Aus dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.
(Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Gaffky; Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Frosch.)

Ueber Malachitgrünnährböden zum Nachweis von Typhus- und Paratyphusbacillen.

Von Dr. J. Leuchs, Assistenten am Institut.

Im Mai 1903 berichtete Löffler¹⁾ im Greifswalder ärztlichen Verein über eine Beobachtung seines Schülers Deichsel, wonach in einem mit gewissen Mengen Malachitgrün versetzten Bouillon- bzw. Agarnährboden Typhusbacillen noch gut wuchsen, während das Bact. coli nicht mehr zur Entwicklung gelangte. Noch in demselben Jahre veröffentlichten Lentz und Tietz²⁾ „eine Anreicherungs-methode für Typhus- und Paratyphusbacillen“, die sie mit Hilfe der Deichselschen Beobachtung ausgearbeitet hatten. Sie benutzten Malachitgrünagar, der außer den Colibakterien auch sehr viele andere Stuhl-bakterien nicht zur Entwicklung gelangen läßt, zur Vorkultur und verarbeiteten diese weiterhin auf Drigalski-Conradischem Lackmus-Nutrose-Agar. Es gelang ihnen durch dieses Verfahren, eine nicht unerhebliche Anreicherung der Typhusbacillen gegenüber den Begleitbakterien zu erzielen. In einer vor wenigen Wochen erschienenen ausführlichen Arbeit³⁾, in welcher er über die seit 1903 mit dem Malachitgrün ausgeführten Versuche berichtet, bringt Löffler nunmehr einen Nutrose-Bouillon-Malachitgrünagar, einen Pepton-Wasser-Malachitgrünagar zur Züchtung des Typhusbacillus, zu seiner Anreicherung eine Rindfleisch-Bouillon-Pepton-Malachitgrüngelatine mit Zu-

satz gewisser Mengen von Phosphorsäure, ferner mehrere flüssige Malachitgrünnährböden für die Differenzierung der Mikroorganismen aus der Typhusfamilie in Vorschlag.

Durch die vergleichenden Nachprüfungen von Klinger¹⁾, Jorns²⁾, Reischauer³⁾, und nach einer zweiten Veröffentlichung von Lentz und Tietz⁴⁾ kann schon jetzt als erwiesen betrachtet werden, daß die Einführung des Malachitgrüns (Malachitgrünagar) einen wesentlichen Fortschritt gegenüber den bisher in Gebrauch befindlichen Nachweisverfahren für Typhus und Paratyphus bedeutet.

Ein Umstand allerdings gestaltete das Arbeiten mit Malachitgrün bisher recht mißlich: die Tatsache, daß die in Vorschlag gebrachten Präparate in ihrer Wirkung nicht konstant sind. Gewöhnlich stimmten die Konzentrationen, welche die Autoren als die vorteilhaftesten angaben, nur für das Präparat, welches sie selbst in Händen hatten. Ein zweiter Untersucher an anderm Ort erzielte mit den angegebenen Konzentrationen, selbst bei Benutzung einer gleichlautenden, von derselben Fabrik bezogenen Marke gewöhnlich nicht das gewünschte Resultat.

Man gelangte deshalb zu der Annahme, daß bei der Herstellung der Farbstoffe seitens der chemischen Fabriken nicht immer ganz gleichmäßige Präparate erzielt würden (Lentz und Tietz). Wie viele Untersucher nach derartigen Erfahrungen das Malachitgrün beiseite setzten, entzieht sich unserer Kenntnis. Sicherlich aber hat diese Inkonsistenz in der Wirksamkeit der einzelnen Präparate der weiteren Verbreitung und allgemeinen Anwendung des Malachitgrünverfahrens bis jetzt sehr im Wege gestanden.

Löffler bediente sich einer von den Höchster Farbwerken bezogenen, mit Dextrin „abgeschwächten“ Marke: Malachitgrün 120. Dieses Präparat enthält nach Lentz und Tietz sehr viel Dextrin, welches letzteres stark zu Zersetzung neigen soll. Hierbei bilde sich Säure, und zwar scheine diese Säurebildung in verschiedenen Proben des Farbstoffes recht verschieden zu sein. Zu diesem für bakteriologische Arbeiten schon wenig vorteilhaften Verhalten des Malachitgrün 120 geselle sich als zweiter Nachteil seine hygroskopische Eigenschaft, die ihrerseits ein fortwährendes Wechseln des bakteriziden Titers des Farbstoffes bedinge.

