II. Aus dem hygienischen Institut der Universität Strassburg.

(Direktor: Prof. Dr. Forster.)

Ueber die Gewinnung der schwer zugänglichen, in der Leibessubstanz enthaltenen Stoffwechselprodukte der Bakterien.

Von Prof. E. Levy und Thierarzt F. Pfersdorff, Assistenten am Institut.

Aus den Kulturen der Erreger der Diphtherie, des Tetanus und des Botulismus gelingt es leicht, sich spezifische, wirksame Giftlösungen zu verschaffen. Ihre Toxine gehen bei der künstlichen Züchtung in die umgebende Flüssigkeit über, in Folge dessen braucht man nur die gewachsenen Bouillonkulturen von den geformten Elementen zu befreien. Die meisten übrigen Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass man bei ihnen nur schwer die Giftstoffe und die sonstigen Stoffwechselprodukte zur Darstellung zu bringen vermag. Man hat sich zunächst damit zu helfen gesucht, dass man die ganzen Bakterienindividuen heranzog, nachdem man sie vorsichtig durch Erhitzen auf 56° oder durch Chloroform (R. Pfeiffer) abgetödtet hatte. R. Pfeiffer hat so zuerst die Leibessäfte aus Choleravibrionen und Typhusbazillen sich verschafft. Zwischen diesen Leibern und den löslichen Giften der reinen Intoxikationskrankheiten Diphtherie und Tetanus machte sich als wesentlicher Unterschied bemerkbar, dass die ersteren im Thierexperiment sofort nach ihrer Einverleibung in Aktion traten, während die letzteren in der Regel erst nach einem deutlichen Inkubationsstadium vergiftend wirkten. Für die Gewinnung von Leibessubstanzen der Tuberkelbazillen gab dann Robert Koch ein neues Verfahren an. Er liess seine Kulturen im Vakuumexsikkator scharf trocknen, zerrieb im Achatmörser auf das genaueste, schwemmte in destillirtem Wasser auf und centrifugirte solange, bis das Bakterienpulver gewissermaassen in Lösung übergeführt war. Auch durch das mechanische Zerreiben der Bakterien und durch nachfolgendes Auspressen unter einem Druck von 400—500 Atmosphären nach dem E. Buchner'schen Verfahren erhält man zum Theil wirksame Bakterienzellsäfte. Die löslichen bakteriellen Gifte werden ja, wie bereits angedeutet, von den lebenden Bakterienindividuen sezernirt. H. Kossel¹⁾ hat dies für die Diphtheriebazillen bewiesen. Aus den Leibern dieser selben Mikroben gewann Aronson²⁾ das typisch wirkende Gift, indem er die getrockneten Bakterienmassen zunächst zwecks Sterilisirung eine Stunde auf

