XIV.

Aus dem Laboratorium des Prof. Nencki in Bern.

Einige Beobachtungen über die Milzbrandbacillen.

Von
A. Dyrmont.

Die Versuche, die ich in Nachfolgendem beschreiben werde, sind zunächst in der Absicht unternommen worden, die chemische Zusammensetzung der Leibessubstanz dieser pathogenen Mikroorganismen kennen zu lernen. Von allen bis jetzt als pathogen erkannten und rein gezüchteten Mikroben sind die Milzbrandbacillen relativ am leichtesten zugänglich und vermöge ihrer Grösse und Wuchsform auch am leichtesten von anderen Spaltpilzen unterscheidbar. Dadurch wird auch die Controle der Reinculturen leichter als bei anderen Mikroben; ein Umstand, der bei Reinculturen in grossem Maassstabe, wie ich sie behufs Gewinnung genügender Menge für chemische Analysen anstellen musste, von besonderem Vortheil ist. Die Milzbrandbacillen gehören ferner zu den Sporen bildenden Spaltpilzen und es liess sich erwarten, dass die besonders ausgeführte Analyse der Fäden und der Sporen die Unterschiede in dem chemischen Bau dieser beiden Gebilde zeigen musste.

Chemische Untersuchungen der Leibessubstanz der Spaltpilze sind bis jetzt nur von Professor Nencki und Dr. Schaffer¹⁾ ausgeführt worden. Dazu kommen noch vereinzelte, hierauf bezügliche Beobachtungen von Nägeli und Loew²⁾, sowie Brieger³⁾. Ich habe mich im Allgemeinen bei meinen Untersuchungen an die von Professor Nencki befolgten Methoden gehalten, der mich auch zur Anstellung dieser Versuche veranlasste.

Für die Reinculturen im Grossen hat sich die Koch'sche Fleischwasserpepton-gelatine am zweckmässigsten erwiesen. Sie wurde in Por-

1) Journal f. prakt. Chemie. XX. Bd. 5. Heft. S. 443. 1879.

2) Nägeli, Theorie der Gährung. München 1879.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie. VIII. Bd.

tionen von circa 500 ccm in mit Watte verschlossenen Literkolben sicher sterilisirt und mit Milzbrandsporen, welche aus einer 4. Cultur auf Nährgelatine in Reagensröhrchen herstammten, inficirt. Eine Anzahl solcher Kolben wurde dann in einem Brütöfen, dessen Temperatur zwischen 32 und 35° C. schwankte, 1—2 Monate lang stehen gelassen. Man lernt sehr bald erkennen, ob die Milzbrandcultur rein geblieben ist, oder ob Fäulnisorganismen hinzugetreten sind. Im ersteren Falle sieht man die Milzbrandbacillen in der Flüssigkeit in Form zarter Wolken, dabei bleibt die Nährlösung klar, durchsichtig und geruchlos und allmählich senken sich die Milzbrandwolken zu Boden des Gefäßes. Ist hingegen die Flüssigkeit trübe, so kann man ziemlich sicher sein, dass Fäulnisbakterien hinzugetreten sind. In fast allen Fällen konnte ich auf diese Weise noch vor Auftreten des üblen Geruches und der mikroskopischen Durchmusterung in den Culturen das Eintreten der Fäulnis constatiren. Länger als etwa 8 Wochen habe ich die Kolben bei der Bruttemperatur nicht stehen gelassen. Das rapide Wachsthum in den ersten Tagen wird immer schwächer und allmählich hört es ganz auf. Am Boden des Kolbens sind dann fast nur Sporen der Bacillen abgesetzt, die hinwiederum dadurch makroskopisch kenntlich werden, dass beim Aufschütteln des Kolbeninhaltes derselbe keine zarten Wolken bildet, sondern die ganze Flüssigkeit gleichmässig trüb erscheint. Die Erklärung hierfür liegt auf der Hand. So lange die Milzbrandbacillen zu einem Fadennetz auswachsen, bilden sie die wolkigen Colonien. Mit der Reife der Sporen verschwinden die Fäden und die letzteren, frei in der Flüssigkeit suspendirt, bedingen die Trübung.

