Versuche über die Sporenbildung bei Xerosebacillen, Streptokokken und Choleraspirillen.

Von

Prof. Albert Neisser
in Breslau.

Es war ursprünglich nicht meine Absicht, schon jetzt meine Untersuchungen über den vorliegenden Gegenstand mitzutheilen; seit länger denn Jahresfrist mit der sogenannten „Coccothrix“-Frage beschäftigt, wollte ich das den „Arthrosporen“ und „Gonidien“ gewidmete Capitel auch erst zu einem gewissen Abschluss bringen. — Ich sehe mich jedoch durch die soeben erschienene, mir vor Kurzem freundlichst zugesandte Arbeit von Ernst¹ veranlasst, das, was mir durch meine diesbezüglichen Studien bekannt geworden ist, jetzt zu publiciren. Theils sind mir die Resultate der Ernst'schen Arbeit bereits wohlbekannt gewesen — Herr College Ernst wird sich aus den ihm sofort zugesandten mikroskopischen Präparaten, die aus den Jahren 1884 und 1887 herkommen, davon überzeugt haben — meine Arbeit wird demgemäss als Bestätigung hoffentlich nicht unwillkommen sein, theils glaube ich einige Punkte noch weiter, als Ernst, festgestellt zu haben.

Auch ich war ursprünglich von den Xerosebacillen ausgegangen; es sei mir gestattet, über diese einige Worte zu sagen.

Seit dieselben von mir 1882 (Sitzung d. schles. Ges. f. vaterl. Cultur, 21. Juli; *Bresl. ärztl. Zeitschr.* 1883, 4) beschrieben worden, sind sie in ihrem Aussehen, in ihrer Constanz u. s. w. von allen Nachuntersuchern bei der Xerose bestätigt worden. Nur ist der diesem Befunde von Kuschbert und mir zugeschriebene Werth, die Bacillen als pathognostisch und event. als ursächlich für die typische Xerose aufzufassen, bezweifelt

¹ Siehe Literaturverzeichniss am Schlusse. (*Diese Zeitschrift.* 1888. Hft. 1).

worden, und zwar aus dem Grunde, dass sich entsprechende Bacillen auch bei anderen schaumigen Secreten der Conjunctiva ohne Xerose vorfinden. Besonders waren es E. Fränkel und Franke, welche nicht nur mikroskopisch, sondern auch durch Cultur-Vergleiche die Identität der theils von echter Xerose, theils aus anderen schaumigen Conjunctivalsecreten herrührenden Bacillen festgestellt haben.

Diese thatsächlichen Angaben zu kritisiren, bin ich aus Mangel an eigenen Nachuntersuchungen nicht in der Lage. Wie weit man aber bei der Annahme, dass klinisch total verschiedene Zustände dieselben Mikroorganismen aufweisen, berechtigt ist die Schlussfolgerung zu ziehen — wie Fränkel und Franke es gethan haben — dass ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den Bacillen und den Krankheitsprocessen bestehe, dies zu untersuchen bin ich nicht in der Lage. Es wird Sache des Ophthalmologen sein, festzustellen, ob man es wirklich bei dem schaumigen Secrete einer- und den xerotischen Veränderungen der Conjunctiva andererseits nur mit einem klinisch differentem Zustande einer und derselben, durch den beschriebenen Bacillus hervorgerufenen Erkrankung zu thun hat.

Ich für meinen Theil könnte also, da die pathogene Natur der Xerosc-bacillen zugestanden ist, zufrieden sein; jedoch glaube ich, dass man nach unserem jetzigen Standpunkte noch nicht so weit gehen darf. Fehlt doch vor der Hand jeder sichere Beweis, wie ihn eigentlich nur die künstliche Erzeugung der Krankheit durch Impfung erbringt. Dagegen bestehen zur Zeit noch allerlei Zweifel:

1. über die — von Fränkel-Franke behauptete — Identität der Xerose- und der sonstigen Conjunctival-Schaum-Bacillen;

2. diese Identität vorausgesetzt, über die Berechtigung die klinisch bisher auseinander gehaltenen Zustände zusammenzufassen;

3. schliesslich aber darüber, ob denn überhaupt die Bacillen nicht nur zufällige, allerdings merkwürdig constante Ansiedler sind.

Ich stimme also — ohne dass man bei mir böswillige Skepsis voraussetzen wird — am meisten mit Eugen Fick überein, ohne aber diesem Autor, der mehr auf Speculationen, als auf eigenen Nachuntersuchungen fusst, damit ein berechtigtes Urtheil über diese Frage zusprechen zu wollen. Denn dass es unmöglich ist, mit Messungen über Breite und Länge — selbst bei sorgfältigster Arbeit eines und desselben Untersuchers, geschweige denn bei den Angaben verschiedener Beobachter — Identität oder Verschiedenheit von Bakterien festzustellen, betont Fick ja selbst; aber zu einer so absprechenden Kritik, wie der seinen, bedarf es doch mehr, als mikroskopischer Betrachtung und eines verunglückten Culturversuches an einem Falle. —

Auch ich halte die Xerosefrage für noch durchaus ungelöst, aber so einfach, wie Fick es sich vorstellt, sind die Bacillen doch nicht als überwundener Standpunkt bei Seite zu schieben.

Charakteristisch galt bisher — abgesehen von der Constanz — wesentlich eine bis dahin unbekannte, 1883 von mir als „Gonidienbildung“ beschriebene Art der Fortpflanzung. Meine damalige Beschreibung lautet:

Es wurden auf Blutserum-Gelatine mit geglühten Platinnadeln strichförmig minimale Mengen des abgekratzten Conjunctivalbelags übertragen. Schon am nächsten Tage (bei einer Brüttemperatur von 37—39° C.) zeigten sich an sämtlichen Impfstichen — bei sämtlichen sehr zahlreichen Controlversuchen ausnahmslos — auf der Oberfläche des Serums den Strichen entsprechende trockene, fettig glänzende, etwa 2—3 mm breite, weissliche Streifen. Dieselben waren nicht ganz eben und gleichmässig, sondern zeigten kleine, sandkornartige, separate Anhäufungen am Rande der streifenartigen Wucherungen. Dieser selbe Vorgang wiederholt sich in absolut identischer Weise bei weiteren Uebertragungen von Serum auf Serum, die bis in die 15. Generation fortgesetzt wurden.

Im Verlaufe weiterer Tage ist die Zunahme der an demselben Impfstich entstehenden Masse eine verhältnissmässig geringe. Breite wie Höhe der Striche nehmen nur wenig zu. Schliesslich scheint eine Vertrocknung der ganzen Masse einzutreten; doch lässt sich dieselbe nachträglich noch lange Zeit auf frisches Serum mit Erfolg überimpfen.

Die mikroskopische Untersuchung dieser Impfstiche ergab nun, dass die an ihnen angehäufte weissliche Masse ganz und gar aus Bakterien bestand, welche sich gewöhnlich in keiner Weise von den direct von der Conjunctiva entnommenen unterschieden.

Es stellte sich dabei zugleich heraus, dass die Vermehrung dieser Bakterien in zwei verschiedene Modis erfolgen könne, in dem Maasse verschieden, dass erst die fortgesetzte lange Untersuchung und immer wiederholte Nachprüfung mich davon überzeugte, dass nicht zufällige Verunreinigungen die Eigenartigkeit des Bildes hervorriefen, sondern dass wir es wirklich mit einem unter gewissen Umständen eigenthümlichen Wachsthumverhalten dieser Bacillen zu thun hätten.

Die Untersuchung zahlreicher, dem Auge direct entnommener Bacillenpräparate und die Vergleichung der einzelnen dadurch gewonnenen Bilder hatte bereits ergeben, dass die Bacillen auswachsen und in diesen kleinen Fäden eine zweitheilige Gliederung auftritt und schliesslich die einzelnen Glieder als kleine, verhältnissmässig kurze Einzelbacillen selbstständig werden. Viel seltener sieht man längere Fäden und mehr Theilglieder in denselben. Die auswachsenden Fäden liegen dabei ziemlich in derselben Richtung mehr oder weniger parallel, so dass man häufig Gelegenheit hat, in regelmässigen Streifen angeordnete Gruppen von Bakterien zu sehen.

Dieser selbe Vorgang konnte nun in identischer Weise auch in Culturen beobachtet werden, nur dass in denselben die Theilung sehr viel rascher und früher von statten ging, so dass man nur zweigliedrige, ganz kurze und etwas breitere, stäbchenförmige Gebilde zu sehen bekam, die an den beiden Enden etwas zugespitzt waren.