Während Klinger und ebenso Jorns als günstigste Konzentration einen Zusatz von 0,05 % Malachitgrün 120 zum Nährboden, also 1 : 2000 Agar gefunden hätten, wäre von ihnen selbst einige Monate nach Klinger die Konzentration 1 : 750 als geeignetste festgestellt worden. Die gleiche Beobachtung, daß der Titer des Malachitgrün 120 in dieser Weise herabgegangen sei, hätten in Straßburg der Mitarbeiter Klingers Kayser und ebenso Hertel in Landau gemacht. „Diese Aenderung des bakteriziden Titers macht es aber notwendig, daß letzterer fortwährend kontrolliert werden muß, er macht es aber nach unseren obigen Ausführungen wahrscheinlich auch nötig, daß bei einer Aenderung der Konzentration des Malachitgrün 120 die Alkalinität des Agars geändert werden muß.“⁵⁾

So sehr nun Lentz und Tietz mit dem Malachitgrün 120 ins Gericht gehen, wesentlich Besseres haben sie nicht an seine Stelle zu setzen. Diese Autoren verwenden ein Malachitgrün I, welches ihnen seinerzeit auf ihre Anfrage von den Höchster Farbwerken — offenbar irrthümlicherweise — als das von Löffler benutzte angegeben worden war.

Wie aus ihrer zweiten Veröffentlichung hervorgeht, hatten sie sich gleich bei Beginn ihrer Arbeiten ein größeres Quantum von diesem Malachitgrün I beschafft, welches sie zur Zeit

1) Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1906, Bd. 24, Heft 1, S. 35. — 2) Hygienische Rundschau 1904, S. 713. — 3) Zentralblatt für Bakteriologie Bd. 39, H. 1. — 4) Klinisches Jahrbuch Bd. 14, 1905, S. 495.

5) Löffler selbst erwähnt in seiner jüngsten Veröffentlichung von derartigen Beobachtungen nichts. Ein frisch bezogenes Malachitgrün 120 hätte sich allerdings etwas (doch wie es scheint unwesentlich) stärker wirksam gezeigt, als ein altes Präparat. — Ein Malachitgrün 120, das ich am hiesigen Institut einer Prüfung unterzog, ließ dagegen in der von Löffler angegebenen Konzentration 1 : 2500 auf Pepton-freiem Nutrose-Bouillon-Agar Colibakterien noch ungeschädigt zu üppigem Wachstum gelangen.

1) Deutsche medizinische Wochenschrift 1903, No. 36, Vereinsbeilage. — 2) Münchener medizinische Wochenschrift 1903, No. 49, S. 2139. — 3) Deutsche medizinische Wochenschrift 1906, No. 8, S. 289.

ihrer zweiten Veröffentlichung noch nicht aufgebraucht hatten. Es erwies sich ihnen in dem Zeitraum von Ende 1903 bis Ende 1905 der mit diesem Präparat hergestellte Grünagar konstant in einer Konzentration 1:6000 am zweckmäßigsten. Es hätte sich somit dieses Präparat durch zwei Jahre unverändert gehalten.¹⁾ Immerhin aber sahen sie sich, da nach ihrer Ansicht, wie schon oben bemerkt, es den chemischen Fabriken nicht möglich sein soll, ein ganz gleichmäßiges Präparat herzustellen, in ihrer ersten Veröffentlichung zu der Bemerkung veranlaßt, daß es vor Beginn der Versuche mit einem neuen Malachitgrün notwendig sein werde, einen Kontrollversuch mit mehreren Agarserien, welche den Farbstoff in verschiedener Konzentration enthalten, vorzunehmen, um den für die Anreicherungs-methode günstigsten Konzentrationsgrad festzustellen.

Und in der Tat ergab bei Nachprüfungen, die ich in jüngster Zeit mit einem Malachitgrün I, welches wenige Wochen vorher von den Höchster Farbwerken durch das hiesige Institut bezogen worden war, die Konzentration 1:6000 nicht das gewünschte Resultat, obwohl der Agar genau nach den im klinischen Jahrbuch gegebenen Vorschriften, namentlich auch bezüglich der Reaktion, hergestellt war. Erst bei einer Konzentration 1:13 000 gelangten die Typhuskolonien in der für den Malachitgrün-Agar eigentümlichen Weise zur Entwicklung, während das Coliwachstum noch ausblieb.