Auf diese Weise erhielt ich bei älteren Culturen nur Sporen. Um Fäden für die Analysen zu gewinnen, mussten die Nährlösungen viel früher, etwa nach 8—14 Tagen, verarbeitet werden.

Die Milzbrandculturen wurden, nachdem durch mikroskopische Untersuchung ihre Reinheit constatirt war, d. h. nachdem entweder Fäden oder nur Sporen gefunden waren, frei von allen anderen Mikroorganismen, um allen Verlust zu vermeiden — da das Material doch immer spärlich und kostspielig war — auf folgende Weise verarbeitet.

Der ganze Inhalt der Kolben mit Nährlösung wurde auf feine Leinwand gegossen. Die Flüssigkeit lief ziemlich rasch durch, worauf der Satz von der Leinwand mit einem Platinspatel gesammelt, auf ein Filter gebracht und, um den letzten Rest der Nährlösung zu entfernen, mit destillirtem Wasser gewaschen wurde, bis das Filtrat klar war. Jetzt wurde der Satz vom Filter mit etwa 50—60 ccm Wasser in

ein Becherglas gespritzt und mit 4—8 Tropfen Salzsäure (spec. Gewicht 1,12) versetzt. Die Milzbrandsporen ballen sich dabei auf der Stelle zu einem weissen, flockigen Niederschlag. Die Milzbrandfäden dagegen werden nach Zusatz von Salzsäure ganz schleimig und fadenziehend und erst beim Erwärmen auf dem Wasserbade auf etwa 30° schrumpfen sie zu schneeweissen Flocken zusammen. Die so erhaltenen Niederschläge von Sporen, resp. den Bacillen, wurden abfiltrirt, mit destillirtem Wasser ausgewaschen, hierauf auf Fliesspapier ausgebreitet und so lange liegen gelassen, bis die Consistenz teigartig wurde. Hierauf wurde der Niederschlag mit einem Messer von dem Fliesspapier abgehoben, in tarirte Porzellantiegel gebracht, gewogen und zuerst auf dem Wasserbade, sodann im Trockenschrank bei 110° bis zu constantem Gewichte getrocknet. In dem trockenen Rückstande wurde der Gehalt an in Alkohol und Aether löslichen Stoffen, die Asche und die elementare Zusammensetzung der entfetteten Substanz bestimmt.

Milzbrandsporen.

Die zur folgenden Analyse verwendeten, nach sechswöchentlichem Stehen bei der Bruttemperatur aus 5 Kolben erhaltenen Sporen waren ganz frei von fremden Organismen. Auch waren bei der mikroskopischen Durchsuchung der Nährlösungen aus den einzelnen Kolben nur ganz vereinzelte sporenhaltige lange Fäden zu finden, so dass das Material als nur aus Sporen bestehend angesehen werden konnte.

Wasserbestimmung. 5,668 g der frischen, feuchten Sporen bei 110° bis zu constantem Gewichte getrocknet, verloren 4,8433 g, entsprechend 85,44 Proc. Wasser.

Die trockenen und fein gepulverten Sporen wurden auf ein tarirtes Filter gebracht, wieder gewogen und in einem Extractionsapparate so lange den Alkoholdämpfen ausgesetzt, bis der abfliessende Alkohol keinen Rückstand hinterliess. Das Filter sammt Rückstand wurde jetzt zurückgewogen und aus dem Gewichtsverlust die Menge der in Alkohol löslichen Substanzen ermittelt. 0,7552 g der trockenen Sporen enthielten 0,076 g in Alkohol löslicher Substanz oder 9,7 Proc. Zur Controle wurde der alkoholische Auszug direct bestimmt. Nach Verdunsten des Alkohols und Trocknen des Rückstandes bis zu constantem Gewicht wog derselbe 0,0722 g oder 9,55 Proc. Die 0,0722 g des alkoholischen Rückstandes wurden mit Aether extrahirt. Der Aether löste davon 0,0633 g. Danach enthielten die Sporen 8,37 Proc. in Alkohol und Aether und 1,17 Proc. nur in Alkohol löslicher Stoffe. Die mit Alkohol extrahirten Milz-

brandsporen wurden jetzt auf gleiche Weise mit Aether behandelt. Das Gewicht der an Aether abgegebenen Substanzen war = 0,0028 g, also nur 0,037 Proc. nur in Aether und nicht in Alkohol löslicher Substanz. Die mit Alkohol und Aether extrahirten Sporen wurden zur Aschebestimmung und zur Elementaranalyse verwendet.