Es stellte sich jedoch heraus, dass neben dieser directen Theilung es noch einen anderen Fortpflanzungsmodus dieser Bacillen gäbe, den ich auf die veränderten äusseren Bedingungen: höhere Temperatur, grössere Feuchtigkeit etc. beziehen zu müssen glaube. Ich bin vor der Hand nicht in der Lage gewesen, diese ursächlichen Verhältnisse genau festzustellen. Dieser Modus besteht darin, dass der einzelne Bacillus zu einer langen, 6—8 und mehrgliedrigen Kette von immer breiter werdenden scheibenartigen Theilen auswächst. Das letzte Glied — je nachdem das Auswachsen an einem oder an beiden Enden erfolgt — an einem oder beiden Enden der Reihe ist von birnförmiger Gestalt und ist in allen Durchmessern mindestens doppelt so gross, als das schmale, dem ursprünglichen Bacillus entsprechende Anfangsglied. Die dazwischen gelegenen Glieder stellen allmähliche Uebergangsformen dar; sie sind stets, wie schon erwähnt, breiter als lang, so dass ein ganzes derartiges Gebilde den Eindruck einer Keule macht, welche in schmale Scheiben zerschnitten ist. Anfangs liegen diese schmalen Theilglieder dicht an einander gepresst; allmählich rücken sie auseinander, und jedes einzelne kleine Theilglied wächst wieder zu einem neuen Bacillus aus. Die Wachstumsrichtung dieser Theilglieder steht aber senkrecht auf derjenigen, in welcher sich der einzelne Bacillus zu der beschriebenen keulenförmigen Kette ausbildete. Daher kommt es denn auch, dass man keine langen Reihen aus hinter einander gelagerten einzelnen Bacillen findet, sondern mehr oder weniger zu grossen Quadraten vereinigte Haufen der einzelnen Theilglieder.

Diese Formen sind nun sowohl von Fränkel-Franke als besonders von Ernst bestätigt worden. Wesentlich Neues (abgesehen von der Doppelfärbung) haben letztgenannte Autoren nach dieser Richtung hin nicht beigebracht. — Was die Deutung dieser von mir als Gonidien bezeichneten Gebilde anlangt, so hat Ernst allerdings als erster die Anschauung publicirt, dass eben diese keulenförmige Anschwellungen im Zusammenhange mit einer Sporenformation stehen; ich hatte früher eine Sporenformation zwar auch bereits beschrieben,¹ aber getrennt von der Gonidienform. Auch jetzt bin ich der Ueberzeugung, dass beide Vorgänge als im Wesen verschiedene aufzufassen sind; nur sind sie häufig combinirt.

Eine fernere Eigenthümlichkeit der Xerosis-Bacillen schien darin zu liegen, dass weder mir noch Schleich noch Fränkel-Franke noch Ernst (bis auf eine Ausnahme) es gelang, Culturen direct auf Agar-Agar anzulegen.

¹ In meiner ersten Mittheilung (*Breslauer ärztliche Zeitschrift*. 1883. Nr. 4) hatte ich eine Sporenformation nur „mit Unsicherheit“ hinstellen können. Erst in der von Kuschbert 1884 veröffentlichten Arbeit hatte ich neben der bisher beschriebenen Form der Fortpflanzung eine Sporenbildung genauer und sicher beschrieben: „kleine kuglige Anschwellungen gewöhnlich an beiden Enden eines Bacillus, getrennt durch eine schwächer gefärbte Zone.“

Beide Argumente dürfen jedoch keine besondere Beweiskraft beanspruchen.

Erstens stellt sich heraus, dass die Gonidienform — es sei mir gestattet, diese Bezeichnung für die keulenartige Wuchsformen vor der Hand beizubehalten — an sich nichts Charakteristisches für Xerosis-Bacillen ist, nicht einmal für die von Fränkel-Franke gezüchteten Conjunctival-Bakterien. (Es fehlen freilich nach dieser Richtung genauere Angaben seitens der genannten Autoren.)

Mit Recht macht Hüppe (wie es auch mir sofort aufgefallen war) bei Gelegenheit der von Bordoni-Uffreduzzi beschriebenen und abgebildeten Leprabacillen-Culturen auf die Aehnlichkeit der gezüchteten „Lepra“-bacillen mit den Xerosis-Bacillen aufmerksam. — Er erwähnt dabei, dass Metschnikoff wie er selbst bei einer saprophytischen Art ähnliches gesehen und demonstriert habe.

Ich selbst nun habe ausser bei Xerose diese Formen gesehen und cultivirt: 1884 zweimal aus dem Secret von Ulcera molliä, 1885 aus den Krusten einer Vaccinationspustel, 1887 zweimal aus dem Schleim der Vagina, dreimal aus dem eitrigen Belag grosser Unterschenkelgeschwüre. — Mikroskopisch gefunden wurden sie noch als Nebebefund in tuberculösem Sputum.

Die „Gonidienformation“ bietet also nichts Charakteristisches.

Wie steht es mit der Eigenthümlichkeit nur auf Serum zu wachsen?

Auch hier fehlen noch typische, ausschlaggebende Befunde.

Ich selbst kann betreffs der Xerosebacillen nicht mehr angeben — ich habe es vergessen — ob ich dies Verhalten überhaupt geprüft habe. Aber Ernst betont ausdrücklich — meinen und Fränkel-Franke's Angaben gegenüber —, dass ihm eine primäre Agar-Agarcultur angegangen sei. Abimpfungen von primären Serumculturen auf Agar-Agar sind uns allen geglückt, aber in entschieden spärlicher Weise.

Aber auch bei einigen der von mir gezüchteten Arten stellten sich wenigstens ähnliche Verhältnisse und Differenzen heraus.

Während die aus den Ulcera cruris, aus der Vagina gezüchteten sehr üppig sofort auf Agar-Agar sich entwickelten, ebenso die aus Vaccinekrusten, findet sich über die Ulcus-molle-Bakterien folgendes Protokoll:

16. Mai 1884. Aus dem gereinigten Geschwürsgrunde werden kleinste Partikelchen auf Blutserum aufgetragen. Temperatur des Ofens 37,6°.

17. und 18. Mai 1884. Von Entwicklung nichts zu bemerken.

19. Mai 1884. Es finden sich drei Arten von Culturen: 1. leicht abstreifbarer ockergelber Belag (*Staphyl. pyog. aur.*); 2. weisser, feuchter, abstreifbarer Belag; *Semmelkokken*; 3. drei kleine durch Erweichung

des Blutserums entstandene Grübchen ohne sichtbaren Belag. — Dieselben werden auf Gelatine verimpft.

Daraus entwickeln sich auf Gelatine, wie später auf Agar-Agar, ganz unscheinbare, graue aus Pünktchen sich zusammensetzende farblose, ganz durchscheinende Beläge, langsam wachsend. — Mikroskopisch waren typische Gonidienformen vorhanden.

Ein zweites Protokoll (Ulc. molle 3./III.) bezeichnet die Agarbeläge als „Schleier“, kurz auf Agar-Agar dieselben Resultate, wie Fränkel-Franke bei Xerosis-Bacillen.

Will ich aber auch zugeben, dass diese Eigenschaft auf Serum so viel leichter zu wachsen, bis jetzt mehr den Xerosis-Bacillen als den anderen Gonidien-Bacillen zukommt, so fehlt doch noch eine darauf speziell gerichtete experimentelle Prüfung; um so mehr, als Jeder weiss, welche Rolle für Wachsen oder Nichtwachsen auf gewissen Nährböden selbst unscheinbare Differenzen in der Zusammensetzung spielen können, was ein Mehr oder Minder an Alcalescenz oder Feuchtigkeit etc. bedeutet. —

Mehr aber als diese die pathologische Stellung der Xerosis-Bacillen betreffende Frage interessirte mich — wie Ernst — das Problem: was bedeuten die keulenförmigen Wuchsformen, die sogen. Gonidien? sind es eine eigenartige Wuchsform? oder Sporen im engeren Sinne, also endogene, neu im Bacillus entstandene Dauersporen? oder sind es eine Art „Arthrosporen“ im De Bary-Hüppe'schen Sinne, d. h. mit einer gewissen reproductiven Function ausgestattete modificirte Bacillenglieder?

Von diesem Gesichtspunkte aus wurde ich auf die bei mehreren anderen Untersuchungen als Nebenfunde aufstossenden Gonidien-Bacillen der Vagina und der Ulcera cruris, wegen ihrer frappanten Aehnlichkeit mit meinen alten Xerosis- und Ulcus molle-Culturen aufmerksam. Meine neueren systematischen Untersuchungen betreffen nur die ersteren; ich glaube aber aus der mikroskopischen Uebereinstimmung dieser und der Xerosis- und Ulcus molle-Culturen (an alten ungefärbt aufgehobenen Präparaten) in allen Entwicklungsstadien annehmen zu dürfen, dass alle zum mindestens nahe verwandten Species angehören.

Ich gebe nun in möglichster Kürze die Resultate meiner viel hundertfach angestellten, nach allen Richtungen hin variirten und stets bis zu einer möglichsten Uebereinstimmung wiederholten Untersuchungen:

1. Die Bacillen sind kurze und schmale — etwa 4mal so lang als breit — in frischem Zustande bewegliche¹ und gleichmässig glänzende Stäbchen. Ungefärbt ohne weitere Besonderheiten, zeigen sie bei Tinc-

¹ Die Xerosebacillen sind nach Fränkel-Franke und Ernst ohne Eigenbewegung.

tionen, dass in fast allen Bacillen bereits eine Theilung besteht, theils eine helle Lücke in der Mitte des Bacillus, theils eine vollkommene Trennung in zwei kurze, fast quadratische Hälften. Doch bleibt auch in den gefärbten Präparaten stets die Zusammengehörigkeit beider Hälften zu einem Bacillus, der von einer schmalen Hülle umgeben ist, deutlich. — Der helle Zwischenraum ist keine Spore; nur in den allerersten Anfängen der Theilung ist derselbe kugelig, nachher findet man die beiden einander zugewandten Enden der Bacillentheile convex, sich in den hellen Zwischenraum hinein vorwölbend.