Auch das Malachitgrün I stellt kein reines Präparat dar. Es ist ebenfalls „abgeschwächt“ und zwar, da diese Marke kristallisiert in den Handel kommt, wie es scheint mit grün gefärbten Glaubersalz-Kristallen²⁾ 3).

Es dürfte nach dem Gesagten somit einen nicht unwesentlichen Fortschritt für das Malachitgrün-Verfahren bedeuten, wenn es gelänge, konstant wirkende Präparate von den chemischen Fabriken zu erhalten.

Schon vor dem Erscheinen der jüngsten Löfflerschen Arbeit über diesen Gegenstand gelangte ich bei der Lektüre der diesbezüglichen Veröffentlichungen zu der naheliegenden Vermutung, daß die differente Wirkung der verschiedenen Malachitgrünpräparate vielleicht durch verschieden hohen Gehalt an oben erwähnten Zusätzen bedingt sein könnte und es daher bei Verwendung technisch reiner Präparate und gesondertem Zusatz der etwa zur Abschwächung notwendigen Dextrinmenge in Form eines chemisch reinen Fabrikats erst bei Fertigstellung des Nährbodens wahrscheinlich möglich sein werde, konstante Resultate zu erzielen. Einige damals angestellte orientierende Versuche mit einem im Institut vorgefundenen reinen Malachitgrün bestätigten meine Vermutung in bezug auf die abschwächende Rolle des Dextrins.

Die Wirkung des Malachitgrüns 120 auf Typhus- bzw. Colibacillen erklärt sich danach als aus zwei Faktoren zusammengesetzt. Einmal aus der Coli- und Typhusbacillen und zwar erstere in stärkerem Maße spezifischhemmenden Eigenschaft des Farbstoffes (des Zinkdoppelsalzes bzw. Oxalates des Tetramethyl di-p.-amidotriphenylcarbinolanhydrits) an und für sich, und zweitens aus der diese Eigenschaft des Farbstoffes abschwächenden Wirkung des zugesetzten Dextrins. Im Malachitgrün 120 sind uns diese beiden Faktoren in einem bestimmten, unveränderlichen Mengenverhältnis gegeben.

Die Vorteile, die sich bei Benutzung technisch reiner Präparate — sowohl des Farbstoffes, wie des Zusatzes — ergeben müssen, liegen somit auf der Hand. Erstens wird ein reines Präparat weit mehr Garantien in bezug auf gleichmäßige Herstellung seitens der Fabriken und in bezug auf Haltbarkeit bieten, als ein mit anscheinend nicht ganz indifferent sich verhaltenden Zusätzen versehenes, zweitens ist der Gedanke nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, daß es gelingen möchte, durch Variation des Mengenverhältnisses der beiden

wirksamen Faktoren eine Mischung zu finden, welche in bezug auf das Typhuswachstum, beziehungsweise auf die Ausschaltung der Begleitbakterien noch bessere Resultate liefert, als die im Malachitgrün 120 gegebene Zusammensetzung.

Soviel konnte ich schon aus meinen damaligen Versuchen schließen, und war weiterhin nur noch der Beweis für die Gleichwertigkeit technisch reiner Präparate von verschiedener Herkunft zu erbringen. Ich wandte mich zu diesem Zweck zunächst an mehrere Farbenfabriken mit der Bestellung eines technisch reinen, kristallisierten Malachitgrüns ohne abschwächende Zusätze. Gleichzeitig bat ich um Mitteilung, ob es sich bei der übersandten Probe um das Chlorzink-Doppelsalz, Oxalat oder Pikrat handle.

Folgende Fabriken ließen mir Proben unter nachstehender Bezeichnung zukommen:

1. Aktien-Gesellschaft für Anilin-Fabrikation, Berlin. Malachitgrün Kristalle A. (Oxalat.)
2. Anilinfarbenfabrik Dr. Remy & Co., Weißenthurm a. Rh. Malachitgrün Kristalle (Oxalat.)
3. Chemische Fabriken vorm. Weiler-ter Meer, Uerdingen a. Rh. bei Krefeld. 25 SE. Malachitgrün cr. 3. 4 rein (Oxalat.)
4. Fabrik von Teerfarbstoffen, Aktiengesellschaft Kalle & Co., Biebrich a. Rh. Malachitgrün in Kristallen (Oxalat.)
5. Anilinfarbenfabrik Carl Jäger, Düsseldorf-Derendorf a) Malachitgrün crist. 100%, salzs. Salz. b) Malachitgrün 100%, Chlor-Zink-Doppelsalz.

