungen ziemlich schlecht, weswegen noch nichts über diese Versuche berichtet werden kann. Nur die in der zweiten Mitteilung über die vorliegenden Versuche ausgesprochene Hoffnung, daß die Behandlung von Kaninchen mit den Niederschlägen von Bouillonfiltraten durch Typhuserum wirksame Sera liefern könne, darf nach eingehenderen Versuchen schon jetzt als trügerisch bezeichnet werden.

Die Entstehung starker Fällungen in den Exsudaten typhusinfizierter Meerschweinchen klärt nun auch die Bildung der eingangs erwähnten oberflächlichen Haufen in Präparaten solcher Exsudate mit starkem Immunserum wenigstens teilweise auf. Denn daß derartige Niederschläge in einem so bakterienreichen Medium eine mehr minder große Zahl von Bakterien einschließen können, ist sehr wahrscheinlich. Damit stimmt nicht nur die langgestreckte Form dieser Haufen gut überein, sondern auch die Thatsache, daß sie um so weniger zu bemerken sind, je mehr das Exsudat von vornherein verdünnt wurde, und daß sie bei gut ausgewaschenen, isolierten Exsudatbakterien nicht auftreten. Leider gab die direkte mikroskopische Beobachtung hierüber nicht die wünschenswerte Klarheit. In einigen Fällen liefs sich sicher eine sehr feinkörnige Masse als schmaler Rand an einzelnen Stellen dieser Haufen wahrnehmen, in anderen aber wurde etwas Ähnliches nur sehr unsicher oder gar nicht bemerkt. Die Färbung, die, wie Nicolle und Kraus gezeigt haben, für Immunserumniederschläge sehr wohl anwendbar ist, gab hier wegen der Mitfärbung des Grundes keine sicheren Aufschlüsse.

C. Versuche über die Konstitution der Agglutinine.

Die Thatsache der schweren Agglutinierbarkeit der Typhusbakterien im Meerschweinchenexsudate hat durch die bisher mitgeteilten Versuche eine befriedigende Erklärung nicht gefunden. Namentlich der Versuch einer Immunisation von

Kaninchen mit solchen Bakterien hatte die erhofften Aufschlüsse nicht gebracht. Die Versuche, dieselben auch in anderer Hinsicht als etwas von gewöhnlichen Kulturbakterien Verschiedenes zu erweisen, hatten, soweit sie nicht an technischen Schwierigkeiten überhaupt gescheitert waren, schliesslich ein völlig negatives Resultat ergeben. Dazu kam noch, dass auch der Versuch, eine irgendwie andersartige Schutzwirkung des durch Immunisation mit tierischen Exsudatbakterien gewonnenen Serums nachzuweisen, misslang.

Es blieb somit nichts wie das eigenartige Verhalten gegen die Serumagglutinine übrig. Aber gerade dieses schien in befriedigender Weise die Thatsache der fehlenden Haufenbildung im aktiv oder passiv immunisierten Tiere erklären zu können. Es schien nur wünschenswert, das für Typhus Gefundene nun auch für andere Mikroorganismen zu bestätigen, in allererster Reihe für den Cholera vibrio, von dem ja die Agglutinationsuntersuchungen s. Z. ihren Ausgangspunkt genommen hatten.

Diese Bestätigung jedoch blieb aus: die Cholera vibrionen im Exsudate inficierter Meerschweinchen wurden gerade so gut von gewöhnlichem Choleraserum agglutiniert, wie wenn sie in Bouillon oder auf sonst einem künstlichen Nährboden gewachsen gewesen wären. Dies wurde zuerst bei einem sehr wenig virulenten Cholera stamme der Institutssammlung festgestellt, dann aber auch für die hochvirulente Königsberger Cholera, die Herr Professor Pfeiffer in dankenswertester Weise zur Verfügung gestellt hatte.

Versuch XLVI.

Meerschweinchen III, mit 2 Ösen Choleraagarkultur inficirt, stirbt nach ca. 15 Std. Liefert ein sehr vibrionen- und auch leukocytenreiches Exsudat, welches wegen seiner geringen Menge mit 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung ausgespült wird. Das Spülwasser wird mit den Verdünnungen 1:10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1000, 2500 und 5000 eines auf gewöhnliche Weise gewonnenen Cholera-Immunsersums zu hängenden Tropfen verarbeitet. Kontrolle mit Bouillonkultur.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. ist überall Agglutination eingetreten; es besteht kein bemerkenswerter Unterschied zwischen Exsudat und Bouillon.

Nach 1 Std. ebenso; eher sind die Häufchen im Exsudate schöner und grösser als in der Bouillon. Mehrfach undeutliches Pfeiffersches Phänomen.

Versuch XLVII.

Mit physiologischer Na Cl-Lösung aus der Bauchhöhle des mit $\frac{1}{4}$ Agarkultur Cholera Pfeiffer infizierten Meerschweinchens V ausgespülte, in der üblichen Weise gewaschene und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Vibrionen mit den Serumverdünnungen 1 : 100, 250, 500, 1000, 5000, 10 000 und 15 000 zu hängenden Tropfen verarbeitet. Kontrolle mit Bouillonvibrionen, die in gleicher Weise behandelt wurden.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. sind in allen Präparaten mit Exsudatvibrionen bis 1 : 1000 Serumverdünnung schöne große Haufen ausgebildet, von da an sind die Häufchen kleiner und reicher als vollständige Agglutination bis 1 : 10 000. Im Gegensatz dazu sind die Bouillonvibrionen bis 1 : 15 000 agglutiniert, wo im Exsudate die Serumwirkung schon aufhört, die Häufchen sind aber durchgehend nur sehr klein. Nach 1 und 2 Std. ungefähr das gleiche Bild.

Versuch XLVIII.

Die Aufschwemmung der gleichen Vibrionen wie im vorigen Versuche wird zu je 1 ccm in Röhrchen gefüllt und mit der gleichen Menge der Serumverdünnungen 1 : 10, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 und 15 000 versetzt. 37°.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. sind in den Exsudatvibrionen mit Serum 1 : 10 und 100 gröbere Flocken sichtbar. Alle anderen Proben gleichmäßig trüb.

Nach 2 Std. haben die Serumverdünnungen bis 1 : 1000 sowohl in den Exsudat- wie in den Bouillonvibrionen-Suspensionen agglutiniert. Die Verdünnungen 1 : 5000 und 10 000 haben kleinste Flöckchen, aber ohne Klärung der Flüssigkeit erzeugt.

Nach 12 stünd. weiterer Aufbewahrung bei Zimmertemperatur sind alle Proben bis 1 : 5000 ausnahmslos agglutiniert; darüber hinaus hat das Serum in gleicher Weise für Exsudat- wie für Bouillonvibrionen versagt.

Danach erschien es nutzlos, weitere Versuche mit Cholera anzustellen, da von einer Allgemeingültigkeit der für Typhus aufgefundenen, schweren Agglutinierbarkeit durch Immuserum offenbar keine Rede war. Die Verhältnisse, welche im Tierkörper das Versagen der Typhusimmuserumwirkung veranlaßten, waren bei Cholera einfach nicht ausgebildet. Es schien zweckmäßiger zu sein, erst diesen Verhältnissen nachzuspüren.

Einen Fingerzeig hierfür boten Beobachtungen der Exsudatbildung bei Typhus, wonach während der Infektion Agglutinine nachweisbar sind. Eine Wiederholung der Versuche an den Meerschweinchchen 75 und 76 ergab das gleiche Resultat. Es zeigten sich in den ersten Stunden nach der Typhusinfektion Agglutinationssymptome, indem ein Teil der aus der Peritonealhöhle entnommenen Bakterien zu ganz typischen Häufchen zusammentrat. Diese partielle Haufenbildung hörte nach einiger

Zeit auf und ungefähr gleichzeitig damit waren auch die jetzt kapillar entnommenen Bakterien inagglutinabel geworden, während sie vorher auf Serumzusatz reagiert hatten.

Dieses Verhalten führte auf die Vermutung, es könnte infolge des Aufenthaltes der Bakterien in einem Medium, dem in geringer Menge, aber fortwährend Agglutinine hinzugefügt werden, eine Gewöhnung an dieselben eingetreten sein, eine Art Immunisation der Typhusbakterien gegen Agglutinine. Analoga dafür würden die Gewöhnung von Bakterien an Alexine nach Trommsdorff sowie die Versuche Danysz' geliefert haben, nach denen eine Gewöhnung und damit eine Widerstandsfähigkeit von Milzbrandbacillen gegen die baktericiden Wirkungen des Rattenserums relativ leicht zu erzielen ist.

Normale Meerschweinchenexsudate bringen keine Agglutinationsresistenz hervor, wenn man Typhusbakterien in ihnen wachsen läßt.

Versuch XLIX.

Meerschweinchen 78 wird 24 Std. nach einer intraperitonealen Injektion von 5 ccm steriler Bouillon, der etwas Aleuronatbrei zugesetzt ist, durch Verbluten getötet. Die Bauchhöhle wird mit physiologischer NaCl-Lösung ausgespült, so daß sich 10 ccm einer dicht trüben Flüssigkeit gewinnen lassen. Die Trübung besteht aus massenhaft vorhandenen, zum größten Teil polynucleären, lebenden Leukocyten. Das leicht gerinnende Exsudat wird zerschüttelt, die eine Hälfte desselben wird centrifugiert, die klare Flüssigkeit wird abgegossen, der Zellsatz in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Alle drei so erhaltenen Flüssigkeiten: zellhaltiges Exsudat, zellfreies und Zellsuspension werden $\frac{1}{2}$ Std. auf 60° erhitzt und dann nach Absetzen der Zellen auf der Centrifuge, aber ohne Abgießen der Flüssigkeit, mit Typhus geimpft. Am nächsten Tage sind die Röhrchen trübe, die gewachsenen Bakterien werden aber durch Serum g ebenso wie Bouillontyphus schon nach $\frac{1}{4}$ Std. agglutiniert.

Vom selben Meerschweinchen wurden durch nochmaliges Ausspülen der Bauchhöhle ca. 10 ccm trüber leukocytenreicher Flüssigkeit gewonnen, aus der die Zellen durch Centrifugieren isoliert wurden. Der Satz wurde mit $\frac{1}{2}$ ccm Serum g übergossen, ebenso eine gleiche Menge von Serum als Kontrolle aufgestellt und beide Proben 3 Std. bei 37° in mit Kautschuk-kappen versehenen Eprouvetten aufbewahrt. Hierauf wurde mit 4,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, centrifugiert und nunmehr Verdünnungen von der klaren Flüssigkeit, welche Serum 1 : 10, 100, 250, 500, 750, 1000 enthielt, mit Typhus aus dem Exsudate des Meerschweinchens 79

zu hängenden Tropfen verarbeitet. Die Leukocyten waren durch die Serumbehandlung alle tot, teilweise blasig degeneriert.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. nur bei der Verdünnung 1:10 unvollständige Agglutination. Nach 1 Std. vollständige Agglutination bei Serumverdünnung 1:10, sehr unvollständige bei 100, alle anderen Proben unbeeinflusst. Ein Unterschied in der Wirkung beider Sera besteht nicht.

Es kann somit durch Zusatz normaler Leukocyten zum Serum unter Bedingungen, welche eine, wenigstens teilweise Lösung derselben herbeiführen¹⁾, eine Erhöhung der agglutinierenden Serumwirkung gegen Exsudatbakterien nicht erreicht werden.

Wurden Typhusbakterien in den Exsudaten typhusinficierter Meerschweinchen gezüchtet, so waren die Resultate schwankend; es gelang aber in einigen Fällen mit Sicherheit, in derartigen Flüssigkeiten Kulturen heranzuzüchten, die eine gewisse Resistenz gegen Serumagglutinine aufwiesen.

Versuch L.

Die Bauchhöhle des der Infektion mit $\frac{1}{4}$ Typusagarkultur in weniger als 15 Std. erlegenen Meerschweinchens 80 wird nach und nach mit 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, worauf sich über 30 ccm einer trüben, sehr bakterienreichen, aber zellarmen Flüssigkeit erhalten lassen. Die Hälfte derselben wird durch Berkefeldt filtriert. Im ganzen werden vier verschieden behandelte Medien hergestellt und gleichzeitig mit Bouillon als Kontrolle mit Typhus geimpft:

1. Exsudat 1 Std. auf 60° erhitzt, dann centrifugiert und abgegossen. Gibt eine trotz sorgfältigen Ausschleuderns opalisierende Flüssigkeit.
2. Exsudat centrifugiert, dann 1 Std. auf 60° erhitzt. Klare, gelbliche Flüssigkeit.
3. Exsudat durch Berkefeldt filtriert. Klare, schwach gelbliche Flüssigkeit.
4. Exsudat durch Berkefeldt filtriert, dann 1 Std. auf 60° erhitzt.
5. Bouillon.

