[Aus dem hygienischen Institut der Universität Wien.]

Studien über fäulnisserregende anaërobe Bakterien des normalen menschlichen Darmes und ihre Bedeutung.

Von

Dr. Fritz Passini.

I.

An der Bakterienflora des normalen menschlichen Darmes betheiligen sich zahlreiche Arten von Mikroorganismen, da mit der Nahrung jederzeit Keime in den Intestinaltract eingebracht werden, von denen wohl viele daselbst günstige Vegetationsbedingungen vorfinden. Bestimmte Keime, die Bakterien der Coligruppe, deren erste Beschreibung wir Escherich verdanken, sind in jedem normalen menschlichen Darne vorhanden, man bezeichnet sie deshalb als „obligate“ Darmbewohner im Gegensatze zu jenen, welche nicht constant anzutreffen sind, den „wilden“ Keimen. Während man bisher diejenigen Bakterien, welche auf unseren künstlichen Nährboden aërobes und facultativ anaërobes Wachsthum zeigen, einem eingehenden Studium unterzogen und ihre Bedeutung für die physiologischen und pathologischen Vorgänge im Darmtracte annähernd festgestellt hat, fanden die streng anaërobisch wachsenden Darmbewohner bis in die letzte Zeit wenig Beachtung. Einzelne Autoren kamen sogar auf Grund missglückter Culturversuche zu dem Schlusse, dass Anaërobier im Darne des Menschen normaler Weise überhaupt nicht vorkämen, andere konnten mit Hilfe mangelhafter Methoden ab und zu „wilde“ exquisit anaërobisch wachsende Keime finden.

Die fortschreitenden Verbesserungen der den Ausschluss des atmosphärischen Sauerstoffes bezweckenden Culturverfahren brachten es erst mit sich, dass exacte Untersuchungen menschlicher Fäces auf ihren Gehalt

an anaëroben Bacterien vorgenommen werden konnten. Tissier hat als Erster in eingehender Weise normale Stühle von Säuglingen daraufhin geprüft und mehrere Arten anaërobisch wachsender Keime daraus gezüchtet und beschrieben, weiters konnte Rodella nachweisen, dass in den normalen Fäces von Brust- und Flaschenkindern constant Anaërobier, darunter peptonisirende Arten zu finden seien.¹

Mehr als diesen Nachweis lieferten die Arbeiten der genannten Autoren aber nicht, denn mit der Beschreibung einzelner Culturen oder wie es Tissier gethan mit der Zuerkennung eines neuen Namens für jeden ihm fremden Bakterienstamm — ein Vorwurf, den Tissier sich von Seiten Achalmes zugezogen hat —, ist kein Schritt vorwärts gethan in der Kenntniss der darmbewohnenden Anaërobier. Ich habe daher auf der Basis der Arbeiten von Grassberger und Schattenfroh die Darmflora in der Weise untersucht, dass ich die von diesen Autoren beschriebenen, „streng anaëroben Buttersäurebacillen“ zu cultiviren versuchte und konnte dabei feststellen, dass dieselben im normalen Stuhle vorhanden sind. Der unbewegliche Buttersäurebacillus (Schattenfroh-Grassberger) wurde aus allen Stühlen von Säuglingen und Erwachsenen mit Hülfe des Botkin'schen Anreicherungsverfahrens gezüchtet, die Cultur des beweglichen Buttersäurebacillus (Amylobacter - Gruber, Granulobacter - Beyerink) gelang mit Hülfe des Beyerink'schen Verfahrens wiederholt, es konnte jedoch bezüglich der Häufigkeit seines Vorkommens aus der nicht genügend grossen Zahl von Untersuchungen kein Urtheil gefällt werden. Mit Hülfe eines geeigneten Nährbodens gelang es mir weiters den Bacillus putrificus Bienstock, den Grassberger und Schattenfroh als „fäulniserregenden Buttersäurebacillus“ in ihr System aufgenommen haben, regelmässig aus Fäces von Erwachsenen, wiederholt aus Stühlen von Brust- und Flaschenkindern zu isoliren.

Von vornherein war anzunehmen, dass sich unter diesen als Buttersäurebacillen bezeichneten anaëroben Darmbakterien solche Arten finden werden, welche bereits von Tissier und Rodella cultivirt worden sind, und es lag die Möglichkeit vor, dass hier schon früher bekannte Bakterien unter einem anderen Namen wieder beschrieben würden. Da aber unsere Kenntnisse über die verschiedenen Arten und Gruppen der streng anaërobisch wachsenden Keime noch sehr lückenhaft sind, ein und dasselbe Bacterium

¹ Flügge berichtete bereits im Jahre 1894 (*Diese Zeitschrift*, Bd. XVII, S. 298), dass der Bacillus butyricus Botkin stets in den Fäces auch von wenigen Tagen alten, nur mit Frauenmilch genährten Säuglingen vorhanden sei. Der Botkin'sche Bacillus dürfte jedoch nach den Studien Grassberger's u. Schattenfroh's keine einheitliche Bakterienart sein. (Siehe Schattenfroh und Grassberger, „Ueber Buttersäuregährung“, I. Abhdlg., S. 100 „Kritik der Botkin'schen Untersuchungen“.)

häufig von den verschiedenen Autoren mit anderen Namen belegt wurde (der Gasphegmonebacillus besitzt noch weitere 6 Namen), ein Bestimmen von Culturen nach den vorliegenden meist mangelhaften Beschreibungen nur zu Wahrscheinlichkeitsdiagnosen führen kann, schien mir der eingeschlagene Weg, auf diese in ihrem Formenkreise und Chemismus eingehend studirten Keime die Fäces zu untersuchen, der einzig rationelle. Als Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauung sei angeführt, dass die Prüfung der mir von Rodella freundlichst übersandten Bakterienstämme, die er aus normalen Säuglingsstühlen cultivirt hatte, ergab, dass von 10 Culturen 5 als typische Buttersäurebacillen anzusprechen seien, und zwar ein thierpathogener Stamm des Gasphegmonebacillus, 3 Stämme dieses Bakteriums, welche selbst in grossen Dosen Meerschweinchen subcutan injicirt keine krankmachende Wirkung zeigten und ein Stamm von Bac. des malignen Oedems. Weitere derartige vergleichende Studien würden die Zahl der beschriebenen und noch zu beschreibenden anaeroben Darmbewohner sehr reduciren, was der Einheit der Forschung zweckdienlich wäre.

Die positiven Ergebnisse der Versuche, den Bacillus putrificus aus normalen Stühlen zu cultiviren, stehen im Gegensatze zu den Befunden Bienstock's, der den von ihm beschriebenen anaeroben Fäulnisserreger wohl jederzeit in Strassenkoth, Erde, Cadaverjauche fand, dem aber die Züchtung desselben aus Fäces niemals gelang. Das Fehlschlagen seiner Culturversuche erklärt er damit, dass sich im Darne stets solche Bakterien befinden, welche antagonistische Kräfte gegenüber dem Anaërobier besitzen und seine mit der Nahrung eingebrachten Sporen, bezw. die daraus auskeimenden vegetativen Formen zu vernichten im Stande seien. Bei Mischinfectionsversuchen sah Bienstock, dass diese Keime, die Bakterien der Coligruppe, bei Anwesenheit von grösseren Zuckermengen die Entwicklung des Bacillus putrificus behindern, bei Abwesenheit von Zucker das Wachsthum desselben wohl zulassen, seine fermentative Thätigkeit aber hemmen. Speciell diesen Mikroorganismen komme die Fähigkeit zu, sterilisirte sowie pasteurisirte Milch bei Mischinfectionen mit dem Anaërobier vor fauliger Zersetzung zu schützen, die constante Anwesenheit dieser Keime in Rohmilch bewahre diese vor Fäulniss. Der Antagonismus der Colibakterien gegenüber dem Bacillus putrificus, schliesst Bienstock aus seinen Experimenten, beruhe nicht allein darauf, dass erstere als Säurebildner einen für das Wachsthum des Fäulnisserregers weniger günstigen Nährboden schaffen, es kämen ihnen „speciell im Vergleiche mit anderen säureproducirenden Bakterien noch besondere fäulnisshemmende Fähigkeiten zu“.

Mögen die Beobachtungen Bienstock's, die er bei seinen Mischinfectionen in Milch gemacht hat, auch vollkommen richtig sein, so hat

es doch den Anschein, dass er mit der Uebertragung der daraus gefolgerten Schlüsse auf das Leben der Bakterien im Darne zu weit gegangen ist. Für den Säugling könnten dieselben Geltung haben, beim Erwachsenen, der gemischte Kost isst, gestalten sich die Nährbedingungen für die Bakterien wohl viel complicirter; in seinem alkalisch reagirenden Dickdarminhalte finden peptonisirende Bakterienarten günstige Verhältnisse zum Wachsthum, auch das im Dünndarm vorwiegend zuckervergärende *Bacterium coli* mag sich hier an dem theilweisen Abbau der Eiweissstoffe bethätigen (Escherich), nur dem *Bacillus putrificus* soll die Möglichkeit benommen sein, sich zu entwickeln? Ein so weitgehender Antagonismus, wie ihn Bienstock den Bakterien der Coligruppe gegenüber dem fäulniserregenden Anaërobier zuschreibt, ist alleinstehend in der ganzen Bakterienlehre, weshalb es von Interesse zu sein schien, durch Wiederholung der Bienstock'schen Mischinfectionsversuche bei Verwendung anderer Nährböden das Verhältniss zwischen Colibacillen und dem *Bacillus putrificus* nochmals zu prüfen.