Aschebestimmung. 0,2941 g der Substanz im Platintiegel geglüht hinterliessen 0,0034 g oder 1,15 Proc. Asche.

Die Elementaranalysen ergaben mir folgende Zahlen: 0,2002 g der Substanz, in offenem Rohr mit chromsaurem Blei verbrannt, gaben 0,3728 g CO₂ und 0,1359 g H₂O oder 51,37 Proc. C und 7,63 Proc. H aschefrei berechnet. 0,1845 g oder 0,1824 g aschefreier Substanz gaben 20,9 cm N-Gas bei 16° T. und 709 mm Bst. oder 12,44 Proc. N.

Folgende Tabelle veranschaulicht die Resultate der Analysen der Sporen der Milzbrandbacillen:

Wassergehalt der frischen Sporen . . .	85,44 Proc.
Fester Rückstand	14,56 "
100 Theile des festen Rückstandes enthielten:	
1. in Alkohol und Aether lösliche Stoffe . .	8,73 Proc.
2. nur in Alkohol lösliche Stoffe	1,17 "
3. nur in Aether lösliche Stoffe	0,03 "
4. in Alkohol unlösliche unorganische Stoffe	1,15 "
in Summa direct bestimmte Materien =	10,72 "

Der in dem mit Alkohol und Aether erschöpften Rückstande gefundene Aschengehalt = 1,15 Proc. repräsentirt jedenfalls nicht die gesammten unorganischen Stoffe der Milzbrandsporen. Bei der vollständigen Extraction der getrockneten Sporen mit Alkohol geht ein Theil der unorganischen Stoffe in den letzteren über und das in der obigen Zusammenstellung als nur in Alkohol löslich bezeichnete Extract erwies sich, auf Platinblech verbrannt, als vorwiegend aus unorganischen Stoffen bestehend. Man wird nicht fehlgehen, den Gehalt der Sporen an Mineralstoffen auf etwas über 2 Proc. anzuschlagen.

Aus der weiter unten mitzutheilenden Elementaranalyse des schon von Prof. Nencki¹⁾ beschriebenen Anthraxprotein ergibt es sich, dass das letztere rund 16 Proc. Stickstoff enthält.

Der entfettete und aschefrei berechnete Rückstand der Sporen enthielt 12,44 Proc. Stickstoff. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Stickstoff darin nur in Form von Proteinsubstanzen enthalten ist.

1) Berliner chem. Berichte. Jahrg. 1884. S. 2605.

Nimmt man ferner an, dass die Eiweisstoffe der Sporen hauptsächlich aus Anthraxprotein bestehen, so berechnet sich aus dem gefundenen Stickstoff = 12,44 Proc. der Eiweisgehalt der entfetteten Sporen zu 77,75 Proc. Danach würden die entfetteten Sporen noch immer aus 22,25 Proc. Pilzschleim und sonstigen stickstofffreien Substanzen bestehen.

Milzbrandfäden.