Dieser Fortpflanzungsmodus durch Theilung ist nicht der gewöhnliche; nur unter ungünstigen Bedingungen, wesentlich Sauerstoff-Armuth (z. B. in der Tiefe von Gelatine-Stich-Culturen, bei ölübergossenen Agarculturen) ist er von Bedeutung. Sonst findet die Vermehrung statt auf dem Wege der Sporenbildung.

2. Die Sporenbildung zeigt zwei Modi.

a) Entweder verlängert sich ein (einheitlich bleibender) seitlich scharf begrenzter Bacillus etwa auf das zwei- bis dreifache und zeigt an beiden Enden scharf sich absetzende, glänzende, etwas aufgetriebene, bei Färbungen distinkt sich abhebende Kügelchen,

b) oder man findet ein Auswachsen der Bacillen zu 3—4—6mal so langen und reichlich doppelt so breiten Fäden, die nach den beiden Enden zu allmählich sich verbreitern. — Auch diese ausgewachsenen Bacillen haben Eigenbewegung, wenn auch eine langsamere als die kurzen.

Diese Fäden (b) bleiben entweder homogene blasse, scharf begrenzte Gebilde, gerade oder leicht gekrümmt

oder es trennen sich im Faden ganz blasse Bezirke von scharf vortretenden Körnern. Der Eindruck eines scharfen Seitenrands geht bei der Färbung fast verloren, man könnte beinahe von Körnerfäden oder „Coccothrix“ sprechen; aber ungefärbte Präparate zeigen deutlich den einheitlichen bacillären¹ Charakter des ganzen Gebildes.

Die Körner eines solchen verlängerten Bacillus, 3—6 an der Zahl, in ziemlich regelmässigem Abstand von einander befindlich, bleiben nun

¹ Es scheint mir wichtig, die Einheitlichkeit des ganzen Gebildes zu betonen, seitdem Unna selbst den Lepa — ich muss wohl sagen — Bacterien ihren bacillären Charakter abspricht. Dass bei letzteren häufig „Körner“ durch eigenthümliche chemische Einwirkungen sich herstellen lassen, ist ja längst bekannt; dass aber diese „Körner“ nur Bacillentheile sind und nicht selbstständige „Kokken“, die nur zu einem „Faden“, einem „Coccothrix“ aufgereiht sind, ist meiner Ueberzeugung gemäss aus allen möglichen hier nicht zu erörternden Gründen entschieden festzuhalten. — Nicht ganz sicher bei Lepa- wie Tuberkelbacillen scheint mir nur die Sporenfrage. Gerade meine obigen Untersuchungen machen Zweifel rege, ob die hellen ungefärbten Stücke im Tuberkel- bez. Leprabacillus wirklich Sporen seien.

entweder alle gleich breit und gross,

oder sie werden von der Mitte des Fadens aus nach einem oder nach beiden Enden zu allmählich bis zu einem solchen Grade breiter und dicker, dass das meist birnenförmige Endglied schliesslich einen mindestens doppelt so grossen Durchmesser zeigt, wie vorher. Die Mittelkörner werden dabei platter, rücken näher aneinander, gleichen mehr „Scheiben“, als runden Körnern. Sind die Fäden mit ihren keulen- oder birnenförmigen Anschwellungen nicht gerade, sondern „hornartig“ gekrümmt, so nehmen auch die Körner eine entsprechende sectorenartige Keilform an.

Alle, auch noch so merkwürdig gekrümmten, verdickten, in der Länge wechselnden Fäden stellen ein Ganzes dar; die Körner liegen in einer zwischen denselben sichtbaren und das Ganze hüllenartig umschliessenden Grundsubstanz, deren Existenz durch Färbung leicht nachzuweisen ist.

Diese Körner, mögen sie zu zweien nur endständig stehen, oder zu 3—6 in längerer Reihe sich vorfinden, sind meist thätig bei der Vermehrung und Fortentwicklung.

Sie wachsen zu neuen Bacillen aus und zwar, woran ich mit Sicherheit festhalte, in der auf dem ursprünglichen Sporenfaden senkrechten Richtung. Ich schliesse das aus den in jedem Präparate sichtbaren parallelen, gleichlangen Bacillengruppen. Noch beweisender sind Bilder von 3—4 „Körnern“, welche als erste Anfänge der Bacillen ganz kurze Ansatzstücke zeigen. Es können das nach allen meinen immer wiederholten Prüfungen nicht kurze „Bacillen mit Körnern“ sein, sondern nur auswachsende Körner. — Jeder Zweifel aber wird durch die weiterhin bei der Keulenbildung zu besprechenden Erscheinungen beseitigt. —

Die Körnerbildung selbst ist unabhängig von der keulenartigen Verdickung des bacillären Fadens; letztere kann die Körnerbildung begleiten oder nicht. Ich halte diese Keulenform jedoch nicht ohne Weiteres für einen Degenerationsvorgang, wie Fränkel und Franke¹; ich werde später ausführlich auf diese Frage einzugehen haben.

Wir haben also vier Erscheinungen bei diesen Bakterien gezeichnet:

1. Kurze Bacillen mit ihren Theilungsvorgängen.
2. Auswachsen der Bacillen zu längeren Fäden.
3. Auftreten von „Körnern“ am Ende und im Verlauf des Fadens.
4. Die Keulenbildung.

¹ Fränkel-Franke arbeiteten mit Xerose-Culturen, die allerdings auf Agar schlechter gediehen als auf Serum und nur auf Agar sahen sie die „Keulen“. Ich dagegen fand die „Keulen“ auch in den üppigst wuchernden Culturen.

Der erste und zweite Punkt bedarf einer besonderen Besprechung nicht. Dagegen verlangen sowohl die „Körner-“, wie die „Keulenbildung“ und ihre Beziehungen unter einander eine eingehendere Untersuchung.

Zu diesem Zwecke muss ich die einzelnen im Laufe der Untersuchungen gewonnenen Einzelresultate mittheilen.

I. Verhalten der Culturen auf verschiedenartigen Nährböden.

A. Agar-Agar (gewöhnliche Zubereitung), Reaction: neutral. — Nach 24 Stunden zeigt sich bei Brütotemperatur ($37,6^{\circ}$) ein dünner, weisslich-grauer Belag, durchscheinend, abstreifbar, feucht, etwas zusammenklebend. — Derselbe wird im Laufe der nächsten Tage dicker, dichter, undurchsichtig und bekommt einen leicht bräunlichen Schimmer. — Der ursprünglich angelegte Impfstrich behält seine Breite; eine diffuse Verbreitung findet nicht statt.

Auf einer Agar-Agar-Platte angelegte und gewachsene Strichculturen zeigen bei mikroskopischer Betrachtung überall kleine serpiginöse Ausbuchtungen am Rande, aus dem — je nach dem Alter der Cultur — theils die kleinen Bacillen, theils längere Körnerfäden herauswachsen.

Änderungen der Reaction haben keinen wesentlichen Einfluss. Deutlich alkalische, wie saure (Milchsäure) ergeben durchaus gleich üppige Culturen. Erst bei ziemlich hohen Säuregraden tritt Verminderung, bez. Aufhören des Wachstums auf.

Entschieden schöner und schneller, dicker und üppiger wachsen die Culturen auf Agar (2%) — Gelatine (1%) — Glycerin ($7\frac{1}{2}\%$). Auch hier kann die Reaction, analog einfachem Agar-Agar, wechseln; alkalische ist am besten.

Die Temperatur anlangend, so ist Brütotemperatur von $37,6^{\circ}$ entschieden viel günstiger, als eine zwischen 16 — 18° schwankende Zimmertemperatur. Die Schnelligkeit des Wachstums bleibt bei letzterer bedeutend zurück; sonst wenig schädliche Verhältnisse (saure Reaction, Trockenheit des Nährbodens) machen sich dann sehr deutlich bemerkbar.

B. Gelatine, stets bei Zimmertemperatur benutzt, ergiebt sowohl auf schräger Oberfläche als im Stich deutliches Wachstum. Auf der Fläche entsteht ein sich nur mässig verbreitender grauweisslicher, dicker, allmählich bräunlich sich verfärbender Bezirk mit serpiginösem Rande. Der Stich ist ein dichtes Agglomerat einzelner kugliger Herde, wie makroskopisch sowohl, als auch auf Gelatineschnitten zu erkennen ist. Auch seine weisse Farbe wird allmählich bräunlich. —

Verflüssigung findet nicht statt.

In flüssiger Gelatine (im Brütoven) ist die Vermehrung sehr reichlich.

C. Blutserum erwies sich als ein sehr geeigneter Nährboden, der in wenigen Tagen, entsprechend den Impfstrichen sich mit einem reichlichen feuchten weissen Belag bedeckte (also verschieden von den Serum-Culturen der Xerosebacillen).

D. Auf Kartoffeln findet sich bereits nach 24 Stunden ein gelblich-bräunlicher, auf die Impfstellen beschränkter, wenig feuchter Belag.