Nach 24 stünd. Wachstum bei 37° sind alle Proben trüb und zeigen im hängenden Tropfen mit Serum g in den Verdünnungen 1:100, 500, 1000 nach 1 Std.:

Kultur in 1. bei 1:100 viele typische Haufen, daneben bewegliche Bakterien, bei 1:500 Präparat wimmelnd von beweglichen Bakterien, daneben wenige aber typische Haufen,

bei 1:1000 fast alle Bakterien frei, wenige Haufen;

Kultur in 2 1:100 und 500 vollständige, 1:1000 ziemlich vollständige Agglutination;

1) Buchner, Archiv f. Hygiene. Van der Velde, Centralblatt f. Bakteriologie. Laschtschenko, Archiv f. Hygiene.

Kultur in 3. 1:100 sehr zahlreiche freie, z. T. bewegliche Bakterien neben Haufen,

1:500 wenige typische Haufen, etwas mehr lockere Aueinanderlagerungen, die Mehrzahl der Bakterien wimmelnd;

1:1000 wimmelnd, auch in den sehr spärlichen Haufen lebhaft Bewegung;

Kultur in 4. vollständige Agglutination bei 1:100 und 500; fast vollständige bei 1:1000;

Kultur in 5 überall Agglutination.

Der Befund spricht ganz deutlich dafür, daß unter Umständen der die Agglutinationsresistenz bedingende Faktor im Exsudate typhusinfizierter Meerschweinchen auch nach deren Tode außerhalb des Tierkörpers zur Wirkung kommen kann. Doch lassen sich sichere Schlüsse daraus nicht ziehen, weil der in Versuch L verzeichnete Erfolg nur in einem Bruchteile der Fälle eintrat; ebenso kam es nur selten vor, daß im Exsudat bereits gestorbener Meerschweinchen eine Spur agglutinativer Wirkung auf gewöhnlichem Kulturtyphus sich zeigte.

Viel bessere Resultate, die schließlich zur Aufklärung des eigenartigen Phänomens der Agglutinationsresistenz führten, ergab die Züchtung von Typhus in agglutininhaltiger Bouillon. Die Herstellung derselben geschah in der Weise, daß kleine Quantitäten von Immunsorum zu je 5 ccm Bouillon zugesetzt wurden, worauf das Gemisch 1 Stunde auf 60° erwärmt wurde. Letzteres geschah einerseits, um etwaige baktericide und lytische Wirkungen zu beseitigen und andererseits, um vor Verunreinigungen geschützt zu sein.

Es gelang für Typhus sehr leicht, für Cholera nur sehr schwer¹⁾, eine »Gewöhnung« an die Agglutinine herbeizuführen, in der Art, daß Wachstum nicht mehr ausschließlich in wand- und bodenständigen Flocken, sondern nebenher auch trübend erfolgte. Schon eine Züchtung durch wenige Generationen führte dieses Resultat herbei.

Versuch LI

(abgekürzt wiedergegeben; es waren stets eine Anzahl Bouillonon mit verschiedenem Gehalt an agglutinierendem Serum hergestellt worden, die dann weiter verimpft wurden. Nur das Wachstum einer solchen Serie wird hier mitgeteilt.)

1) Siehe Citat auf S. 313.

1. Tag. Bouillon mit 0,002 ccm Serum g (I) und serumfreie Bouillon (II) mit Typhus geimpft. 37°.

2. Tag. II Typisches trübes Wachstum. I Wenig trüb mit kleinflockigem Bodensatz. Geimpft Bouillon mit 0,002 ccm Serum aus I, (Ia) und II, (Ib), Bouillon aus II, (IIa).

3. Tag. Wie früher. Geimpft Bouillon mit 0,002 ccm Serum Ib aus Ia und Bouillon IIb aus IIa.

4. Tag. Ib trüb, ohne wesentlichen Unterschied gegen IIb.

Geimpft Bouillon mit 0,01 ccm Serum aus Ib (Ic) und IIb (Id). Bouillon mit IIb (IIc).

5. Tag. Ic ist leicht trüb mit Wand- und Bodenfloeken. Id ist fast klar, mit flockigem Satze.

Geimpft Bouillon mit 0,02 ccm Serum aus Ic (Ie) und IIc (If), Bouillon mit IIe (IId).

6. Tag. Ie ist leicht aber deutlich trüb, ziemlich starker, aus kleinen Floeken bestehender Satz. If ist klar mit starkem, festflockigem Satze.

Geimpft Bouillon mit 0,02 ccm Serum aus Ie (Ig) und IId (Ih). Bouillon mit IId (IIe).

7. Tag. Ig leicht trüb, mit leicht zerfallenden Wandfloeken und festflockigem Satze, Ih ist fast klar mit flockigem Satze.

Es hat wenig Zweck, weitere Versuche anzuführen, deren Resultat, die »Gewöhnung«, ein deutliches, aber im ganzen, auch nach langer Züchtung in agglutininhaltigen Medien, ein ziemlich mäfsiges war. Der eigentliche Wert dieser Versuche liegt auch gar nicht in der mehr oder minder deutlichen Trübung, welche die Bouillon trotz noch vorhandener agglutinierender Wirkung aufweist, sondern in folgendem Verhalten: entfernt man auf geeignete Weise die gebildeten, agglutinierten Floeken und untersucht die frei gebliebenen Typhusbakterien, so findet man diese resistent gegen die Agglutinine.

Für derartige Untersuchungen ist die Anwendung der makroskopischen Beobachtungsmethode unerläßlich. Die Entfernung der Floeken ist durch Filtration mittels guten Filterpapiers ziemlich leicht, aber kleine Häufchen gehen doch durch und stören die Beobachtung im hängenden Tropfen ungemein. Ferner sind die filtrierte Flüssigkeiten in der Regel recht bakterienarm geworden, so daß es notwendig wird, die geringe Zahl der vorhandenen Mikroorganismen durch Ausschleudern in einer kleinen Flüssigkeitsmenge zu konzentrieren. Auch damit sind Aneinanderlagerungen verbunden, die zwar bei gehöriger Vorsicht das Unter-

suchungsergebnis nicht zweifelhaft machen können, wie es die Versuche mit dem Waschen der Exsudatbakterien beweisen, immerhin aber zeitraubende Herstellungen und Beobachtungen von Kontrollpräparaten bedingen. Bei der makroskopischen Besichtigung sind solche unvermeidliche, kleine Aneinanderlagerungen von Bakterien einfluß- und bedeutungslos. Die unbezweifelte Überlegenheit der Feinheit der Beobachtung im hängenden Tropfen spielte bei Versuchen, in denen, wie sofort zu erwähnen sein wird, ausschließlich starke Sera zur Anwendung kamen, keine Rolle mehr.

Versuch LII.

(Versuchsergebnis nur für die Kulturen angegeben, deren Herstellung und Wachstum im vorigen Versuche beschrieben wurde.) Die Kulturen Ib und II b werden filtriert, die Filtrate centrifugiert. Vom Bodensatz wird so vollständig wie möglich abgossen und derselbe in wenig physiologischer NaCl-Lösung verteilt. Je 10 Tropfen der betreffenden Aufschwemmungen werden mit ebensoviel Serum 1:100, 500, 1000 versetzt. 37°.

Schon nach $\frac{1}{4}$ Std. sind die Bakterien von II b in Serum 1:100 und 500 grobflockig geworden, nach $\frac{1}{2}$ Std. sind alle Proben von II b vollständig agglutiniert und abgesetzt. Die Röhren mit den Bakterien von Ib sind gleichmäßig trüb bis 3 Std. nach dem Einsetzen in den Brutschrank. Dann beginnt Agglutination, die nach 7 Std. beendet ist.

Versuch LIII.

In gleicher Weise wie der vorige mit den Proben Ig, Ih und IIe angestellt. Serumverdünnungen 1:100, 500 und 750. 37°.

Die Bakterien aus IIe sind schon nach $\frac{1}{4}$ Std. in vollster Flockenbildung und nach 1 Std. gänzlich abgesetzt, die aus Ig und Ih fangen bei Serum 1:100 erst nach 2 Std. an, sich zusammenzuballen und bleiben sonst trübend.

Die von Ig und Ih abgossene agglutininhaltige Bouillon agglutiniert frische Bouillonkulturen im hängenden Tropfen binnen $\frac{1}{4}$ Std. vollständig.

Das Ergebnis dieser Versuche ist von außerordentlicher Wichtigkeit: es zeigt, daß der Faktor, welcher die Agglutinationsresistenz bedingt, auch außerhalb des Tierkörpers, im agglutinierenden Immunserum vorhanden ist und hier unter Umständen in Wirksamkeit treten kann.

Daß es sich dabei lediglich um eine »Gewöhnung« der Bakterien an die Serumagglutinine handeln könne, wird durch den als LIII angeführten Versuch im höchsten Grade unwahrscheinlich; denn die Unwirksamkeit des Serums tritt bei den

Typhusbakterien, die vorher mehrere Generationen in agglutininhaltiger Bouillon erzeugt hatten, gerade so gut hervor wie bei denen, welche ebenso lange vorher in gewöhnlicher Bouillon gelebt hatten. Der Aufenthalt in einem auf 60° erhitzten, verdünnten Immunserum scheint nach Maßgabe der Versuche LII und LIII das Wesentliche zu sein. Da aber in den Bouillon, welche zur Erzeugung der für diese Versuche benutzten Bakterien gedient hatten. Haufenbildung eingetreten war, und da noch, wie die Wirksamkeit derselben nach Entfernung der Bakterien beweist, aktive Agglutinine vorhanden waren, so muß der fragliche, die Agglutinationsresistenz bedingende Faktor neben den Agglutininen selbst im erhitzten Serum vorhanden gewesen sein. Die Verhältnisse würden demnach so liegen, daß ein auf 60° erwärmtes Serum wirksame Agglutinine enthält, welche Haufenbildung veranlassen und daneben einen Faktor, welcher Agglutinationsresistenz verleiht, so daß in einer für Typhusbakterien noch wirksamen Serumverdünnung eine Anzahl solcher vorhanden sind, welche weder durch diese Verdünnung noch durch ein anderes Immunserum agglutiniert werden können.

Versuch LIV.

1 ccm Serumverdünnung g wird 1 Std. auf 60° erhitzt, hierauf mit 5 ccm einer Aufschwemmung von einmal gewaschenen Typhusbakterien (aus Agarkultur) versetzt und 3 Std. bei 37° belassen. Nach dieser Zeit haben sich reichlich Flocken abgesetzt, aber die überstehende Flüssigkeit ist noch trüb. Sie wird vorsichtig durch ein steriles Papierfilter abgossen, und das Filtrat, wie ein nicht mit Serum versetzt gewesener, in gleicher Weise behandelt und entsprechend verdünnter Teil der Aufschwemmung centrifugiert. Die Bodensätze werden in wenig physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und je 10 Tropfen der Suspensionen mit ebensoviel Serumverdünnungen g 1:500 und 750 versetzt.

In den Kontrollproben ist nach 1/2 Std. bei 37° alles dicht von groben Flocken erfüllt, nach 1 Std. sind die Flüssigkeiten unter Absetzen geklärt; die Versuchsproben sind bei 2stünd. Aufenthalt in 37° und weiteren 16 Std. bei niedriger Zimmertemperatur gleichmäßig trüb.

Versuch LV.

Zum Versuche dient ein sehr wenig wirksames Kaninchenserum n, welches nur bis 1:200 sicher agglutiniert. Je 1 ccm der Verdünnung 1:10 wird 1. als solches, 2. nach 1stünd. Erhitzung auf 60°, 3. nach ebensolanger Erwärmung auf 75° mit 1 ccm Aufschwemmungen von Typhusagarkulturen versetzt. Nach 2stünd. Aufenthalt bei 37° ist in 1. Agglutination in groben

Flocken vorhanden, bei ziemlicher Klärung, in 2. sind Flocken in gleichmäßiger trüber Flüssigkeit eben sichtbar, 3. ist trüb. Es werden neuerdings je 0,5 ccm Aufschwemmung zugesetzt. Nach $\frac{1}{2}$ Std. ist 1. wie vorher unter Flockenbildung etwas geklärt, 2. ist dicht trüb, doch erkennt man eben noch Flocken, 3. ist gleichmäßig trüb. Neuerlicher Zusatz von 1 ccm Aufschwemmung, worauf alle Proben trüb bleiben. Die Flüssigkeiten werden durch Papier filtriert, dabei zeigt sich, daß das Filtrat von 1. nur wenig, von 2. viel stärker, von 3. stark trüb ist. Die Proben werden centrifugiert, die Sätze in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und sodann je 5 Tropfen der Aufschwemmungen in engen Röhrchen versetzt mit:

1.	5 Tropfen Bakterien aus 1.	mit 5 Tropfen Serum n 1:	50
2.	5	»	» 1. » 5 » » » 1:100
3.	5	»	» 2. » 5 » » » 1:50
4.	5	»	» 2. » 5 » » » 1:100
5.	5	»	» 3. » 5 » » » 1:50
6.	5	»	» 3. » 5 » » » 1:100
7.	5	Bakteriensuspension ohne Serum mit	
		5 Tropfen Serum n	1:50
8.	5	Bakteriensuspension ohne Serum mit	
		5 Tropfen Serum n	1:100.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. bei 37° ist die Agglutination in 7. und 8. weit vorge-schritten, nach $\frac{3}{4}$ Std. beendet. Erst nach $1\frac{1}{2}$ Std. beginnt Flockenbildung in 1., 3. und 5., nach 2 Std. sind hier Flocken sichtbar, die sich absetzen, aber die Flüssigkeit bleibt auch nach 3 Std. noch trüb. In den übrigen Proben trat keine Veränderung ein.