55—60° erhitze, sorgfältig zerrieb und mit 1/10 % Aethylendiaminlösung behandelte. Brieger³⁾ verdanken wir eine neue Methode, eine spezifisch wirkende Substanz aus Typhusbazillen darzustellen, bei welcher die vitalen Stoffe der Bakterien möglichst geschont bleiben. Vom Prodigiosus vermochte der eine von uns (E. Levy) in Gemeinschaft mit Dr. E. Meyer²⁾ die Stoffwechselprodukte zu erhalten, welche in den Bazillenleibern sich aufspeichern, indem die einige Tage alten, stark entwickelten Kartoffelkulturrasen durch Chloroform abgetödtet, dann sorgfältigst getrocknet und schliesslich zu einem Pulver zerrieben wurden. Dies Pulver führt ein stark wirkendes Labferment, ein Gelatine lösendes und ein invertirendes Ferment. Hier muss sich die Frage aufdrängen, warum der Prodigiosus so verhältnissmässig leicht seine Leibesbestandtheile austreten lässt? Man findet in den Kartoffelkulturen die Prodigiosusstäbchen klein, unregelmässig, meist direkt in Coccenform und ohne Geisseln. Scheurlen,³⁾ der diese Verhältnisse am eingehendsten studirte, vertritt die Ansicht, dass auf diese Prodigiosusbazillen ein Agens eingewirkt habe, welches in dem Kartoffelrasen gleichmässig vertheilt sein musste. Diese Rasen entwickeln in ziemlich intensiver Weise ein flüchtiges Alkali, wie Scheurlen nachwies, Ammoniak. Dies letztere bringt nach Scheurlen die äussere Eiweisschicht der Bazillen zur Aufquellung und schliesslich zur Lösung. Der Gedanke liegt nun gewiss nahe, dass durch diesen Prozess ein grosser Theil der Leibessubstanzen frei wird, der dann Fermentwirkung auslöst. Eine derartige Anschauung erscheint um so berechtigter, als ja der Ammoniak in 0,01—0,05 % Lösung⁴⁾ zur Darstellung von intracellulären Fermenten benutzt wird. E. Levy hat auf Grund aller dieser Erwägungen versucht, durch Verwendung von Ammoniak und Combination mit der oben beschriebenen Methode des vorsichtigen Abtödtens, Trocknens und Zerreibens auch bei anderen Mikroorganismen die schwer zugänglichen Stoffwechselprodukte zu gewinnen. Vorläufig haben diese Versuche keine bessere Ausbeute an wirksamen Stoffen ergeben. Wir müssen aber beim Prodigiosus noch mit der weiteren Möglichkeit rechnen, dass dieses Mikrobion ein besonderes Enzym bildet, welches den Bakterienleib aufquellen lässt. Man weiss schon lange, dass gewaschene, lebende Hefe, bei höherer Temperatur sich selbst überlassen, der Autophagie, der Selbstgährung anheimfällt. Besonders die Arbeiten von Béchamp⁵⁾ und Schützenberger⁶⁾ haben über diesen Vorgang Aufklärung geschaffen. Derselbe besteht aus zwei Phasen: 1. einer Umwandlung der Kohlehydrate der Hefezellenleiber zu Kohlensäure und Alkohol, 2. der eigentlichen Selbstverdauung (Schützenberger), bei welcher letzterer die Eiweissbestandtheile der Hefe zersetzt werden. Béchamp versetzte seine Gemische mit etwas Karbolsäure; Schützenberger zog Kreosotwasser heran. Kossel⁷⁾ erbrachte dann den Nachweis, dass auch das Nukleïn der Hefe bei der Selbstgährung der Zersetzung anheimfällt. Die Arbeiten von Salkowski,⁸⁾ Hahn,⁹⁾ Geret und Hahn,¹⁰⁾ Kutscher¹¹⁾ führten dann alle zum Ergebniss, dass ein in der Hefe vorhandenes Enzym bei deren Selbstverdauung in Thätigkeit tritt. Hahn erhielt auch nach der E. Buchner'schen Pressmethode aus Tuberkel- und Typhusbazillen eiweiss-

¹⁾ Brieger, Die Darstellung einer spezifisch wirkenden Substanz aus Typhusbakterien. Deutsche medizinische Wochenschrift 1902, No. 27.

²⁾ Ueber diese Untersuchungen wird demnächst berichtet werden.

³⁾ Scheurlen, Geschichtliche und experimentelle Studien über den Prodigiosus. Archiv für Hygiene Bd. XXVI, Heft 1.

⁴⁾ Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3. Auflage, S. 265.

⁵⁾ Béchamp, Notes sur la fermentation alcoolique. Compt. rend. acad. sc. T. LVIII. — Sur l'épuisement physiologique et la vitalité de la levure de bière. ibid. T. LXI. — Sur la cause de la fermentation alcoolique par la levure de bière etc. ibid. T. LXXIV.

⁶⁾ Schützenberger, Faits pour servir à l'histoire de la levure de bière. Compt. rend. acad. sc. T. LXXVIII et Bulletin de la société chimique de Paris T. XXI.