E. Brühen, aus Fleischinfus, wie aus Fleischpeptonen hergestellt, zeigen bei 37° Temperatur eine allmähliche Trübung, die sich am Boden als flockiger, nicht Faden ziehender Belag niederlässt. — Die Reaction (neutral, alkalisch, sauer) spielt bei höherer Wachstumstemperatur keine wesentliche Rolle, falls die Reaction nicht zu stark sauer ist. — Bei Zimmertemperatur ist das Wachstum sehr mässig.

Eine Säurebildung durch das Bacterienwachstum findet nicht statt. Mit Säurefuchsin versetzte alkalische Gelatinen, die demgemäss farblos sind, werden nicht roth, was Wiedereintreten einer sauren Reaction bezeichnet haben würde.

II. Wie ist das mikroskopische Verhalten?¹

Hier ergibt sich zunächst, dass die Färbung zur Förderung der schwebenden Fragen eine ganz wesentliche Hülfe gewährt.

1. Wässriges Methylenblau mit Abspülen in Wasser ergibt eine gleichmässig matte Tinction aller Formelemente, ohne stärkere Her-

¹ Es hat mich stets und so auch jetzt bei der Lectüre der Ernst'schen Arbeit gewundert, welche Schwierigkeiten sich die Mikroskopiker bei Herstellung der Trockenpräparate durch die Benützung von Deckgläschen machen. Die Herstellung solcher Präparate bedarf grosser Vorsicht, damit das Gläschen nicht zerbricht; bei der Erwärmung ist ein Verbrennen nur durch besondere Aufmerksamkeit zu vermeiden; sodann muss das Deckglas auf ein Objectglas gelegt werden; nimmt man dazu nur Wasser, so ist das Bild bei unseren Oel-Immersionen nicht scharf; nimmt man Oel, so haftet namentlich bei zähflüssigem Oel zur Immersion das Gläschen an der Linse; Canada-Einschluss ist zeitraubend und — da nicht alle Präparate aufgehoben werden — kostspielig. — Seit 11 Jahren benütze ich nun stets Objectträger: auf denselben wird der Eiter, die Cultur u. s. w. bequem verstrichen; sie zerbrechen nicht, ein Verbrennen des Trockenbelags findet nur bei grösster Unachtsamkeit statt; die Färbung, das Abspülen ist denkbar bequem; nach dem Trocknen bringe ich einfach einen Tropfen Oel auf das gefärbte Präparat, in welchen ich die Linse direct immergiere.

Wenn man will, kann man die — durch Aether wieder vom Oel gereinigten — Präparate ohne weitere Einbettung aufheben, sofern man sie nur vor Staub schützt.

Freilich sind für feine mikroskopische Untersuchungen Deckgläser besser (für photographische Zwecke), aber für den täglichen Bedarf (von 100 und mehr Gonorrhoe-Untersuchungen oder Durchsuchung von Culturserien) habe ich seit 11 Jahren nie anders als mit Objectträgern, stets ohne Schaden, schnell und bequem gearbeitet.

vorhebung einzelner Körner. Deutlich sichtbar ist in schwächerer Nuance die bläuliche Grundsubstanz (Zwischenraum) und der Mantel um die Bacillenglieder.

Aehnlich verhalten sich wässrige Fuchsinlösung, stark essigsaure Dahlia, wässriges Safranin, alkoholische Methylenblaulösung (beim Abspülen tritt eigentlich erst eine wässrige Farbstofflösung für kurze Zeit in Wirkung), Methylgrün, Aethylgrün, Wasserblau (6B extr. Berl. Fabr.), Spritblau (Stuttg. Fabr.), Säurebraun G. extra und Resorcinbraun (P.-A. 33 843) der Berl. Fabr. —

Wir haben also hier zwei Formelemente durch die Tinction (mehr oder weniger) getrennt: Grundsubstanz und Bacillus-Theile.

2. Eine gute, den Inhalt fast verdeckende Färbung der Grundsubstanz, bez. der Hülle ergaben Krystallviolett und Aethylviolett (beides sechsfach substituirte Pararosaniline). Der Bacillen-Eindruck war hier am deutlichsten. — Aehnlich verhält sich Benzylblau extra (Berlin). —

3. Die sulfosauren Farbstoffe, die rothen wie die blauen, sind als unbrauchbar zu bezeichnen.

4. Ganz anders verhalten sich die unter 1. genannten Farben bei Benutzung von Alkohol (sehr kurze Zeit) zur Entfärbung, oder: Löffler's Methylenblau mit Entfärbung in $\frac{1}{2}\%$ essigsäurem Wasser.

Es zeigt sich dann unter den einzelnen Bacillentheilen eine Scheidung zwischen matt und ganz intensiv gefärbten Stücken. Letztere entsprechen den oben erwähnten, auch in ungefärbten Präparaten bereits sichtbaren „Körnern“.

Noch deutlicher wird diese Differenz, wenn man intensiv, d. h. lange Zeit kalt, oder kurze Zeit heiss in Anilinwasser — Farblösungen färbt, vorsichtig mit entfärbenden Säuren nachbehandelt und mit einfachen wässerigen Lösungen einer Contrast-Farbe nachfärbt.

Unter all den (gegen 50) geprüften Varianten hat sich uns am besten bewährt:

1. Färben in erwärmten Carbolfuchsin, kurz abspülen in 1% wässriger Schwefelsäure, Nachfärben in wässrigem (oder Löffler'schem) Methylenblau.

2. Färben in erwärmter Ehrlich'scher Methylviolett-(Alkohol-Anilinwasser-)Lösung, kurz abspülen in 1% wässriger Schwefelsäure, Nachfärben in Säurebraun.

Es entstehen so Doppel-Färbungen, welche natürlich eine grössere Klarheit und Deutlichkeit bedingen.

Die Carbolfuchsin-Methylenblau-Färbung ist in der That eine echte Doppelfärbung. Dagegen ist die Methylviolett-Säurebraun-Combination

— ebenso wie die von Ernst benützte: Löffler's Methylenblau Bismarckbraun — eine Mischfärbung. Bei ersterer sind die einen Theile (Sporen) roth, die übrigen (Bacillen) blau. Bei letzterer aber behält die Spore die erst angewandte Farbe: violett (oder blau) bei, und nimmt noch ausserdem den nachträglich applicirten Farbstoff auf; es ergiebt sich aus dieser Summierung eine Combination zu Schwarzbraun, das hin und wieder einen etwas violetten Ton behält. Man kann auf Fliesspapier bez. im Reagensglas sich von dieser Combination überzeugen. In schwachen Lösungen summiren sich die Farben, in starken tritt eine Fällung ein. — Die Färbung ist hier also: Spore (violett-)schwarzbraun, Bacillus gelblichbraun.

Bei vielen Färbungen kann die Säure fortbleiben, z. B. giebt Anilinsaffranin — Alkoholabspülen — Wasserabspülen — wässriges Methylenblau ebenfalls distinkte Bilder. — Stärkere Säuregrade anzuwenden ist unrathsam. — Ebenso sind wässrige Säuregemische besser, als alkoholische; Schwefelsäure ist geeigneter, als Salz- oder Salpetersäure. — Gut brauchbar ist die Lustgarten'sche Färbung. — Die Gram'sche Methode giebt keine distinkten Bilder. — Mit Pyridin bereitete Farbstofflösungen ergeben nichts Brauchbares. —

Betreffs der Nachfärbung ergab sich für Carbofuchsin Methylenblau als die beste Farbe. — Unter acht braunen Farbstoffen der Berliner, Stuttgarter und Höchster Fabriken war das erwähnte Säurebraun (G. extra Berlin) bei weitem das Beste.

Das Resultat der erwähnten Färbungen ist nun ein höchst merkwürdiges und wegen des Auftretens aller nur denkbaren Uebergangsstufen und Variationen schwer zu deutendes.

Es zeigen sich nämlich drei verschiedene Formelemente:

1. Grundsubstanz, stets matt gefärbt im Tone der Nachfärbung;
2. Körner, intensiv gefärbt durch die Nachfärbung;

3. an Stelle einzelner Körner oder Bacillentheile Kugeln von runder oder ovaler Form, tingirt in der Hauptfarbe, demgemäss scharf roth bez. violett hervorleuchtend aus der blauen bez. braunen Grundsubstanz und der übrigen Körnerreihe. — Warum nicht in jedem Bacillus und warum nicht in jedem Korn eines Bacillus eine solche Umwandlung auftritt, ist nicht klar geworden.

Der Eindruck dieser Doppelfärbungsbilder ist ein so unmittelbarer, so den Doppelfärbungen sporenhaltiger Bacillen entsprechend, dass ich selbst anfangs — ganz wie Ernst — an der Diagnose: „Sporen“ nicht zweifelte. Alle meine diesbezüglichen Präparate des Jahres 1884 tragen die Bezeichnung: Bacillen sporentragend.

In der That ist eine Anzahl von Gründen vorhanden, welche schon mikroskopisch die Annahme „Sporen“ rechtfertigen würde:

1. Die „Sporen“ liegen, wo sie auch vorkommen — meist endständig, nicht ganz so häufig in der Mitte des Fadens — innerhalb des Mantels.