Versuch LVI.

Typhusimmunserum von einem Hunde, bis 1:250 agglutinierend, wird in drei Eprouvetten zu je 1 ccm 1. als solches, 2. nach 1stünd. Erhitzung auf 60° , 3. nach 1stünd. Erhitzung auf 75° mit lebenden, gewaschenen Typhusbakterien von Agarkulturen versetzt. Der erste Zusatz von 1 ccm Aufschwemmung ist bei 37° in 1. binnen $\frac{1}{2}$ Std. so vollständig agglutiniert, daß die obenstehende Flüssigkeit klar erscheint, in 2. flockig abgesetzt, aber bei Freibleiben der oberen Schichten; 3. bleibt trüb. Nun wurde stets zu allen drei Proben gleichviel Bakteriensuspension zugesetzt, bis auch in 1. die Flüssigkeit leicht diffus trüb blieb. Es wiederholte sich immer der Befund, daß das auf 60° erhitzte Serum nur Flocken erzeugen, die Flüssigkeit aber nicht klären konnte.

Nachdem im ganzen 1,95 ccm Bakterienaufschwemmung zugesetzt worden waren, wurden die Proben durch Papier filtriert, wobei 1. relativ wenig, 2. stärker, 3. dicht trüb durchs Filter ging. Hierauf wurde centrifugiert und die Sätze in wenig physiologischer NaCl-Lösung suspendiert. Darnach wurden in engen Eprouvetten gemischt:

1.	5 Tropfen d. Bakteriensusp.	aus unerhitzt. Serum + 5 Tropfen Serum 1:	10
2.	5	»	» + 5 » » 1:100
3.	5	»	» 1 ^h 60° erhitzt. » + 5 » » 1:10
4.	5	»	» » » » + 5 » » 1:100

5.	5 Tropfen d. Bakteriensusp. aus 1h 75° erhitzt. Ser. + 5 Tropfen Serum	1: 10
6.	5 „ „ „ „ „ „ „ „ + 5 „ „	1: 100
7.	5 „ Suspension normaler Typhusbakterien + 5 „ „	1: 10
8.	5 „ „ „ „ „ „ „ „ + 5 „ „	1: 100

Nach 1/2 Std. war 7. abgesetzt und geklärt, 8. mit groben Flocken dicht erfüllt.

Nach 3/4 Std. war die Agglutination der Kontrollproben beendet.

Nach 1 Std. war in Nr. 5 eine Spur Haufenbildung wahrzunehmen, nach 5/4 Std. bestand deutliche Haufenbildung in 1., 3. und 5., die nach 7/4 Std. zur Klärung führte.

2., 4., 6. waren nach 2 Std. unverändert. Erst nach 4 Std. war Flockenbildung in 2. und 4. zu bemerken, wobei aber die Flüssigkeit trüb blieb.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht ganz übereinstimmend hervor, daß ein genügend langer Aufenthalt von Bakterien in einem Immunserum, vorausgesetzt, daß sie nicht selbst agglutiniert werden, Agglutinationsresistenz erzeugt. Solche inagglutinable Bakterien kann man erhalten, entweder indem man z. B. Typhusagarkultur in sehr geringem Überschuß über die Agglutinationskraft hinaus dem unveränderten Serum zusetzt, oder indem man sie in Serum suspendiert, dessen Agglutinine durch Erhitzen auf 60° etwas geschädigt oder durch Erwärmen auf 75° anscheinend vernichtet worden sind. Auf eine Schädigung der Agglutinine bei 60° muß man aus dem Umstande schließen, daß zur Sättigung eines derart behandelten Serums weit weniger Bakterienmaterial erforderlich ist als zu der eines unveränderten, wie dies namentlich aus Versuch LVI, entgegen den Angaben der Autoren, mit Sicherheit hervorgeht.

Schon zu Anfang der Versuche wurden auf diese Weise mitunter Bakterien so unempfindlich gemacht, daß sie so gut wie gar nicht mehr mit Immunserum reagierten.

Versuch LVII.

Je 1 ccm Serumverdünnung cII 1:250 wird 1. 1 Std. auf 60°, 2. 1 Std. auf 75° erwärmt. Danach werden je 1 ccm Suspension, entsprechend einer Typhusagarkultur zugesetzt und die Proben 6 Std. bei 37° belassen. Nach dieser Zeit war in dem auf 60° erhitzten Serum teilweise, in den anderen keine Agglutination eingetreten. Die Proben wurden filtriert, die Filtrate zentrifugiert, die Bodensätze gewaschen und schließlich in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Es wurden dann in engen Eprouvetten gemischt:

1.	5 Tr. Suspens. d. Bakt. aus d. auf 60° erwärmten Serum + 5 Tr. Ser. cII 1:250
2.	5 „ „ „ „ „ „ „ „ 60° „ „ + 5 „ „ „ 1:500

9.	5	Tropfen	Suspension	normaler	Bakterien	+	5	Tropfen	Serum	g	1:	10
10.	5	,	,	,	,	+	5	,	,	,	1:	100
11.	5	,	,	,	,	+	5	,	,	h	1:	10
12.	5	,	,	,	,	+	5	,	,	,	1:	100

Nach $\frac{1}{4}$ Std. (immer 37°) ist 9. und 11. beendet, in 10. und 12. weit vorgeschrittene Haufenbildung. Sonst 0.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. 9., 10., 11., 12. beendet, sonst 0.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. 9.—12. beendet, 3. deutlicher, 5. zweifelhafter Beginn der Agglutination, sonst 0.

Nach 1 Std. 1., 2. 0, 3. weit vorgeschrittene Haufenbildung, 4. undeutlicher Beginn derselben, 5. schwache Agglutination, 6., 7. 8. 0.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. 1., 2. 0, 3. fast beendete, 4. sehr deutliche Agglutination, 5. Flocken in trüber Flüssigkeit, 6. Spur von Flockenbildung?, 7., 8. 0.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. 1., 2., 0, 3., 4., 5. und in geringem Grade 6. Flockenbildung mit mehr oder weniger vollständigem Absetzen der Haufen, aber trüber, überstehender Flüssigkeit, 7. und 8. 0.

Nach 2 St. Unverändert.

Bei diesem Versuche ist besonders die Wirkung des Serums h zu beachten; genau so wie dieses, durch Immunisation von Kaninchen mit Exsudatbakterien gewonnene, die Typhusbakterien aus dem Tierkörper leichter zur Haufenbildung veranlassen konnte, so vermag es auch künstlich resistent gemachte Kulturbakterien besser zu agglutinieren wie ein gewöhnliches Immuns Serum. Das ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, daß die Agglutinationsresistenz nicht durch eine Vielheit von Ursachen bedingt wird, sondern durch eine einzige, die im Tierkörper in gleicher Weise wirksam ist wie in einem etwa auf 75° erhitzten Serum. Es bedarf nun einer genaueren Analyse, ob die bisherigen Erklärungsweisen des Agglutinationsphänomens irgendwie ein Verständnis dieser Erscheinungen ermöglichen. Die älteste, die Grubersche Anschauung nimmt bekanntlich ein Verquellen und Klebrigwerden der Bakterienhülle als Ursache der Haufenbildung an. Man könnte sich, abgesehen von den bereits erwähnten, gegen diese Auffassung geltend gemachten Bedenken, ganz gut vorstellen, daß sich einmal Typhusbakterien finden, welche eine nicht quellbare Membran besitzen und infolgedessen ungeeignet zur Aneinanderlagerung sind.

Es bestände demnach der Grund der Agglutinationsresistenz in einer Veränderung der Konstitution der Bakterienmembran, etwa im Sinne der Nicolleschen Anschauung, daß weniger

agglutinable Substanz innerhalb der äußeren Schichten der Bakterienzelle abgelagert wäre. Etwas Derartiges könnte in einer Änderung der Arteigenschaften seinen Grund haben: durch irgend welche Veranlassungen gezwungen, wandelt sich der bisher agglutininempfindliche Typhus in einen resistenten um. Im Sinne der bereits mitgeteilten Gewöhnungsversuche würde etwa bei der Störung der normalen Lebensvorgänge, wie eine solche die Agglutination doch sicher bedeutet, dasjenige Individuum, welches von vornherein etwas resistenter ist, sich besser in einer agglutininhaltigen Bouillon vermehren und hätte schliesslich Aussicht, durch eine Art natürlicher Zuchtwahl eine neue, agglutininunempfindliche Rasse zu bilden. Der unter der Zahl LI mitgeteilte Gewöhnungsversuch widerspricht einer solchen Annahme nicht. Vielleicht wäre es bei entsprechender genügend langer Züchtung wirklich gelungen, einen inagglutinablen Stamm aus den wenigen ursprünglich in die Bouillon eingepflichten Keimen zu erlangen. Die Thatsache, dass schliesslich bei relativ hohem Agglutiningehalt ein gewisses trübendes Wachstum konstatiert wurde, liefse sich als scheinbarer Beweis anführen; es wäre auch wirklich möglich, dass unter den durch das Papierfilter gegangenen Bakterien sich schon Angehörige der neu entstehenden inagglutinablen Rasse befunden hätten: die Mehrzahl war es aber sicher nicht; denn sonst hätte die unmittelbar aus einer längeren Zeit agglutininfrei gezüchteten Kultur in die gleich stark agglutinierende Bouillon vorgenommene Überimpfung nicht ebenfalls agglutinationsresistente Bakterien liefern dürfen.

Für die Verhältnisse im Tierkörper trifft diese Annahme erst recht nicht zu. Denn hier werden agglutinierbare Bakterien injiziert und ebensolche erhält man sofort wieder, wenn man etwas von dem gebildeten Exsudate in Bouillon oder auf Agar überträgt.

An eine plötzlich entstandene neue Rasse, eine Art Bakterienmutation, lässt sich natürlich aus dem gleichen Grunde nicht denken.

Es wäre weiterhin im Sinne der Gruberschen Anschauung noch möglich, daran zu denken, dass die quellbare

Membran, welche die Haufenbildung durch ihr Klebrigwerden veranlaßt, etwas für das Typhusbakterium ganz Nebensächliches sei, das zwar regelmäfsig ausgebildet wird, aber ohne wesentlichen Schaden für das Leben auch wegbleiben könnte, etwa so wie grofse Kapseln bei gewissen Bakterien nur auf bestimmten Substraten entstehen, bei Überimpfung auf andere Nährböden aber kleiner werden oder ganz wegbleiben können, ohne Wachstum und Fortpflanzung sichtbar zu beeinträchtigen. Soweit sich die Litteratur überblicken läfst, gibt es zwar kein Beispiel für einen Nährboden, auf dem der Typhus agglutinationsresistent wüchse, aber mehr minder naheliegende Analogien liefsen sich finden, etwa in dem verzögerten Auftreten der Fluorescenz beim Wachstum des *Pyocyanus* im Serum u. dergl. Dann wäre es leicht erklärlich, warum Rückversetzung in ein normales Nährsubstrat das Wiederauftreten der Agglutination zur Folge hat. Dem widerspricht aber wieder der Gewöhnungsversuch, welcher zeigt, dafs agglutinierbare und resistente Bakterien in der gleichen serunhaltigen Bouillon nebeneinander zur Entwicklung kommen.

Somit läfst die Grubersche Hypothese eine Deutung der berichteten Versuche nicht zu und das Gleiche gilt, meist aus denselben Gründen, für die Ansichten von Dineur und Nicolle.

Nicht minderen Schwierigkeiten begegnet man, wenn man die Thatsache der Agglutinationsresistenz der Paltauf-Krauschen Erklärungsweise anpassen will, immer abgesehen von den sonst gegen diese Hypothese sprechenden Erfahrungen.