Um möglichst sporenfreie Fäden zu erhalten, mussten die Nährlösungen schon frühzeitig, am dritten bis vierten Tage, verarbeitet werden, weshalb auch das Untersuchungsmaterial hier in viel geringerer Menge gewonnen wurde. Ich musste mich daher, wegen Mangel an Material, nur auf die Bestimmung der in Alkohol und Aether löslichen Stoffe, sowie eine Stickstoffbestimmung beschränken. Die, wie oben angegeben, durch feine Leinwand abfiltrirten und mit Wasser nachgewaschenen Fäden wurden in ein Becherglas heruntergespült und mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt, wobei sie ganz schleimig und fadenziehend wurden und erst beim Erwärmen auf dem Wasserbade zu einem flockigen Niederschlag zusammenschrumpften, welcher, auf ein Filter gebracht, sich gut auswaschen liess. Der feuchte, etwas über ein Gramm wiegende Niederschlag wurde bis zu constantem Gewichte getrocknet, sodann fein gepulvert. So erhielt ich 0,2028 g trockene Substanz, fast nur aus Bacillenfäden bestehend. Dieses Pulver wurde mit Alkohol und Aether successive extrahirt, bis nichts mehr davon aufgenommen wurde. Das Gewicht der in Alkohol und Aether übergegangenen Substanzen war = 0,0168 g oder 7,8 Proc. Dieses Extract hinterliess jedoch noch 0,0023 g Asche, so dass das Gewicht der organischen, in Alkohol und Aether löslichen Stoffe nur 7,1 Proc. war. Die Stickstoffbestimmung in den entfetteten Milzbrandfäden ergab folgende Zahlen: 0,1567 g der Substanz gaben 9,4 ccm N-Gas bei 14,5° T. und 708 Bst. oder 6,8 Proc. N.

Anthraxprotein.

Mit diesem Namen wurde von Prof. Nencki (l. c.) eine aus den Milzbrandbacillen isolirte und allem Anscheine nach ihnen eigenthümliche Eiweisssubstanz bezeichnet. Dieser Eiweissskörper zeigte sich in seinen Eigenschaften von dem Eiweiss der Fäulnisbakterien — dem Mykoprotein — verschieden. Das Mykoprotein erhielten M.

Nencki und Schaffer aus Fäulnisbakterien, die auf 2 proc. Gelatine mit etwas Pankreassaft versetzt, gewachsen sind. Die Elementaranalysen des Mykoproteins ergaben 52,32 Proc. Kohlenstoff, 7,55 Proc. Wasserstoff, 14,75 Stickstoff und 25,38 Proc. Sauerstoff. Das Mykoprotein enthält keinen Schwefel und keinen Phosphor. Es ist in Wasser, Säuren und Alkalien leicht löslich und wird aus der wässrigen oder sauren Lösung schon durch verdünnte Kochsalzlösung gefällt. Dagegen zeigt das Anthraxprotein in seinem chemischen Verhalten mehr Aehnlichkeit mit den Pflanzencaseinen. Es ist in Alkalien leicht löslich, dagegen in Wasser, Essigsäure und verdünnten Mineralsäuren gänzlich unlöslich. Der durch Säure aus alkalischer Lösung in weissen Flocken abgeschiedene Körper, abfiltrirt und ausgewaschen, löst sich in Essigsäure und verdünnter Salzsäure selbst in der Wärme nicht. Das Anthraxprotein ist nach der Bestimmung von Prof. Nencki schwefelfrei und kann sowohl aus der klar filtrirten Nährlösung, in der Milzbrandbacillen gewachsen sind, oder noch besser durch Digestion der Sporen mit stark verdünnten Alkalien auf dem Wasserbade, Filtriren und Fällen des Filtrates mit Essigsäure erhalten werden. Ich habe auf obige Weise theils aus der Nährlösung, theils aus den Sporen so viel Anthraxprotein dargestellt, dass wenigstens eine Elementaranalyse damit ausgeführt werden konnte. Das mit Essigsäure gefällte Product wurde noch mit Alkohol und Aether extrahirt und bei 110° bis zu constantem Gewichte getrocknet.

0,2301 g der Substanz im Schiffchen im Sauerstoffstrome verbrannt gaben 0,4396 g CO₂ und 0,157 g H₂O oder 52,1 Proc. C und 6,82 Proc. H. Im Schiffchen hinterblieb eine Spur nicht wägbarer Asche.

0,1592 g der Substanz gaben 23,8 cem N-gas bei 14,6° T. und 707 mm Bst. oder 16,2 Proc. N.