Sie entstehen sowohl im ungetheilten, mehr oder weniger ausgewachsenen Bacillus, als in den durch Theilung aus der eigentlichen Bacillus-substanz entstandenen Gliedern, den sogenannten „Körnern“. In allen jüngeren Culturen finden sich Exemplare mit feinsten rothen¹ Kügelchen inmitten des blauen Bacillen- (bez. Körner-) Protoplasmas ganz central oder (häufiger) excentrisch liegend an einer besonders intensiv gefärbten, die Spore halb umfassenden Protoplasamasse. — Allmählich wächst nun die Spore zu Kugeln, deren Durchmesser die Bacillenbreite übertrifft: die Sporen bilden also an den Enden oder auch im Verlauf des Bacillus (oder des Körnerfadens) kugelige Auftreibungen, stets seitlich begrenzt von der Bacillenmembran oder Hülle. — Sehr einfach und leicht zu deuten ist ein solches Bild bei den Sporen, deren Bacillus selbst noch eine ungetheilte homogene Masse darstellt. Sitzt aber jede „Spore“ in je einem Korn, die einzelnen Körner getrennt durch die Zwischensubstanz, so verschwindet für die oberflächliche Betrachtung schliesslich der Eindruck der „Spore im Bacillusglied“; man glaubt vielmehr einzelne, für sich isolirte, nur zu einem Faden vereinigte Glieder bald roth, bald blau gefärbt, vor sich zu haben. An die Stelle früherer (in jüngeren Culturen durchweg) blauer Bacillenstücke scheinen jetzt rothe Sporen getreten zu sein; auf dem Höhepunkt der Entwicklung sind fast alle Bacillentheile sporenartig tingirt; die zusammenhaltende Hülle wie die Grundsubstanz ist im Verschwinden und zuletzt liegen die Sporen thatsächlich frei.

In Brühen geht der „bacilläre“ Eindruck noch mehr verloren. Ich citire aus meinem Protokoll vom 28. October: Färbung mit Gentianaviolett im Tropfen (ein Tropfen verdünnter, in der Flasche noch durchscheinender wässriger Gentianaviolett-Lösung wird mit der Culturmasse verrieben, verstrichen und dann langsam getrocknet). Es finden sich grosse unregelmässig gestaltete „Schleimklumpen“, in denen von den Bacillen nur bei genauem Hinsehen noch etwas erkennbar ist, die intensiv gefärbten „Sporen“ aber deutlich hervortreten. Diese liegen meist an einem Ende des Schleimklümpchens. — Mit Methylenblau ist der Gegensatz der Grundmasse und des Bacillen-?, besser Sporenhäufchens noch deutlicher. — Ernst hat noch prägnantere Bilder vor sich gehabt, wie seine Fig. 8 beweist: „spärliche, aber immer dicht in Gruppen stehende blauschwarze

¹ Der Bequemlichkeit halber werde ich stets die Carbofuchsin-Methylenblau-Färbung der Beschreibung zu Grunde legen.

Körnchen, deren Einbettungsmasse den bacillären Charakter durchaus verloren hat“, in einer „undifferenzirbaren, zerfallenen, leicht krümeligen, pulpösen Masse“.

Ist das nun eine Umwandlung des Bacillus- (bez. Korn-) Protoplasmas in eine Spore — also eine Arthrospore, deren chemische Umwandlung durch die Färbung sichtbar wird —, oder ist es ein Auftreten einer neuen, chemisch-differenten „Spore“, also endogen, im Protoplasma?

Es war mir monatelang nicht möglich gewesen, für eine der beiden Auffassungen entschieden Stellung zu nehmen; so sehr verschieden deutbar waren die nach den jeweiligen Tinctionen und ihrer Intensität entstehenden Befunde.

Einmal verhält sich die Sporensubstanz selbst denselben Färbungen gegenüber ganz verschieden, so dass auch die oben zwischen der 1. und 2. Farbengruppe aufgestellten Differenzen sich auflösen.

Löffler'sches Methylenblau z. B. mit Essigsäure-Nachbehandlung färbt die Sporen stets und regelmässig in blau-röthlicher tiefer Nüance, während die anderen nicht umgewandelten Körner einfach blau, die Grundsubstanz ganz mattbläulich bleibt.

Löffler's Methylenblau ohne Essigsäure aber färbt nur die schon gut entwickelten Sporen distinkt; erste Anfänge derselben, die bei den Doppelfärbungen deutlich sind, bleiben hier undifferenzirt.

Unter den Doppelfärbungen wiederum ist die Violett-Braunfärbung als Reaction der Sporensubstanz empfindlicher, als die Roth-Blaufärbung. Mit ersterer erkennt man alle, auch die noch undeutlich und wenig differenzirten Sporenanfänge, während sie die scharfen Grenzen zwischen den centralen, im Endglied liegenden Sporen und den dieselben umschliessenden Protoplasmastreifen verdeckt. Dazu ist die Roth-Blaufärbung ungleich geeigneter.

Erst eine einfache Fuchsinfärbung im Vergleich mit den übrigen Befunden hat mir einigermaßen Klarheit gebracht. Ich färbte in einer mässig concentrirten alkoholischen Fuchsinlösung ganz kurze Zeit und spülte in Wasser ab (also eigentlich eine im Moment der Abspülung vor sich gehende schwache, wässerige Färbung). Dabei ergeben sich je nach der Färbungsintensität 3 Arten von Bildern:

1. ganz zarte Färbung: Grundsubstanz kaum angedeutet; Bacillussubstanz mattroth; Sporen, im Centrum ungefärbte, nur in der Hülle mattrothe Kügelchen;

2. intensivere Färbung: Grundsubstanz angedeutet; Bacillussubstanz deutlich roth; Sporen in toto dunkelrothe Kügelchen;

3. starke Färbung: Grundsubstanz, Bacillussubstanz, Sporen zu einer gleichmässig rothen undifferenzirten Masse vereinigt.

Aus all diesen Beobachtungen, welche ich in der nachfolgenden Tabelle kurz zusammenstelle, komme ich bei der Deutung dieser Sporen zu dem Schlusse, dass es endogen entstehende Gebilde seien.

War für die „Arthrospore“ auch geltend zu machen, dass, namentlich an den Endgliedern, schliesslich alles (blau sich färbende) Protoplasma verschwindet und nur rothgefärbte Substanz übrig bleibt — also scheinbar complete Umwandlung eines Bacillenglieds in eine Spore —, so war hiergegen anzuführen:

1. Entstehung dieser Spore im Centrum des zugehörigen Gliedes;
2. die absolut scharfe Absetzung der „Spore“ gegen das umgebende Protoplasma; roth und blau verschwimmen nicht in einander, sondern sind so haarfein scharf getrennt, dass man die Existenz eines mit eigener Hülle versehenen Körperchens annehmen muss.
3. Die absolute Aehnlichkeit der freien Sporen im gefärbten, wie ungefärbten Zustande mit anderen sicher als solche erkannten Sporen.
4. Das Fehlen einer protoplasmatischen Hülle, Kappe oder Stützsubstanz um die Spore ist bei jungen Formen stets eine durch die Art der Tinction (Ueberfärbung) zu Stande gekommene Erscheinung; bei älteren wird die Spore frei durch das — bei allen Bacillenarten beobachtete — Zugrundegehen der bacillären Substanz.
5. Ferner aber sind die Bilder der (in schwachen Fuchsinpräparaten sichtbaren) Hohlkügelchen nicht anders wie als „endogene Sporen“ zu deuten. Dieselben als degenerative Zufallsproducte aufzufassen, verbietet die bei den Doppelfärbungen erwiesene eigene Färbbarkeit dieser Hohlkügelchen.
6. Möchte ich darauf hinweisen, dass an der endogenen Natur dieser Sporen Niemand zweifeln würde, wenu dieselben sich nur an den ungetheilten Bacillen vorfinden. Diese Bilder sind durchaus klar. Die Schwierigkeit der Deutung wird nur bedingt durch die neben und vor der Sporenformation auftretenden Theilungen des Bacillus, durch die sogenannten „Körner“.