Warum in einer agglutininhaltigen Flüssigkeit eine Anzahl Bakterien durch die gebildeten Niederschläge agglutiniert werden und andere nicht, obwohl von einer Erschöpfung keine Rede sein kann, ist ebensowenig einzusehen, wie die Erscheinung zu erklären ist, dafs bei der Niederschlagsbildung überhaupt Bakterien unbehelligt bleiben können. Nach der Paltauf-Krauschen Theorie in ihrer gegenwärtigen Form kann es agglutinationsresistente Bakterien überhaupt nicht geben, so lange noch wirksames Serum zugegen ist; die Änderung der Arteigenschaft oder der Wachstumsverhältnisse, die bei der Gruberschen

Lehre unter Umständen hätte erklärend wirken können, würde für die Zusammenballung durch Niederschläge völlig irrelevant sein. Deshalb kann man auch nicht annehmen, daß erst eine gewisse Stärke der Niederschlagsbildung gefordert werden müsse, ehe Agglutination eintritt, und daß diese Stärke für die Exsudatbakterien durch die Verdünnungen eines gewöhnlichen Immunsersums nicht zu erzielen sei. Auf den ersten Blick schiene dafür allerdings die Erscheinung zu sprechen, daß die oft erwähnten Sera d und h, welche auch Exsudatbakterien noch agglutinierten, gleichzeitig stärker fallende Eigenschaften besaßen. Warum sie aber dann ungefähr die gleiche agglutinierende Kraft für Typhusbouillon besaßen wie Sera, welche für Exsudatbakterien relativ unwirksam waren, bliebe unerklärt.

Was die Bordetsche Auffassung des Agglutinationsphänomens betrifft, so wurde bereits in der historischen Einleitung die Einteilung der Bakterien in zwei Phasen als ein sehr wesentlicher Fortschritt bezeichnet. Zu bedauern ist nur, daß die Bordetsche Theorie in sehr wesentlichen Punkten ganz unbestimmt sich äußert. Der erste Teil der Reaktion besitzt nach Bordet einen rein »biologischen« Charakter. Dafür spreche namentlich die spezifische Natur der Serumwirkung, die zunächst in dem Unbeweglichwerden der Mikroorganismen ihren Ausdruck fände. Ist dieser erste Teil vorüber, so verhalten sich die Bakterien wie beliebige sonstige, feinverteilte Partikelchen, welche auf Zusatz gewisser Stoffe infolge geänderter Molekularattraktion zu Haufen zusammenfließen.

Die Art und Weise, wie Bordet sich den Verlauf der ersten Phase, deren Sichtbarwerden durch die spezifische Beweglichkeitsstörung angedeutet ist, vorstellt, ist aus seinen Angaben nirgends zu ersehen; denn daß die Aufhebung der Motilität der Faktor sein sollte, der an sich schon das Eintreten einer die Molekularattraktion der Bakterien mit der umgebenden Flüssigkeit ändernden Einflusses ermöglicht, geht aus Bordets Angaben nicht hervor und wäre ja auch nicht wahrscheinlich, da sonst die nicht spezifische Agglutination durch chemische Stoffe viel weiter verbreitet sein müßte, als sie es ohnehin ist (Blachstein,

Malvoz u. a.) und fast von jedem Desinfektionsmittel bewirkt werden könnte.

Aus der ganzen Darstellungsweise Bordets scheint aber hervorzugehen, daß er sich seine erste Agglutinationsphase, die »période de l'impression«, ähnlich vorstellt wie die Sensibilisierung einer Bakterienzelle durch den spezifischen Bestandteil eines bakteriolytischen Serums, die sich Bordet als mehr physikalischen Vorgang deutet, während bekanntlich Ehrlich eine mehr chemische Bindung anzunehmen geneigt ist.

Ist diese Auffassung der Bordetschen Lehre richtig, so würde ein in der ersten Agglutinationsphase befindlicher Mikroorganismus sich, die Beweglichkeitsstörung etwa abgerechnet, ebenso verhalten wie ein spezifisch für die Wirkung der Alexine sensibilisierter, der seinerseits von einem normalen nicht zu unterscheiden ist, so lange er nicht mit frischem, normalem Serum in Berührung tritt. Man könnte in der That annehmen, daß ein Typhusbakterium in einem Meerschweinchenexsudate sich in dieser ersten Phase befände. Es sieht normal aus, vermag sich zu vermehren, und wenn Bordet eine Bewegungsstörung mit als charakteristisches Kennzeichen der Impressionszeit auffaßt, so hat man an den tierischen Exsudatbakterien wie an solchen, die im erhitzten Serum verweilt hatten, oft genug Gelegenheit, eine mehr oder weniger weitgehende Immobilisation oder Bewegungsbeeinträchtigung während einiger Zeit zu beobachten. Ein derartiger Mikroorganismus müßte nun auf Zusatz des entsprechenden Serums sofort agglutiniert werden. Denn ein solches Serum muß nach der ganzen Darlegung Bordets zwei Substanzen enthalten, deren eine die Impressionsperiode, deren zweite die Periode der gestörten Molekularattraktion hervorbringt. Leider sagt Bordet von dieser zweiten Phase auch nichts Näheres, namentlich ob er sich die dieselbe veranlassenden Einflüsse als spezifisch denkt oder nicht, wird nirgends erwähnt. Sein aus Duclaux' Theorien entlehntes Beispiel vermag da keinen Aufschluß zu geben. Besteht beispielsweise das Wesen der Labgerinnung der Milch wirklich, wie Duclaux annimmt, in einer Zusammenballung der nur scheinbar

gelösten, in Wirklichkeit nur sehr fein verteilten Kaseinteilchen, die auf Labzusatz durch Haufenbildung sichtbar werden, so fragt es sich, ob hier ein einheitlicher Vorgang vorliegt oder nicht ebenfalls eine Zweiteilung: ob nicht die Spezifität des Labenzym darin zu suchen ist, daß es feinverteiltes Kasein und nur dieses in eine »période de l'impression« versetzt, vermöge deren nun die Molekularattraktion zwischen Kasein und Milchflüssigkeit jetzt schon durch den geringsten Eingriff, z. B. schon durch das Lösungsmittel des Labpulvers, das mit zugesetzt wurde, geändert werden kann. In einem solchen Falle würde die Agglutination von Typhusbakterien und die Labgerinnung der Milch dem Wesen nach identisch sein.

Ist aber nach Duclaux' Theorie die Labwirkung ein einheitlicher Vorgang, der einfach in einer spezifischen Änderung der Molekularattraktion besteht, so ist nicht recht einzusehen, warum die erste Phase notwendig sein soll. Dann ist ebenfalls Agglutination und Labwirkung im Wesen gleichzusetzen.

Der Lähmung der Beweglichkeit kann ein weitgehender Einfluß nicht zukommen, da unbewegliche Bakterien durch zugehörige Sera oder infolge Erhitzung auf 60° oder durch Formalin u. dgl. unbeweglich gemachte Typhusbakterien durch Typhuserum nicht anders zu Haufen vereinigt werden wie lebende.

Ob man heute das Recht besitzt, mit den bisherigen Erfahrungen eine spezifisch erfolgende Änderung der Molekularattraktion anzunehmen, ist eine Frage, deren Erörterung nicht hierher gehört. Jedenfalls zeigt eine genauere Analyse der Ansichten Bordets, daß sie einfach eine absolute Identifizierung des Wesens der Agglutination und dem der Gerinnung im Sinne der Duclauxschen Theorie darstellt. Die Arbeit Bordets enthält aber noch ein überaus interessantes Experiment, dessen Gelingen Bordet als wesentliche Stütze seiner Ansichten heranziehen möchte. Wenn Tieren eine Zeitlang Milch injiziert wird, so liefern sie schließlich ein Serum, welches imstande ist, das Kasein der Milch auszufällen. Es ist kaum anzunehmen, daß dieser schöne Versuch überhaupt in den Kreis der eigentlichen Agglutinationsversuche hineingehört. Hier handelt es sich offen-

bar, wie bereits erwähnt, um denselben Vorgang, der das Auftreten von sichtbaren Niederschlägen bei Zusatz des Serums eines gegen Eiweiß immunisierten Tieres in Eiweißlösungen, oder eines gegen Menschenblut immunisierten in Menschenblut, oder eines mit Typhus immunisierten in Typhusbouillonfiltraten erzeugt. Wo dies aber möglich ist, läßt sich nachweisen, daß diese fällenden Eigenschaften ganz unabhängig sind von den agglutinierenden; das gilt für die Agglutination von Typhusbakterien gerade so gut wie für die von Coli oder Blutkörperchen.

Ist das Wesen des Agglutinationsvorganges wirklich auf eine Änderung der Attraktionsverhältnisse zwischen Bakterien untereinander und Bakterien und umgebenden Flüssigkeitsteilchen zu beziehen, so ergibt sich die Annahme einer ungeheuer wirksamen Substanz, für die eben nur die Immunitätslehre Analoga liefern kann. Wenn eine Thonemulsion in Wasser durch Kochsalzzusatz zur Klärung und Haufenbildung veranlaßt werden kann, so ist dies schließlicly nicht allzu auffallend. Wenn aber reine, gewaschene Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung durch eine mit derselben Lösung bereitete Serumverdünnung von 1:40000 oder 1:500000 (wie ein Grubersches Serum) noch eine so weitgehende Störung der molekularen Anziehungen herbeiführt, so kann man sich von der Wirksamkeit der veranlassenden Substanz kaum mehr einen Begriff machen. Auffallend ist aber auch noch eine andere Erscheinung: die Substanz, welche die Änderung der molekularen Attraktion herbeiführt, verschwindet, wird verbraucht; das thut das Kochsalz nicht, welches die Haufenbildung der Thonteilchen hervorbringt. Es müßte überhaupt noch näher untersucht werden, ob die anscheinende Analogie zwischen der Klärung der Thonemulsion und einer Bakterienaufschwemmung wirklich eine vollkommene ist.

Daß die Anwesenheit von Salz zur Ausbildung der Agglutinationsreaktion unbedingt notwendig ist, wie Bordet zuerst gesagt und später andere bestätigt haben, deutet nur darauf hin, daß die Agglutininwirkung eben gewisser unterstützender

Momente bedarf, genau so wie etwa die Alexine eben auch nur bei Anwesenheit von Salzen wirken können.

Trotz dieser mehr angedeuteten als ausgeführten Bedenken kommt der Betrachtungsweise Bordets eine sehr große Bedeutung zu. Denn nur die Annahme einer »Impressionsperiode«, welche der eigentlichen Agglutination vorausgeht, allerdings in der Regel nur um einen unmeßbar kleinen Zeitraum, kann die beobachtete Agglutinationsresistenz der Typhusbakterien befriedigend erklären.

Angenommen, dieselben befänden sich, so wie sie aus einem infizierten Meerschweinchen oder aus einem vorher auf 75° erhitzten Serum kommen, in dieser Periode, so würden sie mit Mikroorganismen, welche durch den spezifischen, hitzebeständigen Anteil eines bakteriolytischen Immunserrums »sensibilisiert« sind, weitgehende Ähnlichkeit darbieten. Sie sehen normal aus, sind vielleicht weniger beweglich wie sonst, können sich aber regelrecht teilen und vermehren. Eine tiefgreifende Störung haben sie jedenfalls nicht erfahren. Aber normal sind sie ebensowenig wie diejenigen, die in einem erhitzten spezifisch baktericiden Serum waren. Diese lösen sich bei Anwesenheit geringer freier Alexinmengen auf, jene widerstehen der Einwirkung der Agglutinine, welche auf normale Bakterien sofort wirken. Wie sich später zeigen wird, ist die Analogie allerdings nicht vollständig, da Alexine und Agglutinin, d. h. jenes Agglutinin, wie man sich es bisher als im Serum vorhanden vorstellte, nicht direkt vergleichbar sind. Aber auf den ersten Blick sieht es doch so aus, als ob die »Impressionsperiode« Bordets die Typhusbakterien nicht agglutinabel, sondern resistent gemacht hätte.

Verständlich wird das Wesen der Bordetschen »Impression« erst dann, wenn man darauf die Vorstellungsweise Ehrlichs anwendet, die bereits so viele Punkte der Immunitätslehre dem Verständnisse näher gebracht hat.

Ehrlich hat sich mit dem Phänomen der Agglutination im Vergleich zu seinen eingehenden Studien der Hämolyse nur wenig und mehr nebenbei befaßt. In der Zusammenfassung seiner

Lehre, die als bekannt vorausgesetzt werden muß, betrachtet er die Agglutinine als frei im Blute kreisende Receptoren zweiter Ordnung, bei denen haptophore und zymotoxische Gruppe untrennbar verbunden sind.