Ich hatte somit von vier verschiedenen Fabriken je ein Oxalat, von einer das salzsaure, beziehungsweise Chlorzinkdoppelsalz erhalten. Zur Verwendung gelangte außerdem ein im Institut seit 1900 aufbewahrtes, von den Höchster Farbwerken stammendes Präparat, welches mir auch zu meinen ersten Versuchen gedient hatte und die Bezeichnung: Malachitgrün Kristalle extra trug. Um ganz sicher zu gehen, ließ ich mir diese Marke auch nochmals frisch von den Höchster Farbwerken kommen. Auch hierbei handelt es sich um ein Oxalat. Alle Präparate wurden vermittle eines peptonfreien Nutrose-Bouillonagars, wie ihn Löffler in seiner inzwischen erschienenen Arbeit vorschreibt, einer vergleichenden Prüfung unterzogen.

Die Herstellung der Malachitgrünlösung wurde in der Weise bewerkstelligt, daß die sorgfältig abgewogene Malachitgrün-Menge (0,1 g) mit 100 ccm noch heißen, sterilisierten, destillierten Wassers in einem Kölbchen übergossen wurde. Das Malachitgrün löst sich hierbei leicht und vollständig¹⁾. Die Farbflüssigkeit braucht daher nicht filtriert zu werden, wie bei Verwendung von Malachitgrün 120, mit welchem eine restlose Lösung nicht zu erzielen ist. In kaltem Wasser geht die Auflösung wesentlich langsamer vor sich. Für die Wirkung selbst bleibt es sich bei Verwendung der reinen Präparate nach meinen Versuchen gleich, ob man zu ihrer Lösung kaltes oder heißes Wasser benutzt, sofern nur darauf geachtet wird, daß dieselbe in dem kalten Wasser auch vollständig vor sich gegangen ist²⁾.

Von einer derartigen 0,1%igen Lösung wurden steigende Mengen zu 10 ccm des Pepton-freien Nutrose-Bouillonagars zugesetzt und das Ganze nach Mischung in Petrischalen ausgegossen.

Die Beimpfung dieser Platten erfolgte mit je einer Oese einer Bouillonaufschwemmung einer 24 stündigen Agarkultur, und zwar entweder im Impfstich oder es wurde das aufgebrauchte Material mit der Platinöse bzw. dem Glasspatel auf der Agaroberfläche verteilt. Im Impfstich vertrugen fast alle geprüften Bakterien, darunter auch Typhus etwas stärkere Konzentrationen des Malachitgrüns als bei Verteilung. Es ist dies wiederum ein Beweis, daß auch die Typhusbacillen durch das Malachitgrün nicht unwesentlich geschädigt werden.

An Kulturmaterial wurden geprüft:

- drei im Laboratorium seit längerer Zeit fortgezuchtete Typhusstämmen;
- drei frisch aus Stuhl gezüchtete Typhusstämmen;
- ein Coli-Laboratoriumsstamm;
- zwei frisch aus Stuhl gezüchtete typische Colistämme;
- ein frisch aus Stuhl gezüchteter atypischer, Alkali-bildender Colistamm;

¹⁾ Nur die von den Höchster Farbwerken bezogenen Marken (in den Tabellen als „Höchst neu“ und „Höchst alt“ geführt) ließen in der Lösungsflüssigkeit selbst nach längerem Stehen und häufig wiederholtem Umschütteln in der Regel noch einige ungelöste Partikelchen erkennen, allerdings nicht annähernd so reichlich, wie das Malachitgrün 120 (Höchst).

²⁾ Dagegen scheint längeres Aufbewahren am Licht (Prüfung nach 20 Tagen) die Lösung zu verändern. Ihre Wirksamkeit ist verstärkt.

¹⁾ Neuerdings ergab ihnen auch Malachitgrün-Kristall (Höchst) in der Konzentration 1:22 000 dem leicht lackmussauren Agar zugesetzt annähernd gleich gute Resultate, wie das Malachitgrün I.