Versuchen wir diese „Sporen“ mit andern, z. B. den als Typus hingestellten Milzbrandsporen in Parallele zu setzen, so scheint auf den ersten Blick gerade in den Tinctionsverhältnissen ein gewisser Unterschied zu liegen. Während die Sporen der Milzbrand-, Kartoffelbacillen u. s. w. sehr schwer sich färben, zeichnen hier die Sporen sich durch eine besondere Affinität zu den Farben aus. Stets sind die sporenhaltigen Körner viel intensiver tingirt als interponirte sporenfreie. Aber thatsächlich färben sich auch hier die Sporen nur bei Anwendung gewisser Hülfen: z. B. des Alkali im Löffler'schen Methylenblau, während einfach wässrige

	Grundsubstanz und Hülle	S p o r e n		
		Bacillus in toto, oder die aus ihm durch Theilung entstandenen „Körner“, „Glieder“.	im Entstehen	gross, ausgebildet
Wässriges Methylengrün	ganz mattgrün	schlecht färbbar, etwas deutlich blau als die Grundsubstanz	nicht differenziert	nicht differenziert
Löffler'sches Methylengrün; Nachbehandlung mit $\frac{1}{2}$ procent. Essigsäure	ganz mattgrün	deutlich blau, scharf gefärbt	intensiv gefärbt, central scharf abgehoben gegen die Bacillussubstanz	violette Nuance, Bacillensubstanz verschwindend neben der grossen Spore
Löffler's Methylengrün. Abspülen in Wasser	ziemlich deutlich blau, ineinander verschwimmend	unsichtbar	deutlich sich abhebend durch intensive Färbung	
Fuchsin: a) ganz zart gefärbt b) stärker gefärbt	eben angedeutet deutlich roth, nicht von einander mit Stichenheit zu unterscheiden	mattgefärbt	ungefärbte Kügelchen im rothen Bacillus	grosse, freie Hohlkügelchen Das ganze (End)glied stark roth
c) stark gefärbt, überfärbt	alles gleichmässige roth ohne Differenzirung			
Doppelfärbung: Carbolfuchsin-Säure-Methylengrün	bläulich	blau	rothe Kugeln in blauer Umgebung	roth ohne blaue Hülle
Doppelfärbung: Anilin-Methylviolett-Säurebräun	braungelblich	bräunlich	schwarzbraune Mischfarbe des ganzen sporenhaltigen „Korns“, Spore selbst von der Umgebung nicht distinkt sich abhebend	Intensive, violett-schwarze glänzende Färbung
Methylviolett, Gram'sche Färbung u. s. w.	gleichmässige Färbung aller Bestandtheile, selbst die Gliederung oft verdeckend.			

Lösungen die Sporen nicht besonders tingiren. Beiden gemeinschaftlich, nur graduell verschieden ist die Kraft, die Farben länger und intensiver zurückzuhalten.

An den Milzbrandsporen ist eine leicht färbbare Hülle und ein meist stark glänzender ungefärbter, aber auch schliesslich tingibler Inhalt zu scheiden. Aehnliches kann auch bei unseren Sporen, allerdings nur an den grossen ovalen Endsporen gesehen werden. Man findet oft keine gleichmässige Tinction des ganzen Korn, sondern — beim Auf- und Niederschrauben — ein helles ungefärbt gebliebenes, stark lichtbrechendes Centrum innerhalb der gefärbten Membran.

Am auffälligsten ist die Aehnlichkeit der fraglichen Sporen mit Milzbrand- und ähnlichen Sporen im ungefärbten Zustande, wie sie in feuchten Kammern, die mehrere Tage alt sind, auftreten.

2. Das Hauptmerkmal einer Spore ist aber, dass sie mehr als das übrige Protoplasma befähigt ist, die Art zu erhalten, dass sie eine Dauerform ist.

Erfüllen unsere „Sporen“ diese Bedingungen? Dass dieselben an der Reproduction wesentlich betheiligt sind, ist bereits mehrfach betont worden. Die ungemein häufigen Bilder kurzer, sogar etwas zugespitzter, blauer Ansätze an den rothen Sporen ist gar nicht anders zu deuten, als ein Auswachsen. Dazu die in manchen älteren Culturen zu 20 und mehr transversal nebeneinander gestellten sporenhaltigen Bacillen, immer noch in einer Art von Hülle zu einer langen Kette vereint. Oft sogar sind ein oder zwei Glieder einer solchen Bacillenreihe schon wieder zu einem Körnerfaden ausgewachsen, so dass T-ähnliche Figuren entstehen.

Wie steht es aber mit der Dauerform? — Diese Frage ist es, welche meine sonst seit Monaten fertigen Untersuchungen nicht hat zum Abschluss kommen lassen. Ging ich auch nicht von der Meinung aus, dass jede Dauerspore durchaus dieselbe auffällige Resistenz gegen Temperatur, Eintrocknung etc. besitzen müsse, wie die Sporen des Milzbrandes oder der Erd- und Kartoffelbacillen, so mussten doch jedenfalls Sporen resistenter sein und lebensfähiger bleiben als Sporen — freies Bacillen-Protoplasma.

Zum Experiment musste demgemäss vorher festgestellt werden: wann und unter welchen Bedingungen stellt sich die Sporenbildung ein?

Ich habe zur Lösung dieser Frage

I. Die Zusammensetzung des Nährbodens:

Blutserum

Agar-Agar

Agar-Gelatine-Glycerin
 Gelatine
 Brühe (3 Arten).

II. Die Reaction dieser Nährböden.

neutral	
alkalisch	
schwach sauer	} durch Milchsäure.
deutlich sauer	
stark sauer	

III. Die Temperatur.

37.6°
 16—18°
 12—13°

IV. Das Alter der Culturen.

V. Die Anwesenheit von Sauerstoff

variirt und in allen nur möglichen Combinationen vergleichende Serien-Impfungen vorgenommen. Im Anfange der Untersuchungen glaubte ich auch durchgreifende Unterschiede zwischen den Culturen je nach gewissen Versuchsanordnungen gefunden zu haben. Erst die Violett-Braun-Doppelfärbung lehrte mich, dass ich mich wochenlang vergeblich bemüht hatte; die Löffler'sche Methylenblau-Methode, sowie die Carbol-fuchsin-Methylenblau-Doppelfärbung genügten wohl, um deutlich vorgeschrittene Sporen sichtbar zu machen, nicht aber zum Nachweis von ganz jungen Sporen in frischen Culturen, welche erstere Methoden hatten sporenfrei, zum mindesten fraglich erscheinen lassen. So habe ich denn absolut sporenfreie Culturen überhaupt nicht erzielen können.

Freilich zeigten sich graduell sehr wesentliche Differenzen, welche die Menge der Sporen, ihre Grösse, ihre Zahl in einem Bacillus, die Intensität ihrer Färbung, und ihre Beziehung zur Bacillussubstanz betreffen.

Den besten Nährboden bot nach dieser Richtung Agar-Gelatine-Glycerin von alkalischer Reaction bei Brütotemperatur. Schon nach 24 Stunden fanden sich massenhaft grosse, meist endständige, kolbige Sporen, das Bacillenprotoplasma des Endgliedes fast verdeckend. — Ihm am nächsten steht Blutserum. — Die gewöhnlichen Agar-Culturen zeigen erst 3 bis 5 Tage später ähnlich reichliche Entwicklung.

Brühen sind am allerwenigsten geeignet, schöne Sporen zu produciren.

Überall ist bei höherer Brütofentemperatur weit reichlichere Sporenentwicklung vorhanden, als bei Zimmertemperatur. — Gelatine-Culturen, sowohl Striche auf schräg erstarrter Gelatine, als Stiche geben daher — abgesehen von der durch die anhaftende Gelatine bedingten Tinctionsschwierigkeit, stets nur schlechte Sporenformation. Am besten sieht man sie noch in Gelatineschnitten, nach Löffler'scher Methode gefärbt; sie sitzen meist in den randständigen Bezirken der einzelnen kugeligen Bacillencolonien.

Ganz eigenthümliche Verhältnisse ergaben sich bei dem Versuche, Beziehungen zwischen dem Auftreten der Sporen und der Reaction des Nährbodens zu finden. — Machte man den Nährboden von vornherein neutral, alkalisch und sauer (in drei verschiedenen Intensitäten), so blieb der neutrale stets hinter dem alkalischen und schwach sauren zurück. Deutlich saure Reaction erwies sich schon stark hemmend, stark saure als ganz ungeeignet. Aber alkalischer, wie schwach milchsaurer Nährboden waren — merkwürdig genug — gleich günstig.

Aenderte sich aber mit dem Aelterwerden gewisser Culturen die Reaction des Nährbodens — es trat bei den glycerinhaltigen eine intensiv saure Reaction auf — so schwand auch der Sporenbefund.

Was das Alter betrifft, so fand ich in mehreren 4—10¹/₂ Monaten alten Agarculturen noch ziemlich reichliche Sporen. Culturen jüngeren Datums habe ich massenhaft untersucht, und stets — falls die Reaction nicht, wie oben erwähnt, stark sauer geworden war — Sporen in dem Maasse gefunden, soweit den obigen Angaben entsprechend, eine Entwicklung überhaupt stattgefunden hatte. Die ersten Anfänge waren stets schon 24 Stunden nach der Impfung zu constatiren. Selbst in Brühen, die bei Zimmertemperatur gehalten wurden, waren Sporen in solchen Mengen vorhanden, dass sie nicht etwa auf das zur Impfung verwendete Material bezogen werden konnten.

Die Temperatur anlangend, so scheint eine Art Optimum bei ca. 37.6° zu liegen. Unter 13° habe ich überhaupt kein Cultur-Wachsthum constatirt. Dagegen ist selbst bei einer Brütofentemperatur von 39.1° noch eine Vermehrung der Culturen in meinen alten Protokollen verzeichnet, und in den Präparaten eine sehr reichliche Sporenformation vorhanden.

Als einflussreichster Factor stellten sich schliesslich die Beziehungen des Sauerstoffs zu den Culturen heraus.