Nach dieser Anschauungsweise würde sich der Receptor mit der ersteren an die geeignete Gruppe des Typhusbakteriums anlagern. An sich bedeutet diese Anlagerung noch keine tiefergehende Schädigung der Bakterienzelle. Da aber gleichzeitig mit der haptophoren Gruppe die mit ihr unzertrennlich verbundene zymotoxische verkettet wird, so übt die letztere sofort ihre charakteristische Wirkung, deren Wesen Ehrlich unbestimmt läßt, das aber in der Haufenbildung seinen sichtbaren Ausdruck findet. Mit dieser Anschauung ist die Thatsache des Verschwindens der Agglutinine durch die Bindung derselben an die Bakterienzelle vollständig erklärt. Es ist aber danach ausgeschlossen, daß ein Mikroorganismus in einem Serum, welches die zugehörigen Agglutinine in genügender Menge enthält, inagglutinabel sein könnte. Für ein etwaiges Fehlen der Atomgruppierung im Bakterienleibe, welche zur haptophoren Gruppe paßt, liefert die bisherige Litteratur keine einwandfreien Beweise. Da aber ein solcher Mangel einzig und allein die Thatsache der Agglutinationsresistenz erklären könnte, so muß diese Möglichkeit berücksichtigt werden.

Gäbe es Typhusbakterien, denen infolge irgend welcher Umstände die zu den Agglutininen passende Gruppe fehlt, so dürften sie unter gar keinen Umständen agglutiniert werden. Die Exsudatbakterien reagieren aber auf konzentrierte Sera, und die in vitro resistent gemachten noch auf ganz andere Flüssigkeiten, wie später zu zeigen sein wird. Eine Annahme einer nur schwach ausgebildeten, passenden Gruppe im Bakterienkörper, die erst durch eine besonders starke haptophore besetzt werden kann, widerspricht natürlich vollständig dem Sinne der Ehrlichschen Theorie, die eine stärkere Serumwirkung einzig und allein durch eine vermehrte Anhäufung gleichkräftiger Einzelreceptoren erklären muß. Überdies wäre eine solche Ansicht auch mit dem Folgenden unvereinbar.

Es wäre aber wohl denkbar, daß die zum vollständigen Agglutinin verbundenen beiden Gruppen des Ehrlich'schen Receptors zweiter Ordnung doch insofern unabhängig voneinander sind, als sie sich gegen verschiedene Eingriffe ungleich widerstandsfähig zeigen, daß z. B. die Erhitzung auf 75° nur die zymotoxische, nicht aber die haptophore Gruppe vernichtet. Die letztere würde dann ihre spezifische Verwandtschaft und Anlagerungsfähigkeit zur entsprechenden Atomgruppierung in der Bakterienzelle beibehalten und diese besetzen. Ein derart besetzter Mikroorganismus könnte durch ein neu hinzutretendes vollständiges Agglutinin nicht mehr beeinflusst werden: denn die bindende Gruppe hat er zwar, aber sie ist von dem agglutinativen Resten des Receptors zweiter Ordnung so eingenommen, daß sich die haptophore Gruppe eines neuen, vollständigen Agglutinins nicht mehr anlagern und infolgedessen auch die zymotoxische nicht in Wirkung treten kann.

Wäre ein Typhusbakterium im Meerschweinchenexsudate oder im erhitzten Serum in dieser Weise besetzt worden, so könnte es tatsächlich resistent sein. Die Resistenz müßte bei einer Teilung und Vermehrung sofort schwinden; denn dann könnte natürlich von einer Besetzung der zum Agglutinin passenden neuen Gruppen nicht mehr die Rede sein. Aber eine derartige Bakterienzelle würde, so wie im vorher erörterten Falle, für immer inagglutinabel sein. Eine Ergänzung der einmal zerstörten zymophoren Gruppe könnte nicht stattfinden, weil die haptophore nicht die Konstruktion eines Amboceptors hat.

Da aber tatsächlich derartige Bakterien durch konzentrierte oder besonders wirkende Sera (s. Serum h in Versuch LIX) zur Haufenbildung gebracht werden können, so ist auch diese Annahme unhaltbar.

Läßt man aber die Anordnung der haptophoren und zymotoxischen Gruppe zum Ehrlich'schen Receptor zweiter Ordnung beiseite und schreibt den Agglutininen im wesentlichen dieselbe Struktur zu wie den Bakterio- und Hämolytinen, so lassen sich nicht nur alle beobachteten Erscheinungen befriedigend erklären

sondern die Versuche können auch in bestätigender Weise erweitert werden.

Als sicherste Anordnung für diese Versuche hat sich die folgende bewährt. Die Abspaltung und Isolierung der haptophoren Agglutiningruppe, des Agglutinophors, wie sie der Kürze halber bezeichnet werden möge, erfolgt teilweise aber unzulänglich durch 1stünd. Erhitzung auf 60°. Eine gänzliche Reindarstellung gelingt aber erst dann, wenn das Serum 1 Stunde lang bei 75° gehalten wird. Auf genaue Einhaltung der Temperatur muß gut geachtet werden, da bei nicht ganz sorgfältiger Durchführung dieser Manipulation mehrfach noch eine Spur von rückgebliebener Agglutinationswirkung beobachtet wurde.

Da reines Serum natürlich mehr oder minder vollständig gerinnen würde, kann man nur mit Verdünnungen arbeiten, welche aber nicht hoch getrieben werden dürfen. Eine Verdünnung 1:10 dürfte in den meisten Fällen entsprechen; sie ist nach dem Erhitzen opaleszierend in verschieden hohem Grade. Die Sera, die untersucht wurden, verhielten sich in dieser Hinsicht aus einem nicht näher zu ermittelnden Grunde keineswegs gleichartig. So liefs ein Typhus-Immuserum i bei 1stünd. Erhitzung der Verdünnung 1:10 bereits eine Menge Eiweifs geronnen ausfallen, während ein Choleraserum, 1:5 verdünnt, gerade nur opalescierte.

In dieses Serum wird nach erfolgter Abkühlung die Typhus-suspension eingetragen. Es empfiehlt sich durchaus, von dem erhitzten Serum, nicht wie in den bisherigen Versuchen eine geringe Quantität, sondern mindestens 5—10 ccm anzuwenden.

Was die Menge der anzuwendenden Bakterien anbetrifft, so ergibt nach dem bereits Erwähnten eine einfache Überlegung, daß theoretisch ebensoviel Bakterien vom Agglutinophor besetzt werden können, als vom nichterhitzten Serum agglutiniert werden. Thatsächlich könnte sogar dieses Quantum noch ohne Schaden um ein Geringes überschritten werden, da man, wie z. B. Versuch LVIII zeigt, einen nicht mehr agglutinablen Überschufs von Bakterien zusetzen kann, welcher sich weiterhin als resistent erweist; daraus folgt, daß auch im unveränderten, besonders im

länger aufbewahrten Serum eine gewisse Menge freier Agglutinophore vorhanden sein muß. Erhitztes Serum und Bakterien bleiben dann längere Zeit bei 37°. Viel besser aber ist es, die Besetzung durch Agglutinophore bei höherer Temperatur eintreten zu lassen; man hält daher die Proben $\frac{1}{2}$ —1 Stunde im Wasserbade von 42—43°, einer Temperatur, welche Typhusbakterien noch nicht wesentlich schädigt (Stern) und jedenfalls ihre Agglutinationsfähigkeit unter normalen Verhältnissen nicht beeinträchtigt. Das weitere Verfahren ist aus dem detailliert mitgeteilten Versuche LX zu ersehen.

Dieser Versuch wurde durch das Ergebnis des als Nr. LIX bezeichneten veranlaßt. In diesem war das eine Serum g während der Beobachtungsdauer für Bakterien unwirksam gewesen, die vorher dem Einflusse einer auf 75° erhitzten Serumverdünnung 1:10 ausgesetzt gewesen waren, gleichgültig, ob diese Verdünnung mit dem gleichen Serum g oder mit Serum h bereitet war. Hingegen hatte das Serum h überall, wenn auch beträchtlich verspätet, Agglutination hervorgerufen.

Dieser Versuch mußte die Vermutung wachrufen, daß das Serum h nicht nur fertige Agglutinine enthalte. Stellt man sich den Agglutinophor mit derselben Struktur vor, wie ihn nach Ehrlich der Immunkörper eines Hämolytins besitzt, so muß die complementophile Gruppe des Amboceptors ergänzt werden können. Vorausgesetzt, daß das Serum h wirklich solche »Agglutinations-Complemente« oder, wie sie weiterhin genannt sein mögen, »Hemiagglutinine« enthält, so konnten sie sich mit den Agglutinophoren, die bereits an die Bakterien herangetreten waren, zu fertigen Agglutininen verbinden und Haufenbildung herbeiführen.

Der exakte Nachweis der Hemiagglutinine war natürlich für die soeben entwickelte Anschauung von höchster Wichtigkeit. Gemäß derselben durften sie selbst nicht gewöhnliche Typhusbakterien agglutinieren, mußten aber bei Bakterien aus erhitztem Serum, welche einem Immunagglutinin gegenüber resistent waren, Zusammenballung veranlassen. Geling es, eine Flüssigkeit ausfindig zu machen, welche diesen Anforderungen entsprach, so

war damit der vollständige Nachweis der Übereinstimmung der Konstitution der Agglutinine mit der der Häm- und Bakteriolysine erbracht.

Zunächst wurde der zufällige Befund am Serum h verwertet. Es gab drei Wege, hier die Hemiagglutinine, die durch Erhitzen naturgemäß nicht von den Agglutinophoren zu trennen waren, aufzufinden. Einmal konnte versucht werden, in der Flüssigkeit, die im Versuche LIX die mit dem Agglutinophor besetzten Bakterien zur Agglutination gebracht hatte, den restlichen Agglutiningehalt zu bestimmen. Thatsächlich ergab die Bestimmung den gleichen Agglutinationswert wie vorher, so daß daraus eine völlige Nichtbeteiligung der fertigen Agglutinine an der Haufenbildung der besetzten Bakterien hervorging. Aber man darf dieser Methode, die mühsam zu handhaben ist, kein allzu-großes Vertrauen schenken. Denn die Unterschiede müssen hier bei der relativ kleinen Menge der in Betracht kommenden Bakterien so gering sein, daß sie der Beobachtung wohl entgehen können.

Die zweite Methode bestand darin, die im Serum h als frei vermuteten Hemiagglutinine zu binden, ehe man das Serum auf die mit dem Agglutinophor besetzten Bakterien einwirken läßt. Dies konnte wieder auf doppelte Weise geschehen: 1. durch Typhusbakterien, die schon vorher mit dem Agglutinophor beladen waren (dieser Weg verdiente aus ähnlichen, wie den vorher angeführten Gründen wenig Vertrauen und wurde daher gar nicht versucht); 2. durch freie Agglutinophore, in der Hoffnung, daß bei Mischung von solchen mit Hemiagglutininen fertige Agglutinine gebildet würden, auch ohne daß Bakterien zugegen sind. Das Resultat war nicht absolut ungünstig, aber auch nicht unzweideutig.

Versuch LX.

5 ccm Serum h in der Verdünnung 1:10 werden 1 Std. auf 75° erhitzt. Mit dieser Flüssigkeit wird der Satz aus der Suspension von zwei mäßig gewachsenen Agarkulturen von Typhus übergossen und in derselben durch oftmaliges Aufsaugen der Flüssigkeit in einer Pipette mit enger Öffnung so gleichmäßig als möglich verteilt. Die Probe wird sodann 1/2 Std. bei 42—43° gehalten, wobei keine Agglutination eintrat, hierauf verdünnt,

Nach $1\frac{1}{2}$ Std. 1., 2., 4., 6., 8., 9. 0. 3., 5., 7. kleine Flöckchen in trüber Flüssigkeit, 10.—17. beendete Agglutination.

Das Bild bleibt weiterhin während der zweistündigen Beobachtung bei 37° unverändert. Die Flockenbildung in 3., 5., 7. ist nicht zu verkennen, doch kommt es nur zu einem unvollständigen Absetzen, und die Flüssigkeit bleibt trüb.

In diesem Versuche wirkt nur das Eine störend, daß von dem mit Kochsalzlösung verdünnten Serum h noch eine gewisse Wirkung auf die mit dem Agglutinophor beladenen Typhusbakterien ausgeübt wurde, während das reine Serum wirkungslos blieb. Von Interesse ist aber weiter, daß auch normale Bakterien in einer Serumverdünnung, welche im Überschuß isolierte Agglutinophore enthält, viel weniger beeinflusst werden als durch die gleich starke, mit Kochsalzlösung hergestellte Verdünnung. Dieses, ganz auffallend an die von Neisser und Wechsberg aufgeklärten, paradoxen Verhältnisse bei den bakteriolytischen Seris erinnernde Verhalten wiederholte sich mehr oder weniger deutlich auch in den späteren Versuchen.