Vor Bienstock haben sich bereits andere Forscher (Hirschler, Winternitz, Seelig, Rovighi, Schmitz, Blumenthal) mit der Frage beschäftigt, welche Stoffe im Stande seien, die Fäulniss der Eiweisskörper, im Speciellen die der Milch, zu behindern. Durch in vitro angestellte sowie durch klinische Experimente, die in Fütterungsversuchen bestanden, kamen sie fast durchgehends zu der Ueberzeugung, dass dem Milchzucker die fäulnisshemmende Kraft zukommt; durch seine leichte Vergärbbarkeit bildet er ein gutes Angriffsobject für die vorwiegend zuckervergärenden Bakterienarten, die rasch eintretende Vermehrung derselben, sowie die durch sie hervorgerufene saure Reaction der Nährböden, lässt die Fäulniserreger nicht aufkommen.

In neuerer Zeit haben Tissier und Martelly in ihrer Arbeit „Putrefaction de la viande de boucherie“ den Antagonismus zwischen den Bakterien der Coligruppe und dem *Bacillus putrificus*, den Bienstock für die Hemmung der Fäulnissprocesse im Darne verantwortlich hält, zum Gegenstand der Untersuchung gemacht. Sie legen in einwandsfreier Weise dar, dass das *Bacterium coli* ausschliesslich durch sein Säurebildungsvermögen die Entwicklung des *Bacillus putrificus* aufhalte und dass noch andere ausserhalb der Coligruppe stehende Bakterien durch ihre Fähigkeit aus zuckerhaltigen Nährböden reichlich Säure zu entwickeln in der gleichen Weise fäulnisshemmend wirken können. Auf verschiedenen Nährböden angestellte Mischinfectionen mit den in Frage stehenden Keimen ergaben, dass ein bestimmter Percentgehalt des Nährsubstrates an Zucker vorhanden sein müsse, damit die zur Hemmung der Entwicklung des Fäulniserregers nöthige Menge an Säure gebildet werden könne und

dass auf zuckerfreien Nährböden *Bacterium coli* und *Bacillus putrificus* Bienstock, ohne einander in Wachsthum und Wirkung zu beeinflussen, gedeihen.

Da die Anordnung meiner einschlägigen Versuche sich mit der von Tissier und Martelly gewählten fast deckt, kann von der Anführung der einzelnen Experimente abgesehen und das Resultat derselben zusammenfassend mitgetheilt werden.

Die zur Infection verwendeten Stämme von *Bacterium coli* und *Bacterium lactis aërogenes* verhinderten in sterilisirter Milch fast durchgehend das Wachsthum der verschiedenen gleichzeitig geimpften Stämme des *Bacillus putrificus*; nur in einer kleinen Anzahl dieser Versuche auf Milch trat Vegetation des Anaërobiers und Peptonisirung des Caseïns sowie Zerfall der eingetragenen Fibrinflocke ein. An sich ist sterilisirte Milch ein guter Nährboden für den Bienstock'schen *Bacillus*, obwohl sich die verschiedenen Rassen desselben diesbezüglich nicht gleich verhalten.

Wurden andere fast zuckerfreie und zur neutralen Reaction gebrachte Nährmedien nach Zusatz abgestufter Mengen von Traubenzucker verwendet, so war eine Hemmung der Entwicklung des *Bacillus putrificus* erst bei einer bestimmten Höhe des Zuckergehaltes zu beobachten. Auf im gespannten Dampf bei 3 Atmosphären sterilisirtem Eiereiweiss wuchs z. B. der *Bacillus putrificus* neben dem *Bacterium coli* noch nach Zusatz von 10 Procent Traubenzucker (der an sich alkalisch reagirende Nährboden wurde, fein zerrieben durch Zusatz von Essigsäurelösung neutralisirt und 10 Procent seines Volumens Traubenzucker zugesetzt); erst bei höherem als den angegebenen Zuckerzugaben trat ausschliesslich Entwicklung des *Bacterium coli* oder *Bacterium lactis aërogenes* ein. Aehnliche Werthe ergaben Versuche mit dem gebräuchlichen neutral reagirenden Gelatine-nährboden, welcher bei geringem Zuckerzusatz rasch verflüssigt, bei hohen Dosen wegen der auch im Mikroskope nachweisbaren ausschliesslichen Vegetation des *Bacterium coli* starr blieb oder nach Cultivirung im Brutschranke bei 37° C. noch erstarrbar war.

Die Entwicklung des *Bacillus putrificus* ist demnach bei Mischinfection mit den Bakterien der Coligruppe nicht allein abhängig von der vorhandenen Menge der leicht vergährbaren Kohlehydrate, sondern gleichzeitig von dem ihm gebotenen Eiweissmateriale, wofür die Versuche mit dem Eiereiweissnährboden, welcher in hervorragender Weise das Anwachsen des Anaërobiers fördert, sprechen. Säurebildende Bakterien wie der *Bacillus prodigiosus* und der *Bacillus proteus* Hauser (siehe Bienstock) mögen demnach die Fäulniss der Milch deshalb nicht aufhalten, weil sie auch Eiweissstoffe (*Bacillus prodigiosus* nach Hüppe auch Caseïn) angreifen, wodurch sie dem Bienstock'schen *Bacterium* günstiges, leichter

assimilirbares Nährmaterial liefern. Bakterien hingegen, denen sehr schwache eiweisspaltende Fähigkeiten neben dem Vermögen Kohlehydrate intensiv zu vergären eigen sind, werden im Stande sein, direct durch Säurewirkung die Milchfäulniss zu behindern. Hierher gehören nach den Untersuchungen von Bienstock das *Bacterium coli* und *Bacterium lactis aërogenes*, nach Tissier der *Bacillus bifidus* und *le streptocoque intestinal*, während nach meinen Untersuchungen noch der unbewegliche *Buttersäurebacillus* (die asporogene Vegetationsform des *Gasphegmonebacillus*) anzureihen wäre. Beschickt man sterilisirte Milch gleichzeitig mit einer Cultur des unbeweglichen *Buttersäurebacillus* auf Zuckeragar oder Zuckerbouillon und dem *Bacillus putrificus*, so tritt rasch die typische Buttersäuregährung ein, das Caseingerinnsel bleibt aber dauernd unverändert und das mikroskopische Präparat weist keine Vermehrung der Sporenformen des Fäulniserregers auf. Bei Ausdehnung dieser Versuche könnten wohl noch andere Bakterien gefunden werden, denen eine ähnliche antagonistische Wirkung zukäme. Für die Bedeutung der einzelnen unter denselben kommt gewiss auch die wechselnde Schnelligkeit der fermentativen Spaltung der Kohlehydrate und damit auch die in verschiedenem Maasse rasch sich anhäufende schädliche Säuremenge in Betracht.

Die Fäulnissbehinderung war in den untersuchten Fällen coincidirend mit der Vegetationshemmung des anaëroben Bacteriums, sie hängt nicht von einer Alteration seines Stoffwechsels ab; wo ein Anwachsen des *Bacillus putrificus* stattfand und mikroskopisch zu beobachten war, trat seine Fermentwirkung ungeschwächt ein.

Besonders erwähnenswerth ist, dass die vom fäulnisserregenden Anaërobier gebildeten proteolytischen Fermente auch in Medien, die in Folge ihres Säuregehaltes für eine Vegetation des Bacteriums nicht als günstig bezeichnet werden können, zu wirken im Stande sind. Von Milchculturen des *Bacillus putrificus* wurde durch bakterienfreie Filtration und Einengen der gewonnenen Flüssigkeit im Vacuum über Schwefelsäure eine dickflüssige Masse gewonnen, welche die Fermente des Anaërobiers enthielt. Der Inhalt einer mittelgrossen Oese dieses Präparates reichte aus, 10^{ccm} des gebräuchlichen Gelatinenährbodens innerhalb 2 bis 3 Stunden bei 37° C. zu peptonisiren, so dass derselbe nach dieser Zeit nicht mehr erstarrbar war. Wurde Milch gleichzeitig mit *Bacterium coli* und dem Fermente beschickt, so trat die Auflösung des Caseins ungehindert ein, das Ferment löste auch bei nachträglichem Zusatze das Caseingerinnsel älterer Coliculturen in Milch, ohne dass die saure Reaction geschwunden wäre. Gelatinenährböden mit den stark sauer reagirenden Filtraten von Coliculturen in Milch oder in 4procentiger Zuckerbouillon versetzt, wurden durch Zusatz des Präparates ebenso rasch verflüssigt, wie

die Controlröhrchen, in denen nur die Fermentlösung des Anaërobiers eingetragen worden war.