Sauerstoff-Armuth hindert die Sporenbildung zwar nicht ohne Weiteres, aber es erwies sich als ein derselben so ungünstiges Moment, dass ich zu verwerthbaren Resultaten gelangte. Die Versuchsanordnung bestand in dem Abschluss frisch geimpfter Agarflächen durch steriles Oel. Unter demselben wuchs ein dünner weisser Belag, der wesentlich von

kurzen, breiten, sporenfreien Stäbchen gebildet wurde; andere, aber verhältnissmässig spärliche, wiesen nicht sehr scharf ausgeprägte Sporenanfänge auf. In den nächsten Tagen nahm die Zahl der sporenartig gefärbten Endtheile an Zahl zu, allerdings sehr langsam und in nicht deutlich ausgeprägter Form, Absetzung, Färbungsintensität. Man hatte wohl den Eindruck eines Sporenbegins, aber ohne genügende Entwicklung.

Es wurde demgemäss versucht, Tag für Tag von der je 24 Stunden alten Cultur (zu Generationen) abzuimpfen, also von Tag zu Tag die sporenhemmende Einwirkung des Sauerstoffmangels zu verstärken.

Freilich waren selbst diese in Generationen hintereinander abgeimpften, stets unter Oel gehaltenen Culturen nicht sporenfrei, aber der schon mikroskopisch gewonnene Eindruck, dass es nur eben beginnende, ganz unvollkommen entwickelte Sporenanfänge seien, stellte sich bei den Versuchen als richtig heraus. — Eine volle Ausbildung und Fortentwicklung war selbst in 7 Tagen alten Culturen nicht zu constatiren. Ohne die Methylviolett-Braunfärbung wäre sie gar nicht entdeckt worden.

Totaler Sauerstoffabschluss, wie er durch Wasserstoffgas und Leuchtgas in zugeschmolzenen Röhren erreicht wurde, hinderte jegliches Wachsthum der Culturen.

Es ist mir also nicht gelungen, durchaus sporenfreie Culturen, welche ich bezüglich ihrer Resistenz mit sporenhaltigen hätte vergleichen können, zu erzielen, und wer sehr skeptisch sein will, wird von meinen Versuchen nicht überzeugt sein. Trotzdem glaube ich, mich stützend auf die Summe aller in ungemein grosser Zahl angestellter und zweckentsprechend gewählter Erhitzungs- und Trockenversuche entschieden meine Ueberzeugung dahin aussprechen zu dürfen, dass die bisher durch ihr mikroskopisches und tinctorielles Verhalten als Sporen erscheinenden Gebilde auch wirklich Sporen und zwar Dauersporen seien; Dauersporen freilich nicht den Milzbrandsporen vergleichbar, aber doch Dauerformen im Vergleich zum Bacillenprotoplasma.

Zum Vergleiche dienten theils durch ihr Alter, theils durch die Art und die Reaction des Nährbodens verschiedene Culturen, deren Verschiedenheit an Sporenreichtum, wie an qualitativer Sporenentwicklung durch die oben mitgetheilten Untersuchungen im Allgemeinen, wie auch für jede Cultur noch einmal speciell festgestellt war. — Von solcherlei Culturmassen wurden Aufschwemmungen hergestellt und entweder verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, oder zur Durchtränkung von Fäden zu Trockenversuchen benutzt.

In anderen Versuchen wurden aus ein und derselben Cultur verschiedenartige Nährböden (je bei Zimmer- und bei Brütofentemperatur) mehrere Tage nacheinander geimpft und die so unter sonst ganz gleichen

Bedingungen entstanden, aber verschieden alten und an Sporen quantitativ wie qualitativ sehr differenten Culturen zu den Versuchen benutzt.

Ganz unbefriedigende Resultate ergaben die Trockenversuche. Dieselben waren entweder in der oben beschriebenen Weise an in Suspensionen durchtränkten Fäden angestellt oder an Fäden, welche direct in den schleimigen Culturmassen gewälzt waren oder schliesslich derartig, dass an der inneren Wand steriler Reagensgläser abgestreifter Belag von Agarculturen angetrocknet wurde. — Hier trat ein ausschlaggebender Unterschied in den Culturen, obgleich auch sie den verschiedensten Zeiten, den verschiedensten Nährböden und sonstigen Modificationen entsprachen, gar nie zu Tage.

Das Alter anlangend, so war die älteste Cultur, welche zum Versuch benutzt wurde, eine seit $6\frac{1}{2}$ Monaten aufbewahrte, Anfangs im Ofen gewachsene Agarcultur. Sie ergab noch ebenso reichliches Wachstum, als die in allen Abstufungen jüngeren Culturen.

Fäden aus Agar- und Agar-Gelatine-Glycerinculturen waren ebenso verimpfbar, als solche aus Brühe, ohne Unterschied ob die Culturen bei Ofen- oder Zimmertemperatur gewachsen waren. (Nur einige Agar-Glycerin-Gelatinen [sauer!] blieben ohne Wachstum).

Die Dauer des Trockenhaltens, variirend zwischen 4 Tagen und $3\frac{1}{2}$ Monaten, ergab keine Differenz.

Eine weitere Versuchsreihe sollte das Alter und den eventuell von ihm abhängigen Sporenreichtum vergleichen. Sie ergab aber ein ganz anderes, interessantes Resultat:

Am 11. Januar wurden eine Anzahl älterer Culturen abgeimpft; und zwar:

1. 40 neutrale bez. alkalische Agar-Agarculturen, die bei Brüt-ofen-Temperatur gewachsen waren.
2. 10 neutrale, bez. alkalische Agar-Agarculturen, Zimmertemperatur.
3. 10 Agar-Gelatine-Glycerin, neutral, Brüt-ofen.
4. 5 Agar-Gelatine-Glycerin, neutral, Zimmertemperatur.
5. 5 Brüheculturen, Brüt-ofen.
6. 5 Brüheculturen, Zimmertemperatur.
7. 2 Gelatineculturen, die (nach Ehrlich) mit Orthonitropropionsäure versetzt waren.

Die Culturen stammten sämmtlich aus den Monaten: September, October, November. Es ergab sich nun das eigenthümliche Resultat, dass

alle geprüften Culturen sich mit Erfolg hatten abimpfen lassen, nur die glycerinhaltigen aus Zimmer und Ofen, sowie die mit Propiolsäure versetzten Gelatinen nicht.

Eine mikroskopische Untersuchung ergab nun, dass alle diese nicht-verimpfbaren Culturen keine distincten Sporen weder bei der Roth-Blau- noch bei der Violett-Braun-Färbung enthielten. Man sah zwar in einem der Gläschen hin und wieder rothe, bez. dunkel gefärbte Körnchen; dieselben waren aber nicht scharf rund, sondern waren zweifellos amorphe Zerfallspartikelchen. Als Ursache dieser Sporenabwesenheit glaube ich annehmen zu dürfen die intensive Säurebildung, welche, wie ich mich nun überzeugte, in all den nicht abimpfbaren Culturen sich entwickelt hatte, wohl im Anschluss an den Glycerin- bez. Orthonitropropiolgehalt der betreffenden Nährböden. Die Reaction war intensiv sauer geworden, und es entspricht diese durch die Säure entstandene Wachsthumshemmung den ja auch oben mitgetheilten Erfahrungen, dass ein schwacher Säuregehalt das Wachsthum nicht schädigt, stärkere Grade aber von den Bakterien nicht vertragen werden. Vielleicht ist die Ursache auch darin zu suchen, dass bei der Umwandlung des glycerinhaltigen Nährbodens nicht Milchsäure, wie wir sie zur absichtlichen Ansäuerung der Nährböden benutzten, entsteht, sondern irgend eine andere schädliche Säure.

In diesem einzigen Versuch also liegt die Thatsache vor, dass nur die sporenhaltigen Culturen sich verimpfen liessen, die sporenfreien nicht. Da aber in letzteren auch die Bacillen sich als todt erwiesen und über die Lebensfähigkeit der Bacillen in den ersteren nichts bekannt ist, so ist vor der Hand ein Vergleich nur geschaffen zwischen Culturen mit Sporen und lebensfähigen? Bacillen einerseits, und jedenfalls todtten Bacillen andererseits. Ein Beweis für die Behauptung, dass die Sporen (vermöge ihrer Resistenz) die Verimpfbarkeit erhalten hätten unter Umständen, denen die Bacillen schon erlegen wären, ist aber nicht erbracht.

Am ausführlichsten wurden Erhitzungsversuche¹ angestellt. Ich habe einen kleinen Theil derselben in den nachstehenden Tabellen zusammengestellt. Freilich sind die erzielten Resultate nicht auf den ersten Blick überzeugend, aber bei aufmerksamer Betrachtung finden sich doch entschieden markante Unterschiede, wenn man die angewandten Culturen (und deren uns bekannten, qualitativ und quantitativ wachsenden Sporenreichthum) einerseits und die Temperaturen andererseits gegenüberstellt.

¹ Die von den Culturen gemachten Suspensionen wurden im Wasserbade mit dem Wasser zusammen von 26° an schnell auf die gewünschte Temperatur erhitzt und dann auf derselben 5–20 Minuten erhalten.