²⁾ Die Fabriken machen diese Zusätze aus geschäftlichen Rücksichten. Zur Herstellung der Dextrin-Mischungen wird selbstverständlich nicht etwa ein chemisch reines (à Kilo etwa 3,50 M.), sondern das käufliche Dextrin (à Kilo etwa 50 Pfg.) verwandt.

³⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Auch das Malachitgrün I enthält, wie ich inzwischen in Erfahrung gebracht habe, Dextrin.

zwei frisch aus Stuhl gezüchtete Coccenstämmen,
ferner je ein Laboratoriumsstamm von
Bacterium paratyphi A.

" " B.
" typhi murium
" enteritidis (Gärtner)
" dysenteriae (Flexner)
" faecalis alcaligenes
" Proteus vulgaris.

Abgesehen von Bacterium typhi und coli gelangten von diesen Mikroorganismen auf allen einer Prüfung unterzogenen Konzentrationen bei Verteilung mit dem Glasspatel mehr oder weniger gut zur Entwicklung:

Bacterium paratyphi A,
" " B,
" typhi murium,
" enteritidis Gaertner,
" coli (atypischer, Alkali-bildender, frisch aus Stuhl gezüchteter Stamm.

Kein Wachstum dagegen zeigten:

zwei frisch aus Stuhl gezüchtete Coccenstämmen,
Bacterium dysenteriae (Flexner),
" faecalis alcaligenes,
" Proteus vulgaris.

Das Verhalten der uns am meisten interessierenden Bakterienarten, des Bacterium typhi und coli soll in folgendem ausführlicher erörtert werden. In den Tabellen ist von diesen beiden Gruppen als Beispiel je ein Laboratoriums- (Typhus I) und ein frisch gezüchteter Typhusstamm (Typhus II) und ferner ein Colistamm aufgeführt. Die Laboratoriums-Typhusstämmen zeigten sich allen Konzentrationen des Malachitgrüns gegenüber etwas empfindlicher als die frisch gezüchteten Kulturen. Bei den entsprechenden Colistämmen war ein derartiger Unterschied dagegen nicht festzustellen.

Tabelle I soll die Wirkung der Malachitgrünpräparate allein ohne Dextrinzusatz zur Anschauung bringen.

Tabelle I.

Herkunft des Malachitgrüns	Gehalt des peptonfreien Nutrose-Bouillon-Agars an 0,1% Malachitgrünlösung in Prozenten																													
	1,1%						1,4%						1,7%						2,0%						2,3%					
	Typhus I		Typhus II		Coli		Typhus I		Typhus II		Coli		Typhus I		Typhus II		Coli		Typhus I		Typhus II		Coli							
	Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden		Wachstum nach Stunden							
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48						
1. Berlin	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
2. Weißenthurm	+	+	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
3. Uerdingen	+	+	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
4. Biebrich	+	+	±	±	+	+	+	±	±	1 C	2 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
5. Höchst (alt)	+	+	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
6. Höchst (neu)	+	±	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
7. Düsseldorf:																														
a) salzsaures Salz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
b) Chlorzink-Doppelsalz	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						

+ = gutes, ± = etwas üppigeres, +, +, +, +, + = schwächer werdendes, +m = mikroskopisches Wachstum, C = Kolonien.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, verhalten sich alle in Anwendung gezogenen Farbstoffproben in bezug auf die endgültige Hemmung der Colibakterien gleich. Selbst das salzsaure Salz läßt im wesentlichen dieselbe Wirkung, wie die Oxalate erkennen. Nur das Chlor-Zink-Doppelsalz wirkt auf Colibakterien vielleicht etwas schwächer, auf Typhusbacillen jedoch gleich stark. Es dürfte sich sonach für unsere Zwecke am wenigsten eignen. Die Tatsache, daß eine im Institut fünf Jahre lang aufbewahrte Farbstoffprobe (Höchst alt) noch ebenso wirksam ist, wie die frisch bezogenen Marken, kann uns dafür bürgen, daß der technisch reine Farbstoff in Substanz unverändert haltbar ist.

In Tabelle II soll die abschwächende Wirkung des Dextrins¹⁾ dargestellt werden.

Tabelle II.