Mit dem gelungenen culturellen Nachweise des *Bacillus putrificus* in den Fäces ist wohl Bienstock's Ansicht, dass die antagonistisch wirkenden Bakterien die aus den eingeführten Sporen auskeimenden Vegetationsformen an irgend einer Stelle des Intestinaltractes vernichten würden, widerlegt, weiters ergibt sich aus den Versuchen von Tissier und Martelly, sowie aus den oben citirten Experimenten, dass dieser fäulnisserregende Anaërobier im normalen Dickdarminhalte eines Menschen, der gemischte Kost geniesst, geeignete Bedingungen zum Wachsthum, leicht angreifbares Eiweissmaterial und günstige alkalische bis schwachsaure Reaction vorfindet. Es handelte sich nun um die Entscheidung der Frage, ob im Darne eine Entwicklung der Keime stattfindet oder ob die Cultur des *Bacillus putrificus* ausschliesslich aus den mit dem Speisebrei mitgeschleppten Sporen gelungen sei. Zu diesem Zwecke untersuchte ich Fäces von Erwachsenen und Säuglingen auf ihren Gehalt an Putrificussporen, wobei von der Voraussetzung ausgegangen wurde, dass dieser Mikroorganismus im Darne ebenso leicht sporulire als in den künstlichen Nährböden, und die Zahl der aus den Dauerformen auskeimenden Colonieen auf die Intensität seiner Vegetation schliessen liesse. Es wurden anaërobe Platten-culturen auf Gelatine und Agar von verschiedenem Alkalescentzgrade aus pasteurisirten (durch 15 Minuten bei 70° C. erwärmten) Stuhlaufschwemmungen angelegt. Die Misserfolge lehrten jedoch, dass man mit diesem bei Aërobiern zur Zählung der Keime im Ausgangsmateriale im allgemeinen verlässlichen Verfahren hier nicht zum Ziele gelangen könne. Ein oder das andere Mal wuchsen Colonieen des *Bacillus putrificus*, meist kamen nur facultativ anaërobisch wachsende Bakterienarten zur Entwicklung, während gleichzeitige Aussaaten auf im gespannten Dampfe sterilisirtem Eiereiweiss die Anwesenheit des Fäulnisserregers erwiesen.

Um nun über die Menge der in normalen Stühlen von Menschen, die gemischte Kost geniessen, befindlichen Sporen des Bienstock'schen Bacteriums Aufschluss zu bekommen, wurden Verdünnungen des zu untersuchenden Materiales in der Weise angelegt, dass aus mehreren centralen Partieen eines frisch abgesetzten normalen Stuhles Theile in der Menge einer mittelgrossen Oese entnommen und in je 10^{cem} Bouillon fein verrieben wurden; aus der dann 15 Minuten bei 70° C. pasteurisirten Aufschwemmung wurde in eine grössere Anzahl von Röhrchen des Eiereiweissnährbodens, welche mit Bouillon oder Kochsalzlösung vorher überschichtet und durch Kochen luftfrei gemacht worden waren, je eine Oese eingetragen und die geimpften, in Buchnerrohren verschlossenen Eproutetten der Bruttemperatur von 37° C. ausgesetzt. Wenn nach mehreren

Tagen Verflüssigung des Nährbodens eingetreten war, was bei einzelnen Untersuchungen in 70 bis 100 Procent der beschickten Röhrchen beobachtet werden konnte, wurden anaërobe Plattenculturen daraus angefertigt, die zur Isolirung des *Bacillus putrificus* führten.

Bei der in den vorliegenden Experimenten eingeschlagenen Versuchsanordnung ist es wohl ausgeschlossen, dass diese durch den Anreicherungs-nährboden nachgewiesenen Sporen ausschliesslich mit der Nahrung in den Darm eingeführt worden sind. Rechnet man die Oese der Aufschwemmung zu 5^{mm} und nimmt man selbst an, dass bei den positiven Culturversuchen nur eine Spore übertragen wurde, so müsste eine Oese Fäces 2000, 1^{cm} 400.000 Sporen des *Putrificus* enthalten. Derartige Mengen deuten wohl unbedingt auf im Darne vorangegangene Vegetation hin, eine Schlussfolgerung, welche auch dadurch nicht an Wahrscheinlichkeit verliert, dass derartige Befunde nicht regelmässig erhoben werden konnten und die Culturergebnisse bei ein und demselben Individuum bedeutende Schwankungen aufwiesen.

Versuche, den *Bacillus putrificus* aus Meconium zu cultiviren, ergaben mehrmals positive Resultate, ein Befund, der die Angaben Escherich's, dass die im mikroskopischen Meconiumpräparate fast constant anzutreffenden Köpfchensporen *Putrificus*keime seien, zu stützen im Stande ist, wenngleich hervorzuheben ist, dass auch andere anaërobe Bakterienarten, welche das Meconium enthält, derartige Sporenformen bilden können.

Von normalen Stühlen der Brustkinder mussten stets grosse Mengen d. h. mehrere Oesen der pasteurisirten Fäces in den Nährboden eingetragen werden, um den Fäulnisserreger zum Wachsthum zu bringen; wenn zahlreiche Nährbodenröhrchen in dieser Weise geimpft worden waren, lieferten nur wenige ein positives Culturergebniss, woraus auf das Vorhandensein einer sehr geringen Zahl von Sporen in solchen Fäces geschlossen werden kann. Im Darm des Säuglings, für welchen sicher auch die Gelegenheit zur Infection mit dem ubiquitären *Bacillus putrificus* besteht, müssen Bedingungen vorhanden sein, welche ein Auskeimen der eingeführten Dauerformen verhindern oder zum mindesten die Vegetation sehr beschränken. Dieselben hängen wohl in erster Linie mit der Beschaffenheit der Nahrung selbst zusammen, welche es mit sich bringen muss, dass die säurebildenden Bakterien bis zum Ende des Darmtractes günstigen Nährboden zum Gedeihen vorfinden und gegenüber den eiweisspaltenden die Vorherrschaft behalten.

Bei künstlich ernährten Säuglingen mit normaler Darmfunction gelang in einem Falle nach dem Verdünnungsverfahren der Nachweis zahlreicher *Putrificus*sporen, woraus wohl nicht abgeleitet werden darf, dass dieser

Anaerobier im Darme von Flaschenkindern stets günstigere Vegetationsbedingungen vorfinde als bei Brustkindern; im Allgemeinen ergaben aber zahlreiche Versuche, dass aus den Fäces künstlich ernährter Kinder relativ geringere Mengen des pasteurisirten Stuhlmateriales in den Anreicherungs Nährböden eingetragen werden mussten, um eine Cultur zu erreichen, was auf eine grössere Anzahl von darin befindlichen Dauerformen des *Bacillus putrificus* deutet. Ob dafür der Umstand, dass dieser Keim mit der Nahrung reichlicher eingeführt worden war oder eine stattgehabte Vegetation im Darme selbst anzuschuldigen ist, entzieht sich vorläufig der Beurtheilung.

Es zeigten somit die bisherigen Prüfungen von Fäces, dass der Bientstock'sche *Bacillus* bei Brustkindern am spärlichsten vorkomme, während im Darminhalte von Flaschenkindern das Bacterium etwas reichlicher anzutreffen ist, bei Erwachsenen, d. h. bei Individuen, die die gemischte Kost der Erwachsenen geniessen, die Bedingungen für seine Vermehrung jedenfalls am günstigsten sind.

Sehen wir uns in der Gruppe der streng anaeroben Buttersäurebacillen weiter um, so treffen wir ein Bacterium, welches durch die Aehnlichkeit seines morphologischen und chemischen Verhaltens dem *Bacillus putrificus* nahesteht, den *Bacillus* des malignen Oedems (*Vibrion septique*). Derselbe wird von französischen Autoren (Macé) als constanter Bewohner des menschlichen Darmes angesehen, eine Angabe, die ich nach den Ergebnissen meiner bisherigen Stuhluntersuchungen nicht bestätigen kann. Der Widerspruch erklärt sich vielleicht daraus, dass ich die aus Fäces cultivirten Bakterienstämme entsprechend den Beschreibungen Grassberger's und Schattenfroh's diagnosticirte, nicht aber nach den in manchen Punkten abweichenden Angaben der französischen Forscher. Dass dieser Anaerobier im normalen Stuhle vorhanden sein kann, ergibt sich aber daraus, dass es, wie erwähnt, Rodella gelang, einen in seinem morphologischen und biologischen Verhalten mit Sicherheit als typischen *Bacillus* des malignen Oedems anzusprechenden Mikroorganismus aus den Fäces eines gesunden Brustkindes zu cultiviren (einer der mir übersandten anaeroben Bakterienstämme).

Einer eingehenden Betrachtung muss der Gasphlegmonebacillus unterzogen werden, da dieses Bacterium ein constanter Bewohner des menschlichen Darmes ist. Unter dem Namen *Bacillus emphysematosus* beschrieb bekanntlich E. Fränkel ein unbewegliches stark zuckervergärendes anaerobes Stäbchen, welches er auf künstlichen Nährböden äusserst selten zur Versporung bringen konnte.