Danach würde auch die procentische Zusammensetzung des Anthrax- und des Mykoproteins verschieden sein, namentlich bezüglich des Stickstoffgehaltes. Es bedarf jedoch weiterer Analysen des Anthraxproteins, um diese Verschiedenheit als sicher constatirt ansehen zu können.

So unvollständig und der Wiederholung bedürftig meine Analysen auch sind, so geht doch so viel sicher daraus hervor, dass die Zusammensetzung der Milzbrandsporen und Milzbrandfäden eine ganz verschiedene ist. Wie zu erwarten war, enthalten die Sporen mehr Fett, d. h. in Alkohol und Aether lösliche Stoffe, vor Allem aber ist der Stickstoffgehalt der beiden Materien ein durchaus verschie-

dener. Der Gehalt an Eiweissstoffen in den Sporen, aus dem Stickstoff berechnet, beträgt etwa 77,75 Proc. Der in den entfetteten Fäden gefundene Stickstoff = 6,8 Proc. entspricht einem Gehalte an Eiweissstoffen von nur 42,5 Proc. und der ganze übrige Rest der entfetteten Fäden würde aus stickstofffreien Materien, vorwiegend wohl Pilzcellulose und Pilzschleim bestehen. Diese letzteren Materien müssten also zu Anfang, wo die Spore zu langen Fäden auswächst, vorwiegend gebildet werden, während die stärkste Neubildung der dem Milzbrand eigenthümlichen Eiweisskörper zur Zeit der Sporenbildung in den Fäden stattfinden muss. Aus diesem Grunde, sowie aus weiter unten anzuführenden Versuchen sind die exquisit aërobiotischen Milzbrandbacillen am besten mit den Schimmelpilzen vergleichbar. Die langen Fäden des Milzbrands entsprechen den Mycelien der Schimmelpilze. Diese Art des Wachstums und der Neubildung muss aber eine ganz andere sein, wenn Milzbrandbacillen nicht durch Auswachsen in lange Fäden und Sporenbildung, sondern durch Theilung sich vermehren, und es ist interessant zu constatiren, wie je nach der Wuchsform und Vermehrungsart auch der Stoffwechsel dieser Organismen sich ganz verschiedenartig gestalten muss.

Der bemerkenswerthe Unterschied in dem Verhalten der Milzbrandsporen einerseits und Milzbrandfäden andererseits gegen verdünnte Salzsäure veranlasste uns, um die abschwächende, resp. tödtende Wirkung der Säure näher kennen zu lernen, einige Versuche anzustellen. Es wurden zunächst ausgewaschene, sporenfreie Milzbrandfäden in 20 ccm destillirten Wassers vertheilt und mit 5 Tropfen reiner Salzsäure, spec. Gew. 1,12 versetzt. Der Säuregehalt der Flüssigkeit entsprach circa 0,5 Proc. An den Fäden war in den nächsten 24 Stunden weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Veränderung wahrnehmbar. Erst als wir zu einem mikroskopischen Präparate einen Tropfen 25 proc. Salzsäure zusetzten, quollen die Fäden auf, bald darauf verwandelten sie sich in ein undeutlich contourirtes Netz und nach einigen Minuten blieb an der Stelle nur ein starkglänzender, structurloser Schleim zurück. Jetzt wurden folgende Versuche angestellt.

Ein haselnussgrosses Klümpchen, aus feuchten Milzbrandfäden bestehend, wurde in 20 ccm 0,5 proc. Salzsäure vertheilt und 24 Stunden lang liegen gelassen. Wie im vorigen Versuche war auch jetzt an den Fäden bei mikroskopischer Durchsicht keine Veränderung wahrnehmbar. Die Flüssigkeit wurde durch Schütteln gleichmässig aufgeschwemmt und davon einem Meerschweinchen eine halbe Pravaz'sche Spritze unter die Haut injicirt. Das Thier starb nach

48 Stunden und die Organe: Lungen, Milz, Leber waren mit Milzbrandbacillen überfüllt. Nunmehr liessen wir Milzbrandfäden, annähernd gleiche Menge, in 20 cem 1 proc. Salzsäure 3 Tage lang stehen. Hiervon eine halbe Pravaz'sche Spritze, einem anderen Meerschweinchen injicirt, hat dem Thiere nichts geschadet, es blieb am Leben.