Schließlich war es noch möglich, die Wirkung der etwa vorhandenen freien Hemiagglutinine durch Erhitzen zu beseitigen. Denn aus dem Umstande, daß ein auf 60° erwärmtes Serum bereits eine gewisse Menge von Agglutinophoren frei werden läßt, geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß die ergänzenden Hemiagglutinine diese Temperatur nur schlecht vertragen. In der That erwies sich auch ein reines, auf 60° 1 Stunde lang erhitztes Serum absolut unfähig, Bakterien, die mit dem Agglutinophor besetzt waren, zur Haufenbildung zu bringen.

Von weit größerer Bedeutung als die Versuche, in hochwertigem Immenserum freie Hemiagglutinine nachzuweisen, waren die Bemühungen, sie in normalen, womöglich an sich gar nicht agglutinierenden Flüssigkeiten festzustellen.

In der That gelang es manchmal, durch normales Serum von Meerschweinchen, das an sich nicht agglutinierte, ein sonst für mit Agglutinophoren beladene Typhusbakterien inaktives Serum wirkungsvoll zu ergänzen.

Versuch LXI.

Bakterien in der gewöhnlichen Weise mit auf 75° erhitztem Serum cII behandelt. Zugesezt außer reinem Serum gI noch ein Meerschweinchen-serum, das weder makroskopisch noch mikroskopisch agglutinierte.

1. 5 Tropfen Bakteriensuspension aus auf 75° erhitztem Serum + 5 Tropfen NaCl-Lösung + 5 Tropfen reines Serum g II,
2. 5 Tropfen Bakteriensuspension aus auf 75° erhitztem Serum + 5 Tropfen Meerschweinchenserum + 5 Tropfen reines Serum g II,
3. 5 Tropfen Suspension normaler Bakterien + 5 Tropfen NaCl-Lösung + 5 Tropfen reines Serum g II,
4. 5 Tropfen Suspension normaler Bakterien + 5 Tropfen Meerschweinchenserum + 5 Tropfen reines Serum g II.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. ist in 3. und 4. weitvorgeschr. Agglutination zu konstatieren, die nach $\frac{1}{2}$ Std. unter völliger Klärung der Flüssigkeit beendet ist.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. beginnt in 2. Agglutination, die rasch fortschreitet und nach 1 Std. beendet ist; 1. bleibt trübe.

Ein solches Resultat war aber nicht häufig; viel besser wirkte das Peritonealexsudat von Meerschweinchen, wie es durch eine vorhergehende Injektion von Bouillon oder noch sicherer von Typhuskultur erzielt wurde. Die Entnahme des Exsudates muß, in letzterem Falle besonders, bald nach der Einspritzung erfolgen, da sonst das Auftreten inagglutinabler Bakterien auf reichliche Entstehung von freien Agglutinophoren hinweist.

Versuch LXII.

Gewaschene Bakterien von zwei Agarkulturen werden mit 10 ccm 1:10 verdünntem, 1 Std. auf 75° erhitztem Serum h I $\frac{3}{4}$ Std. bei 42—43° gehalten. Hierauf wird verdünnt, filtriert, centrifugiert, abgegossen und in wenig physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Inzwischen hatte Meerschweinchen 91 5 ccm gewöhnlicher steriler Bouillon, Meerschweinchen 92 5 ccm Kochsalzlösung und $\frac{1}{2}$ Typhusagarkultur erhalten. Beide Tiere wurden $1\frac{1}{2}$ Std. später durch Verbluten getötet. Nr. 91 lieferte fast 7 ccm mäßig roten Exsudates, das nach dem Centrifugieren klar und nur wenig gelblich gefärbt ist. Der Satz besteht aus roten und weißen, meist zu Klumpen vereinigten Blutkörperchen. Nr. 92 gibt ca. 4 ccm trüben, wenig roten Exsudates, das nach dem Centrifugieren fast wasserhell ist, und einen aus roten, einigen weißen Blutkörperchen und massenhaften Typhusbakterien bestehenden Satz hat. Es werden folgende Proben hergestellt:

- | | | | | | |
|-----|--|-----|-------------------------|---------------------|--|
| 1. | 5 Tr. Suspens. v. Bakt. }
aus Serum h I 1 h 75° | | + 5 Tr. Serum h I conc. | + 5 Tr. NaCl-Lösung | |
| 2. | do. | + 5 | » | » | + 5 » Exsudat v. Nr. 92 |
| 3. | do. | + 5 | » | » | + 5 » Exs. v. Nr. 92 $\frac{1}{2}$ h 60° |
| 4. | do. | + 5 | » | » | + 5 » Exs. v. Nr. 91 |
| 5. | do. | + 5 | » | » | + 5 » » » $\frac{1}{2}$ h 60° |
| 6. | do. | + 5 | » | 1:10 | + 5 » NaCl-Lösung |
| 7. | do. | + 5 | » | » | + 5 » Exs. v. Nr. 92 |
| 8. | do. | + 5 | » | » | + 5 » » » $\frac{1}{2}$ h 60° |
| 9. | do. | + 5 | » | » | + 5 » Exs. v. Nr. 91 |
| 10. | do. | + 5 | » | » | + 5 » » » $\frac{1}{2}$ h 60° |

11.	5 Tr. Suspens. v. Bakt. } aus Serum h I 1 h 75° }	+ 5 Tr. NaCl-Lösung	+ 5 Tr. Exs. v. Nr. 92	
12.	do.	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°
13.	do.	+ 5 „	+ 5 „	Exs. v. Nr. 91
14.	do.	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°
15.	5 Tr. Suspens. norm. Bakt.	+ 5 Tr. Serum h I 1:10	+ 5 Tr. NaCl-Lösung	
16.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	Exs. v. Nr. 92
17.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°
18.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	Exs. v. Nr. 91
19.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°
20.	5 „	+ 5 Tr. NaCl-Lösung	+ 5 „	Exs. v. Nr. 92
21.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°
22.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	Exs. v. Nr. 91
23.	5 „	+ 5 „	+ 5 „	1/2 h 60°

Nach 1/4 Std. Deutliche Agglutination in 2. und 4., weit vorgeschritten in 15.—19.

Nach 1/2 Std. 15.—19. vollendete, 2. und 4. weit vorgeschrittene Agglutination; deutlicher Beginn derselben in 7., unsicherer in 9. Sonst keine Beeinflussung.

Nach 3/4 Std. 2. und 4. beendete, 7. weit vorgeschrittene, 9. deutliche Agglutination.

Nach 1 Std. 2., 4., 7., 9. beendete oder fast beendete Reaktion; schwacher Beginn derselben in 3., 5., zweifelhafter in 8. Deutliche Agglutination in 11.

Nach 1 1/4 Std. 2., 3., 4., 7., 8., 9. beendete, in 11. und 13. weit vorgeschrittene Agglutination.

Nach 1 1/2 Std. Wesentlich unverändert bis auf 22., wo schwacher Beginn der Haufenbildung zu konstatieren ist.

Nach 1 3/4 Std. Wesentlich unverändert.

Nach 2 Std. Zur Zeit des Abbruches fehlt jede Reaktion in 1., 5., 6., 10., 14., 20., 21., 23. Beendet, aber mit leichter zurückgebliebener Trübung der obenstehenden Flüssigkeit ist die Agglutination in 2., 3., 4., 7., 8., 9., 11. und 13., in deutlicher Ausbildung in 12. und 22. Vollständige Klärung mit Satzbildung ist in den Kontrollen 15.—19. vorhanden.

Versuch LXIII.

In genau gleicher Weise wie der vorige, mit den Exsudaten der gleichen Meerschweinchen angestellt. Die verwendeten Bakterien waren aber der Einwirkung eines 1:10 verdünnten, 1 Std. bei 75° erhitzten Serums g I ausgesetzt. Bezeichnung ist die gleiche wie im vorigen Versuch, die Kontrollen 20.—23. gelten auch hier, in den Proben 1.—19. ist statt Serum h I Serum g I einzusetzen.

Nach 1/4 Std. Undeutlich beginnende Agglutination in 2., weit vorgeschrittene in 15.—19.

Nach 1/2 Std. In 15.—19. beendete Agglutination, in 2. immer noch undeutlich.

Nach 3/4 Std. In 2. weit vorgeschrittene, in 4. undeutliche Agglutination. Sie beginnt sicher in 7. und 11., zweifelhaft in 9.

Nach 1 Std. In 2., 7., 11. weit vorgeschrittene, in 4., 9. deutliche, in 8. und 12. zweifelhafte Agglutination.

Nach $1\frac{1}{4}$ Std. In 2., 4., 7., 9., 11. beendete, in 3. und 8. deutliche Agglutination. Weiterhin nicht wesentlich verändert.

Nach 2 Std. Zur Zeit des Abbruchs der Beobachtung ist in 1., 5., 6., 10., 13. und 14. keine Veränderung eingetreten, tadellos, d. h. unter vollständiger Klärung der obenstehenden Flüssigkeit ist die Agglutination beendet in 2., 7., 11., 15.—19. Abgesetzt, aber mit Trübung der obenstehenden Flüssigkeit, sind die Proben 4., 8., 9. Unvollständig ist die Reaktion in 3. und 12.

Versuch LXIV.

Zur Verwendung kommt ein frisches, bis 1:5000 agglutinierendes Typhusserum i, in dessen 1 Std. auf 75° erhitzter Verdünnung 1:10 der Satz von drei schwachen Typhusagarkulturen $\frac{1}{2}$ Std. bei 42° gehalten wird (10 ccm Gesamtlösung). Hierauf Herstellung der Proben, ähnlich wie beim vorigen Versuche, mit dem centrifugierten Exsudate zweier Meer-schweinchen, von denen das eine (Nr. 85) 5 ccm stärkehaltiger Bouillon, das andere (Nr. 86) eine schwache Typhusagarkultur in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal erhalten hatte. Sie wurden 2 Std. nach der Injektion verblutet.

1.	5 Tr. Suspens. v. Bakt. } + 5 Tr. Serum i conc. + 5 Tr. NaCl-Lösung aus Serum i, 1 h 75° }		
2.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	Exsudat von Nr. 86
3.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	, , , 85
4.	do.	+ 5 , , 1:10 + 5 ,	NaCl-Lösung
5.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	Exsudat von Nr. 86
6.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	, , , 85
7.	do.	+ 5 , , 1:100 + 5 ,	NaCl-Lösung
8.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	Exsudat von Nr. 86
9.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	, , , 85
10.	do.	+ 5 , NaCl-Lösung + 5 ,	, , , 86
11.	do.	+ 5 , , , + 5 ,	, , , 85

Die Zahlen 12.—22. bezeichnen die entsprechenden Kontrollproben mit einer Aufschwemmung von normalen Typhusbakterien.

Nach $\frac{1}{4}$ Std. 12.—20. weit vorgeschrittene Agglutination, sonst keine Wirkung.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. 12.—20. beendete Agglutination. Deutlicher Beginn ist zu sehen in 10. und 22.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. Außer den abgesetzten Kontrollproben 12.—20. ist in 5., 8., 10. und 22. deutliche Agglutination wahrzunehmen.

Nach 1 Std. ist in 5., 8., 10., 22. die Agglutination beendet oder fast beendet und beginnt undeutlich in 21.

Nach $1\frac{1}{4}$ Std. ist die Flockenbildung in 21. noch stärker geworden, dabei aber ist die Flüssigkeit trüb.

Nach $1\frac{1}{2}$ Std. beginnt Flockenbildung bei 2.

Nach $1\frac{3}{4}$ Std. ist nichts Wesentliches verändert.

Nach 2 Std. Zur Zeit des Abbruches der Beobachtung ergibt sich folgendes Resultat: In 1., 3., 4., 6., 7., 9., 11. ist jede Reaktion ausgeblieben, in 2., 5., 8., 10., 12.—22. ist die Reaktion vollendet, oder die obenstehende Flüssigkeit doch nur unbedeutend trüb.

Der Versuch LXIV zeigt aufs deutlichste, daß Ergänzungsfähigkeit für Agglutinophore und Agglutinationskraft für eine Flüssigkeit ganz verschiedene Dinge sind. Das Exsudat des Meerschweinchens 85 hat nach Einspritzung stärkehaltiger Bouillon unzweideutig eine beträchtlich agglutinierende Wirkung, da es schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde normale Bakterien zusammenballen konnte. Hingegen vermochte es die mit dem Agglutinophor besetzten Bakterien weder für sich allein (Probe 11), noch in Verbindung mit dem Immunserum i (Probe 3, 6, 9) zu agglutinieren; es enthielt also wahrscheinlich gar keine freien Hemiagglutinine. Im Gegensatz dazu brachte das Exsudat des mit Typhus infizierten Meerschweinchens normale Bakterien (Probe 21) erst nach 1 Stunde undeutlich zur Flockenbildung, solche, die mit Agglutinophoren besetzt waren (Probe 10) für sich allein nach $\frac{1}{2}$ Stunde, mit Verdünnungen des Immunserums zusammen nach $\frac{3}{4}$ Stunden zur Agglutination.