Dasselbe vermag beim Menschen und geeigneten Versuchsthiere das typische Krankheitsbild der Gasphlegmone hervorzurufen. Hitschmann

und Lindenthal konnten bei Untersuchung einer Reihe von Fällen von menschlichen Gasphegmonen die Culturergebnisse E. Fränkel's bestätigen, kamen jedoch auf Grund der ihnen aus pasteurisirtem Stuhlmateriale gelungenen Züchtung des Bacteriums zu dem Schlusse, dass der in der Cultur nicht versporende *Bacillus emphysematosus* im Intestinaltracte des Menschen in der Sporenform existire. Wie Eingangs erwähnt, gelang es mir mit Hülfe des Botkin'schen Verfahrens, durch welches bekanntlich die vegetativen Formen der Bakterien im Ausgangsmateriale eliminirt werden, aus Stühlen von Säuglingen und Erwachsenen regelmässig einen anaëroben Organismus zu cultiviren, der in seinem morphologischen und chemischen Verhalten mit dem Gasphegmonebacillus vollkommen übereinstimmt, dessen einzelne Stämme sich jedoch hinsichtlich ihrer Thierpathogenität different zeigten. Dieser Anaërobier wurde in Anlehnung an die Untersuchungen Grassberger's und Schattenfroh's, welche klarlegten, dass der Fränkel'sche Gasphegmonebacillus nur eine pathogene Varietät des von ihnen als Typus eines echten Buttersäurebacillus erkannten unbeweglichen Buttersäurebacillus sei, als „unbeweglicher Buttersäurebacillus“ beschrieben und der eventuellen Thierpathogenität einzelner Rassen keine Erwähnung gethan. Es handelte sich hier eben um ein und dasselbe Bacterium, auf dessen pathogene Stämme Hirschmann und Lindenthal bei ihren Untersuchungen Werth gelegt haben, während für mich die Zugehörigkeit zum System der anaëroben Buttersäurebacillen und die Anreihung an eine bestimmte Type desselben maassgebend war. Da in meinen Culturversuchen ebenfalls von den in den Fäces vorhandenen Sporen ausgegangen wurde, bekräftigen meine Befunde die Ansicht der beiden Autoren und erweitern sie dahin, dass nicht allein die pathogenen Rassen des Gasphegmonenbacillus, sondern auch seine avirulenten Stämme im Intestinaltracte Dauerformen bilden können.

Die Thatsache, dass der Gasphegmonebacillus im Darne sporulirt, hat für die vorliegenden Betrachtungen grosses Interesse, da wir heute wissen, dass dieses Bacterium in der sporulierenden Form häufig einen ganz anderen Stoffwechsel besitzt als in der asporogenen. Bei einer Reihe von Stämmen gelang es Grassberger auf künstlichen Nährböden das Zustandekommen einer weitgehenden Versporung des Keimes zu erzielen, aus den geissellosen Formen entwickelten sich neben Clostridien bewegliche, schlanke, sporentragende Stäbchen.¹ Mit dem Morphismus hat das Bac-

¹ Im Laboratorium fortgesetzte Versuche ergaben, dass es fast ausnahmslos gelingt, die asporogene Vegetationsform des Gasphegmonebacillus in die sporulierende überzuführen; der E. Fränkel'sche Originalstamm (aus Král's Sammlung bezogen) versporst rasch, wenn man seine Zuckeragarcultur auf den Eiereiweissnährboden überimpft.

terium aber auch gewöhnlich seinen Chemismus geändert, indem es nunmehr vielfach die Fähigkeit zeigt, Eiweissstoffe zur Fäulniss zu bringen. Coagulirtes Rinder Serum, Fibrin, Casein der Milch, welches vom Zucker grösstentheils befreit wurde, und Leims Substanzen werden in solchen Fällen unter Entwicklung stinkender Fäulnissgase verflüssigt. Die pathogenen Stämme bewahren bei dieser Umzüchtung, soweit aus einer kleinen Untersuchungsreihe (6 Stämme) geschlossen werden kann, ihre Virulenz im Thierversuche; im subcutanen Zellgewebe sowie im Peritonealraume des Meerschweinchens tritt aber ebenso wie bei Ueberimpfung auf stark zuckerhaltige Nährböden, z. B. Milch, sofort wieder die asporogene Vegetationsform auf.

Im Darmcanale des gesunden Säuglings und des Erwachsenen gedeiht also der Gasphlegmonebacillus wie nachgewiesen auch in seiner sporulirenden fäulnisserregenden Vegetationsform. Bei aller Reserve dürfte wohl aus dem in unseren Nährböden deutlich zu Tage tretenden Einflusse des Zuckers auf den Morphismus und Chemismus dieses Bacteriums abzuleiten sein, dass sich im Darne vielleicht ähnliche Vegetationsänderungen wie in den künstlichen Culturen abspielen können. Im Dünndarme, in welchem reichliche Zuckermengen vorhanden sind, würde sich dementsprechend die Kohlehydrate vergärende asporogene Form entwickeln, während die zuckerarmen, an Eiweissstoffen noch reichen Dickdarmcontenta das Entstehen der sporulirenden fäulnisserregenden Art des Gasphlegmonebacillus aus der ersteren befördern dürften. Es sind also diesem Anaërobier im ganzen Verlaufe des Darmes günstige Bedingungen zum Anwachsen in der einen oder anderen Form geboten, während nach den früheren Auseinandersetzungen der Bacillus putrificus wohl erst im Dickdarme, nachdem die zuckervergärenden Bakterien ihre Thätigkeit verrichtet haben und ihre sauer reagirenden Producte durch Resorption geschwunden sind, gedeihen kann.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass der menschliche Darm eine Reihe von verschiedenen Bakterien der Buttersäurebacillengruppe beherbergen kann, denen die Fähigkeit zukommt, Eiweissstoffe zur Fäulniss zu bringen. Der von Achalmé und mir gleichzeitig angegebene Nährboden aus Eiereiweiss (Achalmé verwendet Würfeln von gekochtem Hühnereiereiweiss, welche mit Wasser überschichtet eine Viertelstunde bei 120° C. sterilisirt werden) bietet im Allgemeinen den eiweisspaltenden Bakterien, also auch anderen peptonisirenden Anaërobiern und facultativen Anaërobiern günstige Gelegenheit zum Anwachsen, weshalb es von Wichtigkeit zu sein scheint, hervorzuheben, dass eine Verflüssigung desselben noch nicht auf das ausschliessliche Vorhandensein des Bacillus putrificus hindeutet. Wenn auch aus der Raschheit des Einschmelzens des starren Coagulums mit

Wahrscheinlichkeit geschlossen werden kann, dass der Bienstock'sche Bacillus zur Vegetation gekommen sei, so ist es doch, wie seiner Zeit bereits betont wurde, unbedingt nöthig, erst Plattenculturen daraus anzulegen zur Isolirung der Keime. Zur Bestimmung der anaëroben Bakterienarten dienen dann die charakteristischen Formen der Plattencolonieen auf Agar und Zuckeragar sowie Gelatine, das Verhalten gegenüber zuckerarmen und zuckerreichen Nährböden, sowie die Krankheiterscheinungen, die eventuell durch Injectionen von Reinculturen bei Versuchsthieren entstehen. Das Vorhandensein von Uebergangsformen erschwert jedoch vielfach die Bestimmung einer vorliegenden Cultur und deren Anreihung an eine bestimmte Type.

II.

Die Prüfung normaler menschlicher Fäces auf ihren Gehalt an fäulnisserregenden Bakterien aus der Gruppe der streng anaërobisch wachsenden Buttersäurebacillen hat zu der Erkenntniss geführt, dass diese Keime in wechselnder Menge im Darminhalte von Säuglingen und Erwachsenen anzutreffen seien. Ausser den genannten Mikroorganismen existiren im menschlichen Darne gewiss noch andere, der Gruppe der Buttersäurebacillen ferne stehende anaërobe Bakterienarten, denen die Fähigkeit, Eiweissstoffe weithin aufzubauen, zukommt. Es sei hier nur der fünf nicht als Buttersäurebacillen anzusprechenden Bakterienculturen von Rodella gedacht, unter denen sich ein Stamm befand, der Gelatine und Milch unter Bildung von Fäulnisgasen rasch peptonisirte. Neben diesen mehr oder weniger bekannten Anaërobiern beherbergt der Darm noch eine Reihe von proteolytisch wirkenden Keimen, darunter jene sporenbildenden, auf unseren Nährböden aërobisch und facultativ anaërobisch wachsenden Bakterien, mit denen uns Flügge in seinen Arbeiten über die Sterilisation der Milch bekannt gemacht hat. Die Dauerformen derselben bleiben selbst bei Stunden lang währender Hitzeeinwirkung entwicklungsfähig, sie gelangen mit der Milch in den Intestinaltract des Flaschenkindes, aus dessen Fäces sie Spiegelberg regelmässig cultiviren konnte, mit den verschiedenen rohen und gekochten Speisen wurden sie in den Darm des Erwachsenen eingeführt.

Die Vorstellungen über die Bedeutung aller dieser im Darmcanale des Menschen vegetirenden proteolytischen sowie der Kohlehydrate vergärenden Mikroorganismen haben mehrfache Wandlungen erfahren. Während in der vorbakteriologischen und in der Zeit der ersten Anfänge der Bakteriologie das Studium der physiologischen Verdauungsvorgänge mit der Kenntniss der Wirkungen der Verdauungsdrüsenfermente ab-

geschlossen war, räumt man heute den Bakterien eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung der Nahrungsstoffe ein. Ein Theil der Autoren erblickt in denselben Hilfskräfte zur Unterstützung der verdauenden Drüsensaft, die Ansichten anderer gehen aber weiter, sie sehen in der Mitwirkung der Mikroorganismen bei der Verdauung einen unentbehrlichen lebenswichtigen Factor. Die bekannten Versuche von Schottelius und Frau O. Metschnikoff sind geeignet, diese Anschauung zu stützen, während die Ergebnisse der Experimente Nutall's und Thierfelder's, deren keimfrei gehaltene Meerschweinchen geringere Gewichtszunahme aufwiesen als die Controlthiere, die Auslegung zulassen, dass die Thätigkeit der Bakterien im Intestinaltracte als eine unterstützende Componente bei der Verdauung aufzufassen sei.