Um die Wirkung der Salzsäure auf die Bacillen, wie sie in den Geweben der Thiere enthalten sind, kennen zu lernen, wurden die Milz und die Lunge von einem an Milzbrand verendeten Kaninchen klein zerhackt und annähernd gleiche Mengen des zerhackten Gewebes in je 20 cem 0,25 proc., 0,5 proc. und 1 proc. Salzsäure 48 Stunden lang liegen gelassen. Hierauf wurde dreien Kaninchen je eine halbe Pravaz'sche Spritze der drei Lösungen injicirt.

Das Kaninchen mit Bacillen in 0,25 proc. Salzsäure starb an Milzbrand nach 27 Stunden. Kaninchen mit Bacillen in 0,5 proc. Salzsäure starb am vierten Tage. Kaninchen mit Bacillen in 1 proc. Salzsäure starb am fünften Tage. Die inneren Organe, namentlich die Lungen waren hier mit Milzbrandbacillen überfüllt. Lunge und Milz von diesem Thiere wurden wiederum zerhackt und in je 20 cem 1,5 proc., 2 proc. und 3 proc. Salzsäure 24 Stunden lang stehen gelassen. Die damit mit je $\frac{1}{2}$ Pravaz'schen Spritze injicirten Kaninchen blieben alle am Leben.

Wie es zu erwarten war, zeigten sich die Milzbrandsporen gegen Säuren noch resistenter. Milzbrandsporen wurden in 0,5 proc., 1 proc. und 2 proc. Salzsäure 24 Stunden lang stehen gelassen; hierauf Kaninchen mit je $\frac{1}{4}$ Pravaz'schen Spritze der Flüssigkeit inficirt. Kaninchen mit Sporen in 0,5 proc. Salzsäure starb am vierten Tage, mit Sporen in 1 proc. Salzsäure am fünften Tage. Beide hatten massenhaft Milzbrandbacillen in den Organen. Mit den Sporen aus 2 proc. Salzsäure wurden 2 Kaninchen inficirt. Das eine Thier starb schon am vierten, das andere am sechsten Tage.

Um zu erfahren, ob die Milzbrandbacillen aus Kohlehydraten Milchsäure bilden, habe ich auf Vorschlag von Professor Nencki folgenden Versuch ausgeführt. Es wurde eine Nährlösung aus 2 Proc. Gelatine, 2 Proc. käuflichem Traubenzucker und 1 Proc. Fleischpepton präparirt und durch wiederholtes Kochen sicher sterilisirt. Andererseits wurde in eine Anzahl Kölbchen von etwa 50 cem Inhalt je eine Messerspitze, bei gelinder Rothgluth geglühter, kohlensaurer Kalk zugesetzt und die obige Nährlösung hineinfiltrirt. Die so beschickten Kölbchen wurden von Neuem durch Kochen sterilisirt, sodann mit Milzbrand geimpft und bei der Bruttemperatur stehen gelassen. In

dieser Nährlösung wuchsen die Bacillen sehr schön, die bekannten flockigen Wolken, aus langen Fäden bestehend, bildend. Nach 8 Tagen wurde der Versuch unterbrochen und der Inhalt jedes Kölbchens auf die Reinheit der Culturen mikroskopisch untersucht. Die Reinculturen waren sämtlich geruchlos, reagierten stark sauer und enthielten fast nur Fäden, hie und da waren bereits sporenhaltige Fäden vorhanden. Die chemische Untersuchung von 480 cem dieser Nährlösung ergab, dass dieselbe keine Spur Milchsäure und auch keine flüchtigen Fettsäuren enthielt, dagegen wurde in minimalen Mengen Bernsteinsäure isolirt und als solche durch Sublimation und Schmelzpunktbestimmung identificirt.