Die interessante Erscheinung, daß Hemiagglutinine allein frühzeitig, in Verbindung mit verdünntem Immunserum später, und erst ganz zuletzt mit reinem Immunserum wirkten, ist vorläufig nicht zu erklären, gehört aber jedenfalls auch in den Kreis jener merkwürdigen Befunde, um deren Aufhellung sich die Ehrlichsche Theorie und die Neisser-Wechsbergsche Arbeit so verdient gemacht haben.

In der Regel enthalten Meerschweinchenexsudate nebeneinander Hemiagglutinine und fertige Agglutinine. Daß erstere nicht spezifisch sind, geht schon aus ihrem Vorkommen im normalen Organismus unzweideutig hervor.

Versuch LXIII zeigt ferner, daß sie Temperaturen von 60° nicht mehr gut ertragen, wenn sie auch durch dieselben zunächst nicht vollständig zerstört zu werden brauchen.

Versuch LXV.

Eine Verdünnung des Serums gI 2 : 14 (also 16 ccm) wird 1 Std. auf 75° erhitzt. Dann wird damit der gewaschene Satz von drei Agarkulturen

übergossen, die so gleichmäßig als möglich verteilte Aufschwemmung $\frac{1}{3}$ Std. bei 42–43° gehalten, hierauf filtriert, centrifugiert, und aus dem Satze mit wenig physiologischer Kochsalzlösung eine dichte Aufschwemmung bereitet.

Inzwischen hatten die beiden Meerschweinchen 93 und 94 eine intra-peritoneale Injektion von 5 ccm Bouillon bezw. 5 ccm NaCl-Lösung und eine Typhusagarkultur erhalten und waren $\frac{3}{4}$ Std. später verblutet worden. 93 gab 5 ccm farblosen, wenig trüben Exsudates, 94 kaum 3 ccm heller, aber trüber Flüssigkeit, so daß die Bauchhöhle noch mit 2 ccm NaCl-Lösung ausgespült und das Spülwasser mit dem Reineksudate vereint werden mußte. Beide Exsudate wurden zur vollen Klarheit centrifugiert und, wie folgt, verwendet:

1.	5 Tr. Bakteriensuspens. aus Ser. g I 2:14 1h 75°	} + 5 Tr. Serum g I conc. + 5 Tr. NaCl-Lösung		
2.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , Exs. v. Nr. 94
3.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°
4.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°
5.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , Nr. 93
6.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°
7.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°
8.	do.		+ 5 , NaCl-Lösung	+ 5 , , , Nr. 94
9.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°
10.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°
11.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , Nr. 93
12.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°
13.	do.		+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°
14.	5 Tr. Susp. normaler Bakt.	+ 5 Tr. Serum g I conc.	+ 5 Tr. NaCl-Lösung	
15.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , Exs. v. Nr. 94	
16.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°	
17.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , Nr. 93	
18.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°	
19.	5 , , ,	+ 5 , NaCl-Lösung	+ 5 , , , Nr. 94	
20.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°	
21.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°	
22.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , Nr. 93	
23.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , $\frac{1}{2}$ h 60°	
24.	5 , , ,	+ 5 , , ,	+ 5 , , , 1h 60°	

Nach $\frac{1}{4}$ Std. sind die Proben 14.—18. fast vollständig agglutiniert, in 2. und 8. ist bereits sehr deutliche Haufenbildung sichtbar.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. Wesentlich ebenso.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. Ebenso.

Nach 1 Std. 2. beendet, aber mit leichter Trübung der obenstehenden Flüssigkeit; in 3. und 11. undeutlicher Beginn, 8. Ende der Agglutination; in 22. beginnt deutliche Haufenbildung.

Nach $1\frac{1}{4}$ Std. In 3. noch immer zweifelhafte, in 11. und 22. weit vorgeschrittene, in 19. eben beginnende Agglutination.

Nach $1\frac{1}{2}$ Std. Beginnt Flockenbildung auch in 9. und 10., 19. und 22. haben Flocken in trüber Flüssigkeit entstehen lassen.

Nach $1\frac{3}{4}$ Std. Wesentlich unverändert.

Nach 2 Std. Zur Zeit des Abbruches der Beobachtung war in 1., 4., 5., 6., 7., 12., 13., 20., 21., 23. und 24. keine Reaktion eingetreten, in 2., 9., 10., 11., 19., 22. ist viel Bakterienmaterial flockig abgesetzt, die obenstehende Flüssigkeit aber trübe, in 3. ist eben ein Absetzen in der dicht trüben Flüssigkeit merkbar, 8., 14.—18. zeigen vollständig geklärte Flüssigkeiten.

Die Prüfung der Meerschweinchenexsudate im hängenden Tropfen mit normalen Bakterien hatte ergeben, daß das von Nr. 93 noch bei der Verdünnung 1 : 25 ziemlich vollständig, das von Nr. 94 gerade noch bei 1 : 10, nicht mehr bei 1 : 25 agglutinierte. Damit stimmt das frische Auftreten der Flockenbildung in Probe 22, das verspätete in 19 genau überein. Gerade umgekehrt verhalten sich beide Exsudate gegen Bakterien, die mit dem Agglutinophor beladen waren, und bei gleichzeitigem Zusatz von Exsudat und Serum versagte das Exsudat von 93 ganz. Die Übereinstimmung mit dem Ergebnisse des vorigen Versuches ist also eine weitgehende; auch hier muß man im Exsudate des typhusinfizierten Tieres einen relativ hohen, in dem des normalen Tieres einen sehr geringen Gehalt an freien Hemiagglutininen annehmen.

Auch die Thatsache, daß Hemiagglutinine allein ebensogut oder noch besser als in Verbindung mit Immunserum den Agglutinophor ergänzen, tritt hier, besonders beim Exsudate des Meerschweinchens 93 wieder auf.

Aber das Resultat änderte sich, als bei Anwendung der gleichen Meerschweinchenexsudate das durch Immunisation eines Kaninchens mit Exsudatbakterien erhaltene Serum hI benutzt wurde.

Versuch LXVI.

Die Bezeichnung ist, bis auf den Umstand, daß statt Serum gI überall Serum hI zu setzen ist, die gleiche wie im vorigen Versuche. Die Kontrollen 19.—24. gelten auch hier. (Beide Versuche wurden, ebenso wie der folgende, am selben Tage angestellt.)

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Deutliche Agglutination in 2. und 5., fast beendete in 14—18.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. Ebenso, in 14.—18. vollständige Klärung der Flüssigkeiten.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. 2. und 5. fast beendeter Absatz, aber bei noch trüber, obenstehender Flüssigkeit. In 8. ist deutlicher, in 3. und 11. undeutlicher Beginn der Agglutination wahrzunehmen.

Nach 1 Std. Entsprechend weiter vorgeschritten.

Nach $1\frac{1}{4}$ Std. Agglutination beginnt auch in 9., vielleicht in 10.

Nach $1\frac{1}{2}$ Std. Beginn der Haufenbildung in 4., deutliche Reaktion in 9. und 10.

Nach $1\frac{3}{4}$ Std. Wesentlich ebenso.

Nach 2 Std. Fehlt jede Reaktion in 1., 6., 7., 12., 13. Vollständige Agglutination mit Klärung der obenstehenden Flüssigkeit ist eingetreten bei 8., 11. und 14.—18. Absetzung in Flocken bei trüber Flüssigkeit zeigt sich in 2., 3., 4., 5., 9., 10.

Hier hatte sowohl das Exsudat des normalen wie das des typhusinfizierten Meerschweinchens ungefähr gleichzeitig die mit dem Agglutinophor des Serums hI beladenen Bakterien zur Agglutination gebracht, woraus sich ein ungefähr gleich hoher Gehalt an Hemiagglutinin ergeben würde. Nur daraus, daß die Erhitzung auf 60° das normale Exsudat jeder ergänzenden Fähigkeit beraubt hatte, während dieselbe im Typhusexsudate noch teilweise erhalten war, ergibt sich gleichwohl der grössere Gehalt an Hemiagglutinin für das Typhusmeerschweinchen.

Auch der Umstand, daß diesmal, ungleich dem vorigen Versuche, Exsudat und Immunserum schneller gewirkt hatte als Exsudat allein, wird wieder ausgeglichen durch das vollständige Auftreten der Agglutination bei letzterer, das sehr unvollständige bei ersterer Flüssigkeit.

Vermutlich ist es der geringfügige Eigengehalt des Serums hI an Hemiagglutininen, der diese Unregelmäßigkeit bedingt. Jedenfalls liegt die Schuld nicht an einer Verschiedenheit der Agglutinophore in den beiden Seris hI und gI, wie der folgende Versuch es deutlich macht.

Versuch LXVII.

Exsudate der gleichen beiden Meerschweinchen wie vorher.

1.	5 Tr. Suspens. v. Bakt. } aus Serum gI 1h 75° }	+ 5 Tr. Serum hI conc.	+ 5 Tr. Na Cl-Lösung	
2.	do.	+ 5 „ „ „ „	+ 5 „	Exsudat v. Nr. 94
3.	do.	+ 5 „ „ „ „	+ 5 „	„ „ „ 93
4.	do. Serum hI	+ 5 „ „ gI „	+ 5 „	Na Cl-Lösung
5.	do.	+ 5 „ „ „ „	+ 5 „	Exsudat v. Nr. 94
6.	do.	+ 5 „ „ „ „	+ 5 „	„ „ „ 93

Die entsprechenden Kontrollen siehe in Versuch LXXV und LXXVI.

	1/4 h	1/2 h	3/4 h	1 h	1 1/4 h	1 1/2 h	1 3/4 h	2 h
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Weit vor- geschritt.	Fast beendet	Beendet	—	—	—	—	} Wolkiger Satz, dabei deutlich trüb
3	Weit vor- geschritt.	Fast beendet	Beendet	—	—	—	—	
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Deutlicher Beginn	Weit vor- geschritt.	Fast beendet	Beendet	Trüb beendet	—	—	} Satz mit starker Trübung
6	0	0	0	Weit vor- geschritt.	Flocken daneben ganz trüb	—	—	

Abgesehen von der erst sehr verspätet aufgetretenen und sehr unvollständig gebliebenen Agglutination in der sechsten Probe herrschen somit absolut die gleichen Verhältnisse wie in den Versuchen LXV und LXVI.

Wie bereits bemerkt, beweist das Vorkommen von freien Hemiagglutininen im Exsudate wie auch im Serum normaler Meerschweinchen bereits deutlich, daß es sich hier um regelmäßig im Körper vorhandene, nicht spezifische Stoffe handelt. Daß dieselben auf einen spezifischen Anstofs hin stärker konzentriert in Körperflüssigkeiten auftreten, beweist nur, daß sie sehr leicht im Organismus mobilisiert werden können.

Ihre relativ geringe Hitzebeständigkeit geht aus den ausführlich wiedergegebenen Versuchen ebenfalls klar hervor: schon eine halb-, noch mehr eine einstündige Erhitzung auf 60° schädigt sie schwer. Vernichtet werden sie bei solchen Temperaturen nicht vollständig, was schon durch die relative Beständigkeit eines, wesentlich vollständige Agglutinine enthaltenden Immunserums von vornherein wahrscheinlich war.

Hingegen handelt es sich bei den Agglutinophoren, soweit dies untersucht werden konnte, um streng spezifische Körper.

Auch Choleravibrionen lassen sich, wie vorher bemerkt werden muß, durch Aufenthalt in einem zugehörigen, auf 75° erwärmten Immunserum gegen die in dem unveränderten enthaltenen Agglutinine unempfindlich machen. Doch scheint, wie

aus den bereits Seite 366 erwähnten Tierversuchen hervorgeht die Spaltung der Agglutinine in ihre beiden Anteile und die Produktion der freien Agglutinophore hier schwerer zu erfolgen als bei Typhus. Immerhin gelang es durch Einwirkung von möglichst wenig verdünntem, hochwertigem, 1 Stunde auf 75° erhitztem Immunserum Cholera-vibrionen absolut inagglutinabel zu machen.

Versuch LXIX.