Gehalt des Nutrose-Bouillon-Agars an Dextrin in Prozenten	1,36% Dextrin						5,5% Dextrin					
	Typhus I		Typhus II		Coli		Typhus I		Typhus II		Coli	
	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden	Wachs- tum nach Stunden
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
1,1%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
1,4%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
1,7%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
2,0%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
2,3%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
2,9%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
3,5%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
4,1%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
4,7%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
5,9%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+
6,5%	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	+	+

Zur Verwendung gelangte ein von der Firma Kahlbaum, Berlin bezogenes reines Dextrin (à kg 3,50 M.). Eine bestimmte Menge

¹⁾ Inwieweit die durch den Dextrinzusatz (das Dextrin reagiert sauer), bedingte Aenderung der Reaktion des Agars bei diesen Erscheinungen mit von Einfluß ist, habe ich bei vorliegenden Versuchen nicht berücksichtigt.

dieses Präparates wurde mit dem flüssig gemachten Pepton-freien Nutrosebouillonagar übergossen und das Ganze noch solange im Wasserbad erhitzt, bis sich das Dextrin vollständig gelöst hatte, was gewöhnlich nach einigen Minuten der Fall war, dann erst wurde die Malachitgrünlösung zugefügt.

Der Kürze halber ist in Tabelle II nur ein Farbstoffpräparat als Beispiel angeführt. Geprüft wurden auch hier alle andern Proben, doch verhielten sie sich auch bei diesen Versuchen insgesamt gleichmäßig.

Wir können aus dieser Tabelle im Vergleich mit Tabelle I zunächst ersehen, daß bei Zusatz von 1,36% Dextrin zum Agar die Grenze sowohl für das Typhus- wie für das Coli-wachstum gegenüber dem Dextrin-freien Grünagar nach oben verschoben wird und daß sich diese Grenzpunkte durch den vierfachen Dextrinzusatz noch weiter hinausrücken lassen. Dabei hat es auch den Anschein — soweit nach meinen bisherigen Untersuchungen ein Schluß erlaubt ist — als ob der Typhusbacillus durch den Dextrinzusatz in stärkerem Maße gegen die Malachitgrünwirkung geschützt würde, wie der Colibacillus. Mit anderen Worten: der Abstand zwischen dem Punkt der Colihemmung und dem Punkt der Typhus-hemmung wird durch den Dextrinzusatz vergrößert. Während bei Grünagar ohne Dextrin Coli-wachstum zuletzt bei einem Zusatz von 1,4% einer 0,1%igen Malachitgrünlösung stattfindet, die letzten Spuren von Typhuswachstum bei Zusatz von 2,9% dieser Malachitgrünlösung festzustellen sind, ist dies bei einem 1,36% Dextrin enthaltenden Agar bei 1,7, bzw. 3,5% und bei einem 5,5%igen Dextrinagar bei 2,9, bzw. 5,9% der Fall. Bei einem Dextrin-freien Grünagar würde somit der Typhusbacillus nur 1,5, bei einem 1,3%igen Dextrinagar dagegen 1,8, bei einem 5,5%igen 3,0 Malachitgrün-einheiten mehr als der Colibacillus vertragen.

In weiteren Versuchsreihen habe ich die zugesetzte Dextrin-menge systematisch gesteigert, während der jeweilige Malachitgrün-zusatz der gleiche blieb. Bei einem Gehalt des Agars von 8,3% einer 0,1%igen Malachitgrünlösung (= 0,0083% Malachitgrün) gelang es selbst bei Zufügung von 11,0% Dextrin nicht

mehr, die Typhusbacillen zum Wachstum zu bringen. Es dürfte hierbei allerdings auch die zu starke Konzentration des Nährbodens mit in Frage kommen.

Aehnliche Wirkungen wie Dextrin zeigen auch Pepton, Traubenzucker und Milchsucker. Traubenzucker und Milchsucker wirken, in den gleichen Mengen wie Dextrin zugesetzt, allerdings viel schwächer wie dieses. Auch vermag man mit ihnen die Abschwächung nicht so hoch zu treiben.

Den Einfluß des Peptons beobachtete auch Loeffler bei Verwendung des Malachitgrüns 120.