Neben der seinerzeitigen Unterschätzung der Spaltpilze für die Physiologie der Verdauung, welche durch die Unkenntniss der den Bakterien innewohnenden fermentativen Kräfte bedingt war, und den besprochenen Ansichten über ihren diesbezüglichen Werth, steht die jüngst geäußerte Theorie E. Metschnikoff's, dass die den Dickdarm bewohnenden Mikroorganismen constant Gifte produzieren, durch deren fortdauernden Uebergang in den Organismus Arteriosklerose und andere Erscheinungen der Altersschwäche hervorgerufen werden. Seine Schlüsse basiren auf vergleichenden Untersuchungen betreffs der durchschnittlichen Altersgrenze der Lebewesen und der Länge des ihnen von der Natur mitgegebenen Dickdarmes, die beide zueinander in umgekehrter Proportion stehen. Den Ausführungen E. Metschnikoff's, dass der Dickdarm beim Menschen ein überflüssiges Organ darstellt, begegnet Strassburger mit den Worten, „dass es besser sei, einige Jahre weniger zu leben, als einem Kranken zu gleichen, der mit chronischer Diarrhöe behaftet ist.“ In den unteren Partien des Darmtractes wird der bis dahin noch flüssige Speisebrei durch Resorption erst eingedickt, hier bewirken die wegen ihrer Giftbildung von Metschnikoff gefürchteten Bakterien wohl noch eine nutzbringende Auswerthung der Nahrungsreste, sowohl der Kohlehydrate als auch der Eiweisssubstanzen.

Die proteolytischen Bakterienarten sind nach Neumeister im Stande, coagulirte Eiweisskörper, die der Lösung durch die Verdauungssäfte entgangen sind, wieder in den flüssigen Zustand überzuführen, wodurch die Resorption derselben ermöglicht wird, weiters sie in Albumosen und Peptone zu spalten, welche die Epithelien der Darmwand aufnehmen und in natives Eiweiss umgewandelt dem Organismus abgeben. So lange ihre Spaltungsproducte nicht über die Stufe der Albumose und des Peptons hinaus gehen, arbeiten diese Mikroorganismen im Interesse ihres Trägers, durch die weitere Zerlegung des Eiweissmoleküles entziehen sie aber dem

Körper Nährmaterial. Die Lösung und den Abbau der Proteinstoffe bewerkstelligen die Bakterien in erster Linie durch Absonderung eines Enzymes, welches in seinen chemischen Wirkungen dem Trypsin ähnlich ist. Es schien nun aus noch näher zu erörternden Gründen von Interesse zu sein, den eventuellen Einfluss, den ein derartiges Bakterienenzym auf die spezifischen Stoffe der Eiweisssubstanzen auszuüben vermag, kennen zu lernen.

Aus den Arbeiten von Tchistovitsch, Bordet, Wassermann und Schütze wissen wir, dass nach Injectionen von Blutserum, Milch, Eiereiweiss verschiedener Herkunft das Serum der Versuchsthiere die Fähigkeit erlangt, spezifisch auf das zur Vorbehandlung verwendete Eiweiss einer Thierart zu wirken, in dem z. B. das Blutserum eines mit Kuhmilch behandelten Kaninchens am intensivsten die Eiweisskörper der Kuhmilch, schwächer und erst nach langdauernder Vorbehandlung die der Ziegenmilch (Moro) fällt. Die durch die Pepsinsalzsäureverdauung aus den verschiedenen Eiweissstoffen gebildeten Abbauprodukte werden jedoch von einem durch Injection des entsprechenden Ausgangsmateriales erzeugten Immunserum nicht mehr gefällt, sie sind auch nicht mehr im Stande, ein präcipitinhaltiges Serum auszulösen, wie aus den übereinstimmenden Resultaten der Versuche von Obermeyer u. E. P. Pick, L. Michaelis und P. Th. Müller hervorgeht. Die tryptischen Spaltungsproducte zeigen verschiedenes Verhalten; während die aus dem Casein der Kuhmilch gelieferten Albumosen und Peptone die präcipitirende und präcipitinogene Substanz eingebüsst haben (P. Th. Müller), rufen nach Obermeyer und Pick die analogen Derivate des Blutserums und Eiereiweisses noch Immunsera hervor, von beiden auch noch eine Verdauungsflüssigkeit, die keine Biuretreaction mehr giebt. Die beiden Autoren stellten fest, dass durch physikalische Eingriffe z. B. Kochen die präcipitinogenen Stoffe des nativen Blutserums in der Weise verändert werden, dass Injectionen dieses gekochten Blutserums ein Immunserum liefern, welches in erster Linie auf das gekochte Serum fallend wirkt. Dieselben Vorgänge spielen sich ab, wenn durch chemische oder fermentative Einflüsse z. B. durch das Trypsinferment die Proteinstoffe des Blutserums verändert werden; eine kurz dauernde Vorbehandlung der Versuchsthiere mit einer Trypsinverdauungsflüssigkeit ruft ein Immunserum hervor, welches nur auf das in der Verdauungsflüssigkeit am reichlichsten vorhandene Abbauprodukt wirkt, während weiter fortgesetzte Injectionen Sera mit grösserer Reactionsbreite erzeugen. Das Ferment der Magendrüsen sowie das der Bauchspeicheldrüse vollbringt demnach neben den rein verdauenden Leistungen noch eine weitere Veränderung des Nahrungseiweisses, indem ersteres schon nach kurzer Einwirkung bei allen genannten Eiweissarten diejenigen

Merkmale zu beeinflussen vermag, welche ihnen das Gepräge der Artfremdheit geben; Pankreasferment jedoch nur das Casein der Milch in derselben Weise zu verändern im Stande ist.

Nach den Anschauungen von Hamburger, L. Michaelis und C. Oppenheimer, Wassermann, Schlossmann und Moro über das Wesen der Assimilation sind diese Vorgänge von grösster Wichtigkeit, indem Eiweiss erst dann zum Ersatze und Aufbaue der Körpersubstanz verwendet werden kann, wenn aus artfremdem homologes gebildet worden ist; vor allem müsse diese Denaturierung der Eiweisssubstanz durch die Verdauungssäfte stattfinden, worauf die dann indifferenten Stoffe in den Epithelzellen des Darmes in arteigene umgewandelt werden und im Organismus Verwerthung finden. Dass diese weitere Umwandlung sich in der Darmwand vollzieht, geht aus den Befunden Hamburger's und Moro's hervor, welche im Blutserum künstlich ernährter Säuglinge niemals mit Lactoserum fällbare Stoffe fanden. Die Untersuchungen von Obermeyer und Pick bestätigen dies, sie ergaben, dass im Portalvenenblute von in der Verdauung getödteten Hunden auch durch Immunsere, welche auf Trypsinverdauungsproducte reagiren, keine Niederschläge hervorgerufen werden, dass also „Körper, welche die biologische Reaction liefern, überhaupt nicht oder nicht in erheblichem Maasse die Darmwand passiren.“ — Würde Eiweiss, das sich nach der biologischen Reaction als artfremdes erweist zur Resorption kommen, so würde es ebenso wie auf subcutanem oder intraperitonealem Wege einverleibtes nicht nur nicht nutzbringend sein, sondern wie ein Gift wirken, auf das der Organismus mit Bildung von Antikörpern antworten würde. Diese Transformation des Nahrungseiweisses, schliesst Hamburger weiter, bürdet dem mit Kuhmilch ernährten Säuglinge eine Mehrleistung in seinem Stoffwechsel auf gegenüber dem Brustkinde, welches das ihm zugeführte Casein keiner derartigen Umwandlung zu unterwerfen braucht und bedingt das Zurückbleiben im Gedeihen mancher Flaschenkinder hinter den natürlich ernährten bei gleichem Calorienwerthe der Nahrung (Rubner's und Heubner's Versuche); die Misserfolge bei rationell geleiteter künstlicher Ernährung beruhen auf dem individuellen Unvermögen des kindlichen Verdauungsapparates, diese Assimilation des artfremden Caseins zu bewerkstelligen.

Es handelte sich nun um die Frage, ob die Enzyme der eiweiss-spaltenden Bakterien einen Einfluss auf die specifischen Stoffe des Kuhmilchcaseins auszuüben vermögen, ob denselben allenfalls eine ähnliche Wirkung zukomme, wie den Fermenten der Verdauungsdrüsen, wodurch sie einen Werth in der Physiologie der Verdauungsvorgänge gewinnen würden.