Choleraserum (im hängenden Tropfen noch bei 1:10000, nur noch unvollständig bei 1:12500 agglutinierend) im Verhältnisse 1:5 verdünnt, wird 1 Std. auf 75° erhitzt. Mit 5 ccm dieser Flüssigkeit wird der Satz von zwei gewaschenen Agarkulturen übergossen, $\frac{1}{2}$ Std. bei 42—43° gehalten und in der üblichen Weise filtriert, centrifugiert und in wenig NaCl-Lösung aufgenommen.

- | | | | |
|----|---|-----------------------------|-------------|
| 1. | 10 Tr. Vibrionensusp. aus Immunserum 1 ^h 75° | + 10 Tr. Choleraserum conc. | |
| 2. | 10 „ | „ | + 10 „ 1:10 |
| 3. | 10 „ | „ | + 10 „ 1:50 |
| 4. | 10 „ Suspension normaler Vibrionen | + 10 „ | conc. |
| 5. | 10 „ | „ | + 10 „ 1:10 |
| 6. | 10 „ | „ | + 10 „ 1:50 |

Nach $\frac{1}{4}$ Std. beginnt deutliche Agglutination bei 4. und 5., ist nach $\frac{1}{2}$ Std. in allen drei Kontrollproben weit vorgeschritten und nach 1 Std. beendet.

Die Proben 1.—3. bleiben während der zweistündigen Beobachtungsdauer und auch noch 3 Std. nachher, bei 37° aufbewahrt, gleichmäßig trüb.

Mit diesem Choleraserum wurde die Spezifität der Agglutinophore und der durch sie veranlafsten Inagglutinabilität geprüft.

Versuch LXX.

Choleraserum, im Verhältnis 1:7,5 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, wird 1 Std. lang auf 75° erhitzt. Je 5 ccm dieser Flüssigkeit werden zu dem Satze von je zwei centrifugierten Agarkulturaufschwemmungen von Typhus und Cholera gegeben, und die Suspensionen je $\frac{1}{2}$ Std. bei 42—43° gehalten. Hierauf werden in der üblichen Weise Suspensionen hergestellt.

- | | | |
|----|---|--|
| 1. | 5 Tr. Typhussusp. aus 1 ^h 75° erhitzt. | Choleraser. + 5 Tr. Typhusser. g conc. |
| 2. | 5 „ | „ + 5 „ 1:10 |
| 3. | 5 „ | „ + 5 „ Choleraserum conc. |
| 4. | 5 „ | „ + 5 „ 1:10 |
| 5. | 5 „ Cholerasusp. | „ + 5 „ Typhusser. g conc. |
| 6. | 5 „ | „ + 5 „ 1:10 |
| 7. | 5 „ | „ + 5 „ Choleraserum conc. |
| 8. | 5 „ | „ + 5 „ 1:10 |

9.	5 Tr.	Suspension normaler Typhusbakterien	+ 5 Tr. Typhusserum conc
10.	5	, , , ,	+ 5 , , 1 : 10
11.	5	, , , ,	+ 5 , Choleraserum conc.
12.	5	, , , ,	+ 5 , , 1 : 10
13.	5	, , , Cholera-vibrionen	+ 5 , Typhusserum conc.
14.	5	, , , ,	+ 5 , , 1 : 10
15.	5	, , , ,	+ 5 , Choleraserum conc.
16.	5	, , , ,	+ 5 , , 1 : 10

Nach $\frac{1}{4}$ Std. Weit vorgeschrittene Agglutination in 1., 2., 9., 10., 15., 16. Deutlicher Beginn in 3. und 11.

Nach $\frac{1}{2}$ Std. Vollständig beendete Agglutination in 1., 2., 9., 10., 15., 16. Weit vorgeschrittene in 3. und 11. Deutlicher Beginn in 4. und 12.

Nach $\frac{3}{4}$ Std. ist die Reaktion auch in 3. und 11. ganz, in 4. und 12. fast ganz beendet. Weiterhin tritt während der zweiten Beobachtungsdauer keine Veränderung ein.

Der Versuch ist besonders aus dem Grunde lehrreich, weil hier das Choleraserum gleichzeitig Typhusbakterien agglutinierte. Die Untersuchung im hängenden Tropfen mit Typhusbouillon ergab noch vollständige Haufenbildung bei 1 : 50, sehr unvollständige bei 1 : 75. Wahrscheinlich handelt es sich hier um einen jener durchaus nicht seltenen Fälle, wo bereits normales Kaninchenserum Typhusbakterien agglutiniert; allerdings ist diese Fähigkeit hier außerordentlich stark. Die Konzentration dieser normalen Typhusagglutinine war aber viel zu gering, um durch Spaltung bei 75° genügend Agglutinophore zur Besetzung der großen Menge eingetragener Bakterien hervorzubringen. Die Folge davon war, daß selbst so relativ unbedeutende agglutinative Effekte, wie sie das Choleraserum auf Typhus ausübte, bei den im erhitzten Cholera-Immunserum gewesenen Typhusbakterien gerade so deutlich sichtbar wurden wie bei normalen. Dieser Beweis für die spezifische Wirkung der Agglutinophore erschien so schlagend, daß weitere Versuche nicht mehr angestellt wurden. Durch die Fähigkeit eines auf 75° erhitzten Choleraserums, in dem erst Typhusbakterien bei 42° verweilt hatten, nunmehr noch Cholera-vibrionen inagglutinabel zu machen, würde sich ein weiterer Beweis wohl unschwer erbringen lassen.

Der große Umfang, den die Untersuchungen bereits angenommen hatten, machte eine weitere Ausdehnung derselben

einerseits auf andere als die benutzten Typhus- und Cholera-stämme, andererseits auf andere Bakterienarten für den Einzelnen unmöglich. Namentlich die Untersuchung der Coli-Immusera hätte viel des Interessanten versprochen, besonders in der Hinsicht, ob die verschiedene Wirksamkeit eines Serums gegen verschiedene Colistämme auf einer Verschiedenheit der agglutinophoren Gruppen beruht.

Immerhin berechtigen die angestellten Versuche zur Zusammenfassung folgender Sätze:

1. Die Agglutinine des Typhus-Immuserums sind keine einheitlichen Körper, wie man bisher angenommen hat.
2. Ihre Konstitution setzt sie vielmehr in vollkommene Analogie mit den Bakterio und Hämolsinen.
3. Wie diese bestehen sie aus einem spezifisch wirksamen Anteile, dem Agglutinophor, der von dem zweiten, nicht spezifischen, dem Hemiagglutinin durch Erwärmen eines Serums auf 75° getrennt werden kann.
4. Die von Ehrlich zuerst auf die Agglutinine angewendete Zweiteilung ihrer Wirkung in den Effekt einer haptophoren und einer zymotoxischen Gruppe trifft vollständig zu und entspricht der Agglutinophor der haptophoren, das Hemiagglutinin der zymotoxischen Gruppe Ehrlichs.
5. Wie in allen bisher aus der Immunitätslehre bekannten Fällen, ist auch hier die Wirksamkeit der haptophoren Gruppe zunächst eine unsichtbare. Sie vermag sich mit dem zugehörigen Bakterium zu verbinden und versetzt dasselbe, trotz seines normalen Aussehens, seiner ungestörten Vermehrungsfähigkeit u. dgl. in einen besonderen Zustand, welcher dem der ersten Agglutinationsphase Bordets entsprechen dürfte.
6. Dieser Zustand ist dadurch charakterisiert, daß das für sich allein unwirksame Hemiagglutinin sich jetzt ebenfalls an das Bakterium anlagern und dasselbe zur Haufenbildung bringen kann.

7. Die Hemiagglutinine im freien Zustande lassen sich in verschiedenen, teils agglutinierenden, teils nicht agglutinierenden Flüssigkeiten nachweisen; am reichlichsten scheinen sie im Exsudate intraperitoneal mit Typhus inficierter Meerschweinchen aufzutreten, ohne dafs man ihnen aber deswegen eine Spezifität zuschreiben dürfte.

8. Durch diese Ergänzungsmöglichkeit der freien haptophoren Gruppe, des Agglutinophors, durch eine freie zymotoxische, das Hemiagglutinin, wird der ersteren der Charakter eines Amboceptors verliehen. Das fertige Agglutinin gehört daher in die Reihe der Receptoren dritter Ordnung nach Ehrlich, während die Receptoren zweiter Ordnung, bei denen die beiden Gruppen untrennbar verbunden sein sollen und für welche kein weiteres sicheres Beispiel bekannt ist, als die bisher dazu gerechneten Agglutinine, nicht länger aufrecht erhalten werden können.

9. Infolge der Besetzung eines Typhusbakteriums mit dem isolierten Agglutinophor wird dasselbe in einer Flüssigkeit, welche nur fertige Agglutinine enthält, inagglutinabel.

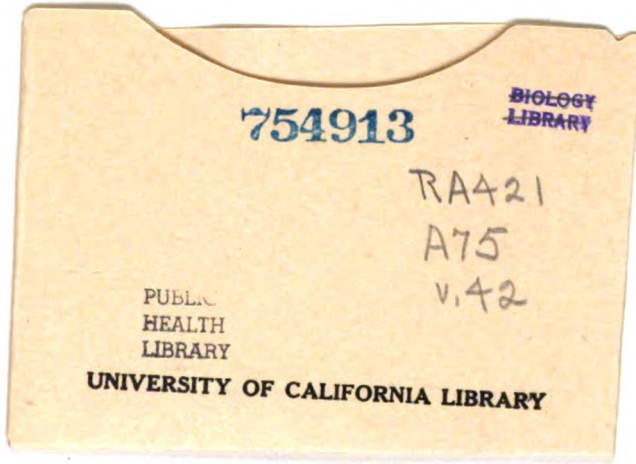
10. Eine derartige Besetzung erfolgt unter natürlichen Verhältnissen in der Bauchhöhle intraperitoneal mit Typhus infizierter Meerschweinchen. Während dieser Infektion kommt es anfänglich zur reichlichen Bildung von freien Hemiagglutininen; Beweis dafür die Möglichkeit, mit frühzeitig entnommenen Exsudaten freie Agglutinophore ergänzen zu können. Daneben werden auch Agglutinophore gebildet, aber in geringer Menge. Dieselben treten sofort mit den Hemiagglutininen zu fertigen Agglutininen zusammen; Beweis dafür das rudimentäre Auftreten von Haufenbildungen im Exsudate, kurze Zeit nach der Infektion. Etwa 3 Stunden nach Einspritzung gröfserer Kulturmengen hört die Bildung der freien Hemiagglutinine auf, während die der Agglutinophore andauert, unter fortwährender Bindung derselben an die im Exsudate befindlichen Bakterien; Beweis dafür ist das Aufhören der spontanen Haufenbildung im Exsudate und das Versagen der Wirkung eines Immunserums gegen die jetzt die Peritonealhöhle einnehmenden Mikroben.

11. Bei der Infektion mit Choleravibrionen unterbleibt eine weitgehende Ausbildung freier Agglutinophore; denn die Vibrionen im Exsudate sind der Wirkung eines Immunserums zugänglich. Sonst aber läßt sich auch für ein Choleraserum die Zusammensetzung der Agglutinine aus Agglutinophor und Hemiagglutinin nachweisen.

12. Über die Art und Weise der Wirkung der zymotoxischen Gruppe, des Hemiagglutinins, geben die Versuche noch keinen Aufschluß.

Nachsatz zur Korrektur: Während der Drucklegung erschien aus dem Paltauf'schen Institute eine inhaltsreiche Mitteilung über ein ähnliches Thema von Eisenberg und Volk (Wiener klinische Wochenschrift, 1901, Nr. 50). Obgleich die kurzen Angaben der Autoren einen vollen Einblick in die wichtigen und interessanten Ergebnisse ihrer Untersuchungen noch nicht recht gewähren, so bilden doch die Punkte 15 bis 17 der Arbeit eine deutliche Bestätigung der vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnisse. Die von den Herren Verfassern konstatierte Übereinstimmung der Konstitution der agglutinierbaren Bakterien-substanz mit den bakteriellen Giften (Punkt 8—11) gewährt eine Klarstellung der so verwickelten Verhältnisse, welcher eine hohe Bedeutung zukommt. Nur bezüglich des Namens »Agglutinoid«, welchen die Herren Verfasser der bindenden Gruppe des Agglutinins geben, möge die Priorität zu gunsten der oben angewendeten Bezeichnung: »Agglutinophor« gewahrt bleiben. Der Überfluß an Namen, über den die Immunitätslehre verfügt, rechtfertigt dieses Ersuchen selbst dann, wenn sich Differenzen in der intimeren Auffassung der bindenden Gruppe zwischen der Ansicht der Herren Autoren und der oben vertretenen herausstellen sollten.

YD 11576



754913

BIOLOGY
LIBRARY

RA421

A75

v.42

PUBLIC
HEALTH
LIBRARY

UNIVERSITY OF CALIFORNIA LIBRARY