Er variierte die dem Agar zugesetzte Peptonmenge von 0,1 bis 5,0%. „Die Peptonmenge“, schreibt er, „zeigte sich hierbei von wesentlicher Bedeutung; je mehr Pepton zugesetzt wurde, um so kräftiger wuchsen die Typhusbacillen, aber zugleich wurde auch ihr Aussehen um so weniger charakteristisch. Sie entfärbten wohl das Nähragar, aber sie wurden dick und saftig. Zugleich war zu bemerken, daß die Zahl der fremden Kolonien mit dem Peptongehalte des Nähragars zunahm. Es war mithin der Gehalt von stickstoffhaltigem Pepton von Einfluß auf die Wirkung des Malachitgrüns. Stärkere Konzentrationen des ersteren schwächten die Wirkung ab.“ Die gleichen Beobachtungen, wie bei den Peptonzusätzen machte er mit der Nutrose. „Die Zahl der auf den Grünplatten wachsenden Mikroorganismen stieg an mit der Zunahme des Nutrosegehalts.“

In einigen wenigen weiteren Versuchen befaßte ich mich mit der Frage, ob der vollständig fertig gestellte Malachitgründextrinagar durch Erhitzung eine Veränderung erleide. Wenn es erlaubt ist, aus diesen wenigen, mehr orientierenden Versuchen schon jetzt einen Schluß zu ziehen, ist das — bis zu einem gewissen Grade wenigstens — nicht der Fall. Die Erhitzung fand bei einem Teil der Proben eine halbe Stunde, bei einem andern Teil das erste Mal eine halbe Stunde und ein zweites Mal eine Stunde im Dampftopf statt. Einen wesentlichen Unterschied in der Wirkung zwischen den erhitzten und den nichterhitzten Proben konnte ich nicht bemerken. Vielleicht hatte eine geringe Abschwächung stattgefunden, die sich aber nur darin kundgab, daß bei einigen Proben auf dem erhitzten Agar nach gleicher Beimpfung etwas mehr Typhuskolonien aufgegangen waren als auf dem nichterhitzten. Niemals jedoch konnte ich feststellen, daß nach der Erhitzung Colibacillen, bzw. *Bacillus Proteus*, *Bacillus enteritidis* (Flexner), *Bacillus faecalis alcaligenes* oder Coccen zur Entwicklung gelangt wären, wenn diese Mikroorganismen auf nichterhitztem Agar von der gleichen Zusammensetzung nicht gewachsen waren. Selbstverständlich hatte ich zu diesen Versuchen Farbstoffkonzentrationen möglichst nahe dem Grenzwert der zur Hintanhaltung des Coliwachstums nötigen Malachitgrünmenge gewählt.

Nach dem Gesagten glaube ich mich berechtigt, zur Erzielung gleichwertiger Nährsubstrate und damit im Interesse einer Arbeitsvereinfachung an Stelle der bisher in Gebrauch befindlichen, unreinen Präparate eine der eben angeführten, technisch reinen Malachitgrünmarken entweder allein oder in Verbindung mit einem abschwächenden Zusatz ebenfalls in Form eines reinen Präparates in Vorschlag zu bringen.

Auch bei Verwendung dieser Farbstoffe ist peinlich genaue Einhaltung der Vorschriften bezüglich der Zusammensetzung und der Reaktion des Agars sowie der Qualität und Menge der abschwächenden Zusätze unerläßliche Vorbedingung zur Erzielung gleichmäßiger Resultate. Um eine Schädigung des Typhusbacillus nach Tunlichkeit auszuschalten, erschien es mir zunächst am besten, den Malachitgrüngehalt des Agars möglichst niedrig zu wählen und das Typhuswachstum durch einen geringen Dextrinzusatz außerdem noch zu fördern. Folgende Zusammensetzung habe ich von diesen Erwägungen ausgehend einer näheren Prüfung unterzogen, indem ich mich bei der Herstellung des Agars im wesentlichen an die Vorschriften Loefflers¹⁾ hielt:

In 100 ccm Bouillon (2 Liter Wasser auf 1 Pfund Rindfleisch) wurden 0,5 Gramm Kochsalz, 1 Gramm Dextrin und 3 Gramm Agar gelöst, der Dextrin-Bouillon-Agar für Lackmus neutralisiert und weiter 0,5 ccm Normalnatriumkarbonatlösung und 10 ccm einer 10%

Nutroselösung zugesetzt, das Ganze nochmals aufgeköcht, filtriert und sterilisiert und zum Schlusse mit 1,6 (— 1,8) ccm einer 0,1% Malachitgrünlösung versetzt.