Um den Einfluss von proteolytischen Bakterienenzymen auf die specifischen Stoffe des Kuhmilchcaseins prüfen zu können, schienen Culturen des *Bacillus putrificus* wegen ihres völligen Mangels an Pathogenität gegenüber den Versuchsthieren geeignete Objecte zu sein. Sterilisierte Milch wurde unter streng anaëroben Verhältnissen geimpft und in den Brutschrank bei 37° C. eingestellt, das Bakterienwachsthum dann nach verschiedenen Zeiträumen durch Toluolzusatz und Einstellen in Eis unterbrochen, wodurch auch ein Fortschreiten der Peptonisirung hintangehalten wurde. Der Nährboden war nach länger dauernder Vegetation in eine hellbraune Serumschicht und in eine lockere, staubige, den Boden des Kolbens bedeckende, leicht aufwirbelbare Masse verwandelt, während nach kurz dauernder Cultivirung nur eine schmale oberflächliche Serumzone über der etwas braun gefärbten Milchsicht zu sehen war. Mit Culturen verschiedenen Alters wurden Kaninchen vorbehandelt, indem ihnen in 3 bis 5 täglichen Intervallen je 20 bis 30 ^{cem} injicirt wurden, 6 bis 8 Tage nach der letzten Injection erfolgte die Blutentnahme. Die Versuche wurden dann in der Weise angestellt, dass sterilisirte Milch bzw. die zu untersuchenden Culturfiltrate in abgestuften Mengen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ^{cem} Flüssigkeitsvolumen verdünnt und mit dem Kaninchenserum (gewöhnlich 1 ^{cem}) versetzt wurden; nach 6 bis 8 stündigem Aufenthalte im Thermostaten bei 37° C. wurde der Ausfall der Reaction beurtheilt. Bei zweifelhaften oder negativen Resultaten wurde der Versuch zur Controle in der Weise wiederholt, dass statt der Kochsalzlösung verdünnte Chlorcalciumlösung verwendet wurde.

Protokollauszug.

Kaninchen I und II erhalten je fünf Injectionen à 20 ^{cem} des Filtrates (zwei Mal durch vierfaches Papierfilter filtrirt) einer 3 Wochen alten Cultur des *Bacillus putrificus* in sterilisirter Milch. Das schwach alkalisch reagierende Filtrat bleibt beim Neutralisiren klar. Ferrocyanalkali-Essigsäure sowie concentrirte Salpetersäure ruft eine Trübung hervor, die sich bereits bei gelindem Erwärmen löst, nach Aussalzen der Albumosen mit Ammonsulfat zeigt die Biuretreaction starke Rothfärbung der Flüssigkeit.

Die Prüfung der Sera ergab:

Sterilisirte Milch — Kaninchenserum I und II.

0.01	sterilisirte Milch	1 ^{cem}	Serum	Kan. I	oder Kan. II	
0.05	"	1 "	"	"	I "	II } keine
0.1	"	1 "	"	"	I "	II } Fällung.
0.1	"	2 "	"	"	I "	II }

Culturfiltrat — Lactoserum (von dem 0.3^{cem}—0.01^{cem} sterilisirte Milch complet fallen)

2.0	Filtrat	1 ^{cem}	Lactoserum	} keine Fällung
1.0	"	1	"	
0.5	"	1	"	
0.1	"	1	"	
0.01	"	1	"	

Culturfiltrat — Serum Kaninchen I und Kaninchen II.

1.0	Filtrat	1 ^{cem}	Serum Kan. I oder Kan. II	} keine Fällung.
0.5	"	1	" " " I " " II	
0.1	"	1	" " " I " " II	
0.05	"	1	" " " I " " II	
0.01	"	1	" " " I " " II	

Kaninchen II wird weiter behandelt, so dass es im Ganzen 200^{cem} Culturfiltrat erhält, die Prüfung seines Serums ergibt auch dann dieselben Resultate.

Aus dem Versuche ergibt sich, dass in dem Filtrate der drei Wochen alten Cultur keine präcipitinogenen Stoffe enthalten sind, durch deren Injection Sera auf sterilisirte Milch oder ihre Abbauproducte gebildet würden, sowie dass auch bei Zusatz von Lactoserum kein Präcipitat entsteht.

Um nun zu erfahren, in welchem Zeitraume die Thätigkeit des Bacteriums im Stande sei, diese Veränderungen hervorzurufen, wurden jüngere Culturen untersucht. Es stellten sich hier Schwankungen in den Ergebnissen heraus, welche wohl nur durch das nicht gleichmässig intensive Gedeihen des Bacteriums zu erklären sind.

So ergab die Untersuchung des Filtrates einer 4 tägigen Cultur, dass die specifischen Substanzen ebensolche Veränderungen erlitten hatten, wie sie die früher besprochene 3 wöchentliche aufwies, d. h. es fehlte das Fällungsvermögen der Eiweisskörper durch Lactoserum und die Fähigkeit ein Immunserum auszulösen, obwohl hierin noch mit Essigsäure fällbares Eiweiss nachweisbar war.

Protokollauszug.

Ein 1-Literkolben sterilisirter Milch wird mit 10^{cem} einer gut wachsenden Milhcultur des *Bacillus putrificus* geimpft; nach viertägigem Wachsthum zeigt die Cultur eine drei Viertel der Flasche einnehmende braune Serumschicht. Das klare Filtrat (Filtrierpapier) giebt mit Essigsäure in der Kälte flockigen Niederschlag, welcher beim Erwärmen bestehen bleibt, Ferrocyankali-Essigsäure und Probe nach Jolles stark positiv, Biuretreaction positiv. Kaninchen V erhält 120^{cem} des Filtrates der Cultur subcutan injicirt.

Die Prüfung des Serums. ergab:

Sterilisirte Milch — Serum Kaninchen V.

0.01	sterilisirte Milch	0.5 ^{cem}	Serum Kan. V	} keine Fällung.
0.01	"	1.0	" " " V	
0.01	"	2.0	" " " V	

Culturfiltrat — Lactoserum (von dem 0.4^{cem} — 0.01^{cem} complet fallen.

1.0	Culturfiltrat	1 ^{cem}	Lactoserum	} keine Fällung.
0.5	"	1	"	
0.1	"	1	"	
0.05	"	1	"	
0.01	"	1	"	

Culturfiltrat — Serum Kaninchen V.

1.0	Culturfiltrat	1 ^{cem}	Serum Kan.	V	} keine Fällung.
0.5	"	1	"	V	
0.1	"	1	"	V	
0.05	"	1	"	V	
0.01	"	1	"	V	

Im Gegensatz zu diesem Befunde ergab die Untersuchung einer 7 tägigen Cultur desselben Putrificusstammes, dass noch mit Lactoserum fällbares Eiweiss vorhanden war; die Vorbehandlung eines Kaninchens rief ein Serum hervor, welches mit Casein der sterilisirten Milch wie auch mit den im Filtrate dieser Cultur enthaltenen Eiweissstoffen Präcipitate bildete.

Diese Unregelmässigkeit der Befunde konnte dadurch vermieden werden, dass statt der Culturen das bakterienfreie fermenthaltige Filtrat derselben, welches zur sterilisirten Milch zugesetzt das Casein peptonisirte, in Verwendung gezogen wurde. Durch fortlaufende Ueberimpfungen auf Milch war das Wachsthum des aus Fäces isolirten Putrificusstammes derart gefördert worden, dass die früher langsam fortschreitenden Peptonisirungsvorgänge sich nunmehr in augenfälliger Weise rasch abspielten. Bereits nach 36 bis 48 Stunden war die Milch zum grössten Theile in eine gelbliche Flüssigkeit verwandelt, in der spärliche Gerinnsel schwammen, die Gasentwicklung war eine sehr intensive im Gegensatz zu den früheren Culturen, bei denen es niemals zu so stürmischen Gährungs- und Fäulnisprocessen gekommen war. Die Pukallfiltrate derartiger 48 Stunden alten Culturen enthielten gegenüber Casein und anderen Eiweissstoffen kräftig wirksame Fermente, Injectionen derselben lösten kein Immunserum aus.

Es erwies sich das Arbeiten mit diesen Filtraten von jungen Culturen noch aus einem anderen Grunde als zweckdienlich, indem dadurch diejenigen Stoffe, welche aus den Bakterien in den Nährboden übergehen können und nach deren Injectionen Sera mit präcipitirendem Vermögen (Kraus'sche Bakterienpräcipitine) entstehen, ausgeschlossen werden konnten. Bei dem zu den Experimenten verwendeten aus Fäces cultivirten Stamm des *Bacillus putrificus* zeigte es sich, dass diese Substanzen erst spät in den Milchculturen entwickelt sind. Eine einschlägige Versuchsreihe stellte fest, dass mit einem durch Injectionen von Agarculturen hergestellten, im Werthe von 1 : 500 agglutinirendem Serum nur in Filtraten älterer Culturen Präcipitate erzeugt werden; Pukallfiltrate von 4, 15, 19, 23 tägigen Milchculturen wiesen keine Fällungen auf, während z. B. bei 50 tägigen, 11 Monate alten Culturfiltraten

Niederschläge entstanden. Ob für diese Erscheinung das specielle Verhalten der Bakterienart oder eine Eigenthümlichkeit dieses Stammes, der Milchnährboden, die Temperaturgrade der Züchtung verantwortlich zu machen sind, wäre noch zu eruiren; bei dem hervorstechenden Vermögen dieses Keimes Eiweissstoffe zu destruiren, könnte auch daran gedacht werden, dass diese von den Mikroorganismen abgesonderten Stoffe durch das gleichzeitig producirte Enzym bis zu einem gewissen Grade wieder verändert werden.