⁷⁾ Kossel, Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. III, IV u. V.

⁸⁾ Salkowski, Ueber Autodigestion der Organe. Zeitschrift für klinische Medizin, Supplement zu Bd. XVII.

⁹⁾ Hahn, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Jahrgang XXXI, Heft 1.

¹⁰⁾ Geret und Hahn, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Jahrgang XXXI, Heft 1 und 2, und Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. XXXIII.

¹¹⁾ Kutscher, Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe. Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. XXXII.

¹⁾ H. Kossel, Zur Kenntniss des Diphtheriegiftes. Centralblatt für Bakteriologie Bd. XIX, No. 25.

²⁾ Aronson, Zur Biologie und Chemie der Diphtheriebazillen. Archiv für Kinderheilkunde Bd. XXX.

haltige Flüssigkeiten, die Selbstverdauung zeigten, allerdings bei weitem nicht in so hohem Grade wie der Presssaft der Hefe. Emmerich und Löw¹⁾ haben energisch darauf hingewiesen, dass in den meisten Flüssigkeitskulturen von Bakterien (aber nicht in allen) mit der Zeit enzymartige Stoffe entstehen, die von den Mikroben selbst erzeugt werden und diese schliesslich wieder auflösen. E. Salkowski²⁾ hatte 1890 die Beobachtung der Autodigestion von Organen, die unter Chloroformwasser aufbewahrt waren, gemacht. Im Hofmeister'schen Laboratorium wurde dann die Frage der Autolyse ausgebaut. Dessen Schüler M. Jacoby³⁾ zeigte, dass die lebende Zelle bereits die Bedingungen des ganzen Vorganges in sich trägt und dass deren Elemente durch Bildung eines proteolytischen Ferments zerfallen. Stellt man alle diese Befunde einander gegenüber, so musste sich entschieden der Versuch lohnen, den Prozess der Autolyse auch bei den Bakterien zu verfolgen, d. h. nachzusehen, ob nicht auf diese Weise auch die colloidalen Bakterieneinschlüsse zugänglich werden. Zu diesem Zwecke versuchten wir zunächst, uns grosse Mengen von Bakterien zu verschaffen. Wir erreichten dies Ziel zunächst noch am bequemsten durch Anlegen von zahlreichen grossen Agarstrichplatten. Nachdem sich ein dicker Ueberzug gebildet, wurde derselbe sorgfältig abgekratzt, mit der gleichen oder 1½fachen Menge destillierten Wassers versetzt und mit Natriumcarbonat schwach, aber deutlich alkalisch gemacht. In einigen Fällen, bei Bakterien, die Säure entwickeln, kann es zweckmässig sein, einen Theil der Gemische zu neutralisieren oder ganz schwach anzusäuern. Die so gewonnene Emulsion wurde in ein luftdichtverschlossenes Gefäss übergelassen, mit Toluol versetzt, resp. überschichtet und in den Brütöfen bei 37° auf vier bis fünf Wochen gebracht. Die Gemische wurden täglich mehrmals umgeschüttelt. Wir zogen das Toluol nach dem Vorgange von Ehrlich und Wassermann heran, die dieses Mittel zur Diphtheriegiftbereitung verwandt hatten.⁴⁾ Die Ueberschichtung mit Toluol, das wiederholte Schütteln, lässt die Lösungen allmählich sich mit dieser Substanz sättigen. Die Bakterien werden abgetötet, während die Fermente bei dieser Prozedur noch am wenigsten leiden. Nach einem Monat etwa, wenn man annehmen darf, dass die Autolyse bereits vorgeschritten, entnimmt man die Bakterien Gemische dem Brütöfen, öffnet die Gefässe und prüft auf Gift- und Fermentwirkung. Um grosse Mengen von Bakterien zur Verfügung zu bekommen, lässt sich auch die Züchtung in bewegten Medien, nach dem Weleminsky'schen, auf der Naturforscherversammlung von Karlsbad 1902 vorgetragenen Verfahren heranziehen. Wir haben dasselbe allerdings etwas modifiziert verwandt, bei der Kürze der Zeit möchten wir uns aber noch nicht bindend aussprechen. Versuche über Bakterienautolyse sind im hiesigen hygienischen Institut nach den oben angegebenen Prinzipien für mehrere Mikroorganismenspezies im Gange. Am meisten interessieren uns vorläufig die Experimente mit Milzbrand, die bereits zu Ende geführt sind. Um den Sporen, die ja überaus hinderlich gewesen sein würden, aus dem Wege zu gehen, wurde stets mit asporogenen Milzbrandrasen operiert. Dieselben mussten immer frisch nach den bekannten Vorschriften von Chamberland und Roux⁵⁾ hergestellt werden. Sie lieferten ein Labferment, ein Gelatine lösendes und ein Fett spaltendes Ferment. Ausserdem bekamen wir ein Gift, das die Mäuse sofort nach der Einspritzung erkranken liess und, in genügend grosser Menge eingelegt, auch tödtete. Der Tod trat stets ein, wenn man den Thierchen $\frac{1}{13}$ ihres Körpergewichts an autolysirten asporogenen, von Toluol wieder ganz befreiten Milzbrandbazillen beibrachte. Häufig