Durch den Zusatz des Dextrins zur Bouillon vor der Neutralisation des Agars dürfte allerdings die zum Schlusse resultierende Reaktion dieser Zusammensetzung nicht ganz die gleiche sein, wie die des Löfflerschen Malachitgrünagars, da Löffler das Dextrin-haltige Malachitgrün 120 (Höchst) erst zum Schlusse, also nach der Neutralisation und Alkalisierung des Agars zusetzt. Ich habe mich jedoch durch eigene Versuche über die günstigste Reaktion überzeugt, daß man auch bei Verwendung der technisch reinen Malachitgrünpräparate und Herstellung des Malachitgrünagars in vorbeschriebener Weise bei dem von Löffler geforderten Alkaligehalt verbleiben kann. Er hat sich mir in bezug auf Ueppigkeit und Eigenartigkeit des Typhuswachstums und Hintanhaltung der Entwicklung des Colibacillus als der vorteilhafteste bewiesen.¹⁾ Der Nutrosezusatz kann — sofern auf Vereinfachung des Nährbodens Gewicht gelegt wird — ohne allzu weitgehende Beeinträchtigung des Typhuswachstums eventuell durch Erhöhung des Dextrin gehaltes (etwa 2—2½ %) entbehrlich gemacht werden.

Auf einem Dextrin-Nutrose-Bouillon Malachitgrün-Agar von der eben beschriebenen Zusammensetzung gelangt der Typhusbacillus in der von Löffler beschriebenen Weise zur Entwicklung: nach 24 Stunden kleine, zum größten Teil glattrandige, sehr durchsichtige, wassertropfenähnliche, zum Teil aber auch krustige Kolonien bildend.

Die mikroskopische Untersuchung dieser Kolonien ergibt vorwiegend Individuen von gewöhnlicher Form und Größe. Dagegen ist die Beweglichkeit meist herabgesetzt. Stärkere Fadenbildung, die ich ebenso wie Klinger bei höheren Konzentrationen des Malachitgrüns beobachten konnte und die von diesem Autor als Kriterium für die stattgehabte Schädigung unseres Bacillus angenommen wird, konnte ich bei der Konzentration, wie sie in unserer Zusammensetzung gegeben ist, nicht wahrnehmen.

Paratyphus (besonders Typus B) gelangt zu üppiger Entwicklung, während das Coliwachstum in der Regel vollständig ausbleibt. Bezüglich des Verhaltens der übrigen einer Prüfung unterzogenen Mikroorganismen braucht dem oben Gesagten nichts zugefügt zu werden.

Außer mit Reinkulturen wurde diese Zusammensetzung auch mit drei Typhus-Stühlen geprüft, von denen der eine auf drei gleichzeitig beimpften Lackmus-Nutrose-Agar-Platten nur eine Typhuskolonie neben sehr zahlreichen Colibakterien ergeben hatte. Bei diesem, sowie bei den beiden anderen, die auch schon auf dem Drigalski-Conradischen Nährboden reichlicheres Typhuswachstum gezeigt hatten, erhielt ich auf den Malachitgrünagarplatten Reinkulturen von Typhusbacillen.

Noch eine zweite Kombination des Malachitgrün-Nutrose-Dextrin-Agars ist für praktische Untersuchungen eventuell von Wert. Fügt man bei stärkerem Dextrin gehalt (etwa 4—5 %) des Agars diejenige Malachitgrünmenge zu, welche etwa in der Mitte liegt zwischen den zur vollständigen Coli-, bzw. Typhushemmung nötigen Malachitgrünwerten, so wird eine derartige Zusammensetzung nach dem oben Ausgeführten (Tabelle II) bei gutem Wachstum der Typhusbacillen das Aufkommen der Coli-Kolonien noch sicherer verhindern lassen.

Welche von diesen beiden Kombinationen für die Praxis die geeignetste ist, kann nur an einem großen Material, wie es ausschließlich den Typhus-Untersuchungsstationen zur Verfügung steht, und durch ausgedehnte vergleichende und Zählversuche festgestellt werden.

¹⁾ Dagegen dürfte bei Verwendung von Pepton oder Traubenzucker zur Abschwächung nach meinen bisherigen Beobachtungen eine etwas geringere Alkalisierung des Agars zweckmäßiger sein.