Mehrere Kolben eines Gemisches von sterilisirter Milch und dem Pukallfiltrate einer 48 stündigen *Putrificus*milchcultur zu gleichen Theilen werden in den Brutschrank bei 37° C. eingestellt. Einige Stunden darnach zeigen dieselben eine flockige Gerinnung der Milch, welche durch die Wirkung eines laabartigen Fermentes hervorgerufen wird, dessen Bildung diesem Anaërobie ebenso wie vielen anderen peptonisirenden Bakterienarten zukommt. Nach 14 stündigem Verweilen ist die Hälfte des Kolbens in eine klare Serumzone und in eine darunter liegende milchig gefärbte Schicht getheilt, im Filtrate (Filtrirpapier) giebt Essigsäurezusatz reichlichen Niederschlag, der bei Erhitzen bestehen bleibt, dasselbe giebt positive Biuretreaction. Ein zweiter Kolben wird nach 30 Stunden entnommen, aus dem Filtrate dieses fallen bei Zusatz von verdünnter Essigsäure spärliche feinflockige Niederschläge aus. In einem dritten Kolben, der 60 Stunden der Brüttemperatur ausgesetzt war, sind die äusserlichen Veränderungen derart fortgeschritten, dass nur mehr ein geringer Bodensatz zu beobachten ist, das Filtrat giebt mit Essigsäure keine Fällung, Ferrocyanalkali-Essigsäure ruft nur mehr Trübung hervor, Salpetersäure zugesetzt bewirkt Trübung, welche sich bei Erwärmen löst, nach Aussalzen der Albumosen weist die Biuretreaction intensive Rothfärbung auf. Im Filtrate eines 6 tägigen Kolbens, der unter einer Fettschicht klare Flüssigkeit und sehr geringen Bodensatz zeigt, sind Albumosen und Peptone nachzuweisen. Nach den genannten Intervallen werden die Kolben dem Brutschranke entnommen, kurze Zeit der Hitze des strömenden Dampfes ausgesetzt, dann in Eis conservirt und die Vorbehandlung von Kaninchen durch subcutane Injectionen dieser Verdauungsflüssigkeiten eingeleitet.

Protokollauszug.

A. Kaninchen XIV. wird mit dem 14 stündigen Gemische von sterilisirter Milch und Pukallfiltrat behandelt, erhält im Ganzen 110 ccm. Aderlass 6 Tage nach der letzten Injection.

Filtrat des Gemisches (14^h) — Lactoserum (von dem 0.3 ccm—0.01 ccm sterilisirte Milch complet fällen).

0.01 Filtrat	1.0 ccm	Lactoserum	} keine Fällung.
0.05 "	1.0 "	"	
0.1 "	1.0 "	"	
0.5 "	1.0 "	"	

Sterilisirte Milch — Serum Kaninchen XIV.

0.01	sterilisirte Milch	0.2	Serum Kan.	XIV	} keine Fällung.
0.01	"	"	0.5	"	
0.01	"	"	1.0	"	
0.01	"	"	2.0	"	

Filtrat des Gemisches — Serum Kaninchen XIV.

0.01	Filtrat	1 ^{ccm}	Serum Kan.	XIV	Spur von Trübung,
0.05	"	1	"	"	XIV Fällung,
0.1	"	1	"	"	XIV Fällung,
0.5	"	1	"	"	XIV 0

B. Kaninchen XV wird mit 30 stündigem Gemisch von sterilisirter Milch und dem Pukallfiltrate injicirt, erhält im Ganzen 160^{ccm}.

Filtrat des Gemisches (30^h) — Lactoserum (wie oben).

0.01	Filtrat	1 ^{ccm}	Lactoserum	} keine Fällung.
0.05	"	1	"	
0.1	"	1	"	
0.3	"	1	"	
0.5	"	1	"	
1.0	"	1	"	

Filtrat des Gemisches (30^h) — Serum Kaninchen XV.

0.01	Filtrat	1 ^{ccm}	Serum Kan.	XV	} keine Fällung.
0.05	"	1	"	"	
0.1	"	1	"	"	
0.3	"	1	"	"	
0.5	"	1	"	"	
1.0	"	1	"	"	

C. Kaninchen XVI und XVII werden mit 60 stünd. bzw. 6 tägigem Gemisch injicirt. Beide Thiere erhalten je 180^{ccm}.

Filtrat der Gemische — Lactoserum (wie oben).

0.01	Filtrat	1 ^{ccm}	Lactoserum	} keine Fällung.
0.1	"	1	"	
0.5	"	1	"	
1.0	"	1	"	
2.0	"	1	"	

Filtrat der Gemische — Serum Kaninchen XVI und XVII.

0.01	Filtrat	1 ^{ccm}	Kan.	XVI bzw.	XVII	} keine Fällung.
0.05	"	1	"	XVI	"	
0.5	"	1	"	XVI	"	
1.0	"	1	"	XVI	"	

Der letzt. angegebene Versuch mit dem Inhalte des 6 tägigen Kolbens wurde in der Weise wiederholt, dass das Filtrat desselben zugleich mit sterilisirter Milch Kaninchen subcutan einverleibt wurde. Dies geschah

in Anlehnung an die Experimente von Obermeyer und Pick, welche mit den Abbauprodukten der Trypsinverdauung aus Blutserum noch auf diese fällend wirkende Sera hervorrufen konnten, wenn sie die Verdauungsflüssigkeit zugleich mit unverändertem Serum injicirten.¹ Auch bei dieser Anordnung wurden im Blutserum des vorbehandelten Kaninchens keine Präcipitine auf die durch das Ferment des fäulnisserregenden Anaerobiers entstandenen Abbauprodukte gebildet, wohl aber gewann das Serum fällende Eigenschaften auf Milch.

Kaninchen XX. erhält bei den einzelnen Injectionen $\frac{1}{3}$ sterilisirte Milch und $\frac{2}{3}$ des Filtrates des 6 tägigen Kolbens, im Ganzen 200^{com} Flüssigkeit.

Filtrat des 6 tägigen Kolbens — Kaninchen XX.

0.01 Filtrat	1 ^{com}	Serum Kan.	XX	keine Fällung.
0.05 "	1 "	" "	XX	
0.1 "	1 "	" "	XX	
0.5 "	1 "	" "	XX	
1.0 "	1 "	" "	XX	

Sterilisirte Milch — Serum Kaninchen XX.

0.01 sterilisirte Milch 0.4^{com} Serum Kaninchen XX, Fällung.

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, dass das Ferment des anaeroben fäulnisserregenden Buttersäurebacillus die präcipitirende und die präcipitinogene Substanz des Caseins der Kuhmilch beeinflusst. Durch eine kurz dauernde Einwirkung erfahren diese Stoffe eine Veränderung, welche sich darin ausdrückt, dass Lactoserum das in der fermentirten Milch vorhandene Eiweiss nicht mehr beeinflusst, Injectionen dieser Flüssigkeit kein Lactoserum, jedoch noch ein präcipitinhaltiges Serum auslösen. Diese Umwandlung der Reactionen ist auf das Ferment zurückzuführen, da Gemische von Milch und dem Filtrate von Putrificusculturen, in welchen die Enzyme durch Erhitzen vernichtet worden sind, sich ebenso verhalten, wie sterilisirte Milch. Die Entscheidung, ob dieser Eiweisskörper Paracasein ist, für dessen präcipitirende Substanz P. Th. Müller ein insoweit ähnliches Verhältniss (Paracasein bindet das Präcipitin des Paracaseinserums, nicht aber das des Lactoserums) nachwies, muss derzeit offen gelassen werden. Würde derselbe sich als Paracasein herausstellen, so müsste man annehmen, dass das Ferment zuerst die präcipitinogenen Stoffe des Caseins vernichtet hat, während die davon differenten immunisirenden Substanzen des Para-

¹ Vor der Publication ihrer Arbeit: „Beiträge zur Kenntniss der Präcipitationsbildung“ (*Wiener klin. Wochenschrift*, 1904, Nr. 10) hatten die HHr. Doc. Obermeyer und E. P. Pick die Freundlichkeit, mir von ihrer Versuchsanordnung Mittheilung zu machen, wofür ich ihnen meinen Dank ausspreche.

caseins noch erhalten bleiben. Nach längerer Einwirkungsdauer hat die Verdauungsflüssigkeit trotz der Anwesenheit geringer Mengen dieser Eiweisssubstanz, welche dem Casein nahesteht, durch Kälberlab aber nicht mehr gefällt werden kann, die Fähigkeit eingebüsst, spezifische Sera auszulösen. Den eigentlichen Stufen des fermentativen Caseinabbaues fehlt die präcipitinogene Substanz, damit vorbehandelte Kaninchen geben kein Immunserum. Demnach ist das von dem Anaërobier erzeugte Enzym hinsichtlich seiner Wirkung auf die spezifischen Stoffe des Kuhmilch-caseins den Fermenten der Verdauungsdrüsen an die Seite zu stellen, die gebildeten Albumosen und Peptone haben die präcipitirende und die präcipitinogene Substanz verloren.

Dieselben Resultate wurden wiederholt erhoben, in jeder Versuchsreihe trat zuerst ein Eiweisskörper in dem Gemische von sterilisirter Milch und Putrificusferment auf, der ein nur auf sich wirkendes Serum auflöste; nach längerer Einwirkung des Fermentes war die Fähigkeit der Verdauungsflüssigkeit, ein Immunserum hervorzurufen, geschwunden. Zwischen den Resultaten der Versuche, in welchen durch Hitzeeinwirkung die weitere Thätigkeit des Fermentes ausgeschaltet wurde und jenen, in welchen Einstellen in niedere Temperaturen das Fortschreiten der Peptonisirung während der Zeit der Injectionsbehandlung aufhielt, war kein Unterschied zu ersehen.