genügte $\frac{1}{25}$, selten $\frac{1}{40}$. Das Gewicht der Bazillen war immer auf den feuchten Rasen bezogen. Dass so enorm grosse Mengen nöthig sind, darf nicht Wunder nehmen, wissen wir doch, dass auch unsere Versuchsthiere in der Regel erst der Milzbrandinfektion erliegen, wenn das ganze Capillargebiet von Milzbrandbazillen erfüllt, manchmal geradezu vollgepfropft ist. Es musste also von vornherein erwartet werden, dass das Gift zahlreicher zerfallener Milzbrandbazillen nöthig sein werde, um das Thier zu Falle zu bringen. Sämmtliche Manipulationen wurden selbstverständlich unter strengster Asepsis ausgeführt. Bei der Autopsie der gefallenen Mäuse erwiesen sich Milz und Blut als keimfrei.

Ob bei den Bakterien, welche sich autolysiren lassen, alle Leibesbestandtheile in Wirksamkeit treten, können wir noch nicht entscheiden. Wir dürfen hier wohl daran erinnern, dass Glässner¹⁾, ein Schüler von Hofmeister, bei der Autolyse der Fundus-schleimhaut des Schweinemagens Propepsin und Prochymosin erhielt, während das Lab und das Pepsin zerstört wurde. Es ist also entschieden mit der Möglichkeit zu rechnen, dass einzelne Fermente im Verlaufe der Autolyse vernichtet werden, und weiter, dass es zunächst zu Bildung von Vorstufen der Fermente kommt, die erst durch Anwendung geeigneter Mittel in die eigentlichen Fermente übergeführt werden.

¹⁾ Emmerich und Löw, Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten Bd. XXXI.

²⁾ Salkowski, Ueber Autodigestion der Organe. Zeitschrift für klinische Medizin, Supplement zu Bd. XVII.

³⁾ M. Jacoby, Ueber das Aldehyde oxydirende Ferment der Leber und Nebenniere. Zeitschrift für physiologische Chemie 1900, Bd. XXX.

⁴⁾ Citirt bei Wassermann, Experimentelle Untersuchungen über einige theoretische Punkte der Immunitätslehre. Zeitschrift für Hygiene Bd. XXII.

⁵⁾ Comptes rendus d. l'acad. des sc. 1883, S. 1090: Sur l'atténuation de la virulence de la bactéricidie charbonneuse sous l'influence des substances antiseptiques. Annales de l'Institut Pasteur, 3ième année 1890, S. 25. Bactéricidie charbonneuse asporogène.