Bevor aus diesem Resultate Schlüsse gezogen werden, ist es nötig zu erwägen, dass die angeführten Experimente mit einem Bacterium angestellt wurden, dem die Fähigkeit zukommt, rasch die tiefgreifendsten Eiweisspaltungen zu bewirken. Daraus ergibt sich wohl die Frage, ob auch andere proteolytische Keime, welche ebenfalls in vitro Casein in Albumosen und Peptone umwandeln, die besprochenen Einwirkungen ausüben können. Die Untersuchungen von Schattenfroh über die lysogenen Substanzen des Harnes legen diese Ueberlegungen nahe, da aus ihnen hervorgeht, dass das im Harn spontan eintretende Bakterienwachsthum, welches keine weitgehenden Zersetzungen desselben bewirkt, diese Stoffe nicht vernichtet, während dieselben durch Einleitung einer Harnstoffgährung zerstört werden. Da aber die auf unseren Nährböden aërobisch und facultativ anaërobisch wachsenden Proteolyten einen Stoffwechsel besitzen, der dem des Fäulnisserregers hinsichtlich der gebildeten Albumosen und Peptone analog ist, dürfte es sich wohl nur um graduelle Unterschiede in der Raschheit der Vernichtung der spezifischen Stoffe handeln.

Vom theoretischen Standpunkte aus betrachtet, könnte demnach die Thätigkeit der proteolytisch wirkenden Keime dem mit Kuhmilch genährten Säuglinge in zweierlei Weise von Nutzen sein, erstens indem Caseinreste, welche den Verdauungsdrüsenfermenten entgangen sind oder bei Insufficienz

der oberen Darmpartien unverändert in die unteren Theile des Intestinaltractes übergeführt wurden, noch aufgeschlossen werden, zweitens dadurch, dass gleichzeitig die specifischen Stoffe derselben vernichtet werden, wodurch das körperfremde Eiweiss nach Hamburger u. A. für seine Umwandlung in arteigenes vorbereitet wird.

In Wirklichkeit dürfte aber der Nutzeffect, der aus den durch die Bakterienfermente gebildeten und der Artmerkmale entkleideten Albumosen und Peptonen des Kuhmilchcaseins dem Flaschenkinde erwächst, quantitativ ein geringer sein. Dieser niedrig zu veranschlagende Werth wird noch dadurch eingeschränkt, dass diese Keime auch die durch die Verdauungsdrüsenfermente geschaffenen und von der Darmwand noch nicht aufgenommenen Albumosen und Peptone angreifen und weiter zerlegen, wodurch sie dem Körper vielleicht mehr Nährmaterial entziehen als sie selbst aus den Caseinresten zu bilden im Stande sind.

Finden schon normaler Weise im Darne des Säuglings Fäulnisprocesse statt, wie aus Winternitz', Uffelmann's und Blauberg's Untersuchungen hervorgeht, so könnte eine Steigerung derselben zur Bildung grösserer Mengen nicht unschädlicher Abbauproducte des Nahrungseiweisses führen. Dies könnte eintreten, wenn die Elimination der Dickdarmcontenta durch träge Peristaltik gehemmt wird, wodurch auch den giftbildenden Arten unter den proteolytischen Bakterien Zeit zu üppiger Vegetation geboten ist. Solche Keime, die bei ihrem Wachsthum auf Milch endotoxische Substanzen produciren, haben uns die Arbeiten Lübbert's kennen gelehrt, während die pathogene Wirkung der fäulniserregenden Proteusarten aus Brudzinski's Untersuchungen hervorgeht. Ob die darmbewohnenden Anaerobier Gifte bilden, werden weitere Studien aufklären.

Nachtrag zur Correctur.

D. Gerhardt bespricht in seiner nach Abschluss obiger Publikation in den „Ergebnissen der Physiologie“ 1904 erschienenen Abhandlung: „Ueber Darmfäulnis“ die Entstehung von Indol und Skatol; er äussert sich dahin, dass diese beiden Stoffe bei dem durch Reinculturen von anaeroben Fäulnisserregern hervorgerufenen Eiweissabbau nicht gebildet werden könnten, dass sie erst durch die Thätigkeit „nicht sauerstofffeindlicher Keime“ aus den Eiweissabbauprodukten der Anaerobier entstünden. Diese Ansicht D. Gerhardt's wird auch von anderen Autoren getheilt und angeführt, so z. B. von Hammarsten¹ und von W. Ruppel.² Die

¹ *Lehrbuch der physiologischen Chemie.* 1899.

² *Beiträge zur experimentellen Therapie.* 1900. Hft. 4.

Grundlage dieses allgemein angenommenen Satzes bilden die Analysen von Nencki, Kerry, Zoya und Bienstock, welche in Culturen verschiedener anaërober Keime Indol vermissten. In Anbetracht des Interesses, welches dieser Angabe für die Lehre der Darmfäulniss zukommt, halte ich es für wichtig zu bemerken, dass streng anaërobisch wachsende Fäulnissbakterien in ihren Reinculturen Indol zu bilden vermögen. Specieell die fäulnisserregende Wuchsform des Gasphegmonebacillus (ein constanter Darmbewohner, siehe oben) entwickelt in ihren Reinculturen auf Blutserum reichlich Indol. Ein Einblick in die neuere bakteriologische Literatur ergibt übrigens, dass meine Befunde bezüglich der Indolbildung durch streng anaërobe Keime nicht vereinzelt dastehen.

Litteratur-Verzeichniss.

- Achalme, P., Quelques bacilles anaérobies et leur différenciation. *Annales de l'Institut Pasteur*. September 1902.
- Bienstock, *Archiv für Hygiene*. Bd. XXXVI u. XXXIX.
- Blauberg, M., *Experimentelle und kritische Studien über Säuglingsfäces bei natürlicher und künstlicher Ernährung*. Berlin 1897.
- Blumenthal, *Virchow's Archiv*. 1896.
- Brudzinsky, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*. Bd. LII. S. 469.
- Escherich, a. a. O. und Ueber Darmbakterien im Allgemeinen und diejenigen der Säuglinge im Besonderen, sowie die Beziehungen der letzteren zur Aetiologie der Darmerkrankungen. *Centralblatt für Bakteriologie*. 1887.
- Flügge, *Diese Zeitschrift*. Bd. XVII.
- Fränkel, E., Ueber Gasphegmonen, 1893 und Lubarsch u. Ostertag, 1902.
- Grassberger und Schattenfroh, Ueber Buttersäuregährung. *Archiv für Hygiene*. Bd. XXXVII, XLII, XLIII — *Münchener med. Wochenschrift*. 1902. Nr. 38.
- Hamburger, F., *Arteigenheit und Assimilation*. 1903 u. s. w.
- Hitschmann und Lindenthal, *Sitzungsberichte der K. Akad. der Wissenschaften*. 1901. Bd. CX. III.
- Hirschler, *Zeitschrift für physiolog. Chemie*. 1888.
- Lübbert, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXII.
- Macé, *Traité de Bacteriologie*. 1903.
- Metschnikoff, O., *Annales de l'Institut Pasteur*. 1901.
- Metschnikoff, E., *Studien über die Natur des Menschen*. 1904.
- Michaelis, L., *Deutsche med. Wochenschrift*. 1902.
- Michaelis und Oppenheimer, *Engelmann's Archiv*. 1902.
- Moro, E., *Wiener klin. Wochenschrift*. 1901. S. 1076. — *Archiv de médecine des enfants*. 1903 u. s. w.
- Müller, P. Th., *Centralblatt f. Bakteriolog.* 1902. — *Archiv f. Hygiene*. 1902.
- Neumeister, R., *Lehrbuch der physiol. Chemie*. 1897.
- Nuttal und Thierfelder, *Zeitschrift für physiol. Chemie*. Bd. XXI u. XXII.
- Obermeyer und Pick, *Wiener klin. Rundschau*. 1902. — *Wiener klin. Wochenschrift*. 1904.
- Passini, F., *Verhandlungen der Gesellschaft für Kinderheilkunde*. Karlsbad, September 1902. — *Münchener med. Wochenschrift*. 1904. Nr. 29.
- Rodella, A., *Diese Zeitschrift*. Bd. XXXIX u. XLII.
- Rovighi, *Zeitschrift für physiol. Chemie*. Bd. XVI.
- Rubner und Heubner, *Zeitschrift für Biologie*. Bd. XXXVI u. XXXIX.

160 FRITZ PASSINI: ÜBER FÄULNISERREGENDE ANAEROBE BAKTERIEN.

- Schattenfroh, A., Spezifische Blutveränderungen nach Harninjectionen. *Archiv für Hygiene*. Bd. XLV.
- Schlossmann und Moro, *Münchener med. Wochenschrift*. 1903. S. 597.
- Schottelius, *Archiv für Hygiene*. Bd. XXXIV u. XLII.
- Seelig, *Virchow's Archiv*. Bd. CXLVI.
- Schmitz, *Zeitschrift für physiol. Chemie*. Bd. XIX.
- Spiegelberg, *Jahrbuch für Kinderheilkunde*. Bd. II. S. 194.
- Strassburger, *Münchener med. Wochenschrift*. 1903. Nr. 52.
- Tissier, H., *Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson*.
- Tissier und Martelly, *Annales de l'Institut Pasteur*. 1902.
- Uffelman, *Deutsches Archiv für klin. Medicin*. Bd. XXVIII.
- Wassermann, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1903. S. 16.
- Winternitz, *Zeitschrift für physiol. Chemie*. Bd. XVI.
-