Nehmen wir in Tabelle I die fünf differenten Culturarten, so haben wir auch fünf verschiedene Grade von Temperatureinfluss, schwankend zwischen 50—70°:

1. die an Sporen ärmsten (d. h. unter Sauerstoffmangel gewachsenen) Oel-Culturen zeigen schon bei 52°, selbst schon bei 50° wesentliche Beeinflussung, bei 54° gar kein Wachsthum (selbst bei 4 Tage alten Culturen);

2. die 1 Tag alten Brüheculturen aber erst bei 62°, 10 Minuten lange Einwirkung;

3. die 6 Tage alten Brüheculturen bei 66°, 5 Minuten lange Einwirkung;

4. die 1 Tag alten Agarculturen bei 64°, 15 Minuten, und 66° 10 Minuten;

5. die 5 Tage alten Agarculturen bei 70°, 15 Minuten.

Die Differenz der einzelnen Versuche zeigt sich aber nicht nur an Tödtung, bez. Lebendbleiben der erhitzten Massen, bez. an Wachsen oder Nichtwachsen auf den abgeimpften Controllgläsern, sondern auch an der Massenhaftigkeit der in letzteren entstehenden Beläge und in der Zeit ihres Auftretens. — Streicht man eine normale Cultur auf feuchtes Agar aus, so ist (bei 37.6°) nach 24 Stunden die gesammte Ober-
einem reichlichen dicken Belage bedeckt. Kaum anders verhalten fläche von sich Brühe- und Agarculturen nach einer Erhitzung bis auf 54°, während die Oelculturen schon bei 50° eine Behinderung zeigen. Theils sind nach 24 Stunden nur ganz vereinzelt stehende Heerde entstanden, theils treten dieselben erst nach 48 und mehr Stunden auf. — Auch Ernst betont die Bedeutsamkeit dieser retardirten Entwicklung und die Möglichkeit, aus ihr einen Schluss auf die (trotz der Erhitzung) mehr oder weniger erhaltene Keimfähigkeit der Impfmassen zu ziehen.

In Tabelle II ergeben die Zahlenverhältnisse zwischen wachsenden und nicht mehr wachsenden Controllgläsern ein ähnliches Resultat: die mikroskopisch sporenenreichsten Culturen wurden in geringster Anzahl durch die Erhitzung zerstört.

So glaube ich denn aus der Gesamtsumme aller Beobachtungen, aus der Thatsache, dass alle Versuchsreihen in demselben Sinne feststellten, je mehr und je entwickelter die Sporen, desto grösser die Resistenz der Cultur, trotz des Mangels absolut einwurfsfreier Vergleichsobjecte, doch annehmen zu dürfen, dass wir es wirklich mit einer echten, endogenen Dauersporenbildung zu thun haben; allerdings mit der Einschränkung, oder besser Erweiterung, dass wir für die Resistenz von Dauersporen nicht mehr die der Milzbrand- und ähnlicher Sporen als

Tabelle

Erhitzung in Grad:	40—49				50				52		54		56			
Minuten:	5—20				5	10	15	20	5—20		5—20		5	10	15	20
1. Oel-Culturen bis zur 7. Generation.			Ob	Ob	0a?	0	a	0	0	0	0	0	1. a ¹ 2. Ob	a?	0	0
2. Brühe-Culturen. Brütofentemperatur. 1 Tag alt.	d		d	d			d	d	d	d			Ob	Ob		
3. Brühe-Culturen. Brütofentemperatur. 6 Tage alt.	d		d	d			d	d	d	d			Ob	Ob		
4. Agar-Culturen. Brütofentemperatur. 1 Tag alt.		d	d	d	d	d	d	d	d	d			d	d	d	d
5. Agar-Culturen. Brütofentemperatur. 6 Tage alt.		d														

Tabelle II.

Erhitzungen auf 66° und 68°.

Erhitzungen auf:	Ofentemp. 37·6°		Zimmertemp. 20°		Zimmertemp. 15°	
	66°	68°	66°	68°	66°	68°
Agar-Agar	11:5 ²	21:6	11:2	21:6	0	0
Agar-Gelat. Glyc.	11:8	21:9	11:3	21:8	0	21:2
Brühe	11:0	21:0	11:0	21:0	11:0	21:0

Maassstab hinstellen dürfen, sondern nun annehmen, dass die Milzbrandsporen eine excessiv hohe Resistenz in der langen Reihe von Dauersporen überhaupt besitzen.

Auch in dem wesentlichen Punkte differiren unsere Sporen von denen des Milzbrandes, dass, während letztere erst auftreten bei einer gewissen Erschöpfung des Nährbodens, hier die Sporenbildung durchaus der Zunahme günstiger Wachstumsbedingungen parallel geht. Ernst schliesst zwar „aus dem Stehenbleiben der Entwicklung“ auf eine Erschöpfung des Nährbodens; ich kann vor der Hand mich dieser seiner Annahme aber nicht anschliessen.

Gehen wir an den Ausgangspunkt unserer ganzen Untersuchung zurück, so war es eigentlich nicht die Sporenfrage, welche unsere Aufmerksamkeit dieser Bacillengruppe zugewendet hatte, sondern es waren die sogen. Gonidien, d. h. jene keulen- und birnenförmigen Anschwellungen, welche im Laufe eines mehrtägigen Culturwachstums an den Enden der

¹ Die erste Reihe giebt die Resultate von einer 1 Tag alten, die zweite von einer 2 Tage alten (also sporenreicheren) Oelcultur.

² Von 11 Gläsern sind 5 gewachsen u. s. w.

I.¹

58				60				62		64				66				68				70			
5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—								
0b	0a			0a	0a			0a	0	00a	0			0	0										
0b	0b			0b	0a			0a	0a	0a	0a			0	0										
										a	a	0	a	a	a	0a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
										b	b	a	0	b	b	a	0	b	b	a	0	a	a	a	0

ausgewachsenen Bacillen bez. Körnerfäden sich entwickelten. Als ich meine erste Mittheilung machte, glaubte ich freilich, es nicht nur mit einem eigenthümlichen Wachstums-, sondern auch Fortpflanzungsmodus zu thun zu haben. An den kurzen Bacillen in den frühen Stadien hatte ich Theilung bez. Sporenbildung beobachtet, in älteren sollte die Gonidienbildung und deren scheibenartiger Zerfall — wobei jede Scheibe für sich in einer der Längsrichtung der ganzen Keule senkrechten Richtung zum neuen Einzelbacillus sich entwickelte — einen dritten Modus der Fortpflanzung darstellen.

Nach meinen inzwischen 1884 und jüngst 1887 gemachten Untersuchungen muss ich allerdings die damalige Deutung für falsch erklären. Die Keulenform ist nichts irgendwie für die Fortpflanzung Wesentliches, sondern nur eine secundäre Erscheinung, abhängig von den übrigen bei der Theilung und der Fortpflanzung sich abspielenden Vorgängen.

Sie findet sich unter folgenden Umständen:

In ganz jungen Culturen fehlen diese Formen fast ganz; man sieht nichts weiter als schmale, gleichmässig breite, sporenfreie oder sporenhaltige Bacillen.

Werden die Culturen etwas älter, so zeigt sich entsprechend dem Auswachsen und Anschwellen der beiden Endsporen eine kugelige Auftreibung der Bacillenenden überhaupt. Bleibt nun der Bacillus mit seinen Sporen noch längere Zeit ein zusammengehöriges Ganze, so blähen schliesslich nicht nur die Endsporen — und diese als die ältesten natürlich am allermeisten —, sondern auch die Mittelsporen den Bacillus auf, so-

¹ Die Buchstaben bedeuten: a ganz schwaches, d sehr gutes Wachsthum; eine 0 vor dem Buchstaben zeigt an, dass mehrere Tage vergingen, bis auf dem Glas ein Wachsthum sich zeigte.

dass auf diese Weise auch kleine wohlausgebildete Keulen entstehen. Am allerdeutlichsten sieht man daher diese Art der Keulenbildung in den Culturen, deren Zusammensetzung, Reaction u. s. w. ein ganz besonders intensives Wachsthum der erstentstehenden Endsporen bedingt, also Agar-Gelatine-Glycerin oder Blutserum. Brühen umgekehrt, namentlich bei Zimmertemperatur gewachsene, zeigen Keulen so gut wie gar nicht.

Diese also von der Sporenformation abhängige Keulenbildung ist scharf zu trennen von denjenigen Formen, wie sie in ganz alten Culturen auf-fallen, bei denen durch irgendwelche Ungunst der Wachsthumverhältnisse die Trennung der im ausgewachsenen Bacillus (bez. deren Gliedern) ent-standenen Sporen ausbleibt. Dadurch wächst erstens der Bacillus oder besser gesagt der Sporenfaden ins Ungemessene zu Ketten von 20 bis 30 Gliedern. In jedem Gliede aber geht die Entwicklung ihren weiteren Gang; man erkennt die Spore und den aus ihr sich entwickelnden, auf die Längsrichtung senkrecht stehenden, kleinen Bacillus.

Dieses Auswachsen der Einzelspore ist allerdings auch, wie es scheint, häufig gestört. Statt schlank und glatt auszuwachsen, treten häufig etwas verkrüppelte und klumpige, bisweilen eckig-kantige Protoplasamassen an denselben auf und bedingen die unregelmässige Form, wie sie sonst immer an den Scheiben der Keulen beschrieben wurden.

Aber selbst in diesem Stadium ist die Keulenbildung nur ein zwar häufig, aber durchaus nicht gesetzmässig auftretendes Phänomen, ganz und gar abhängig von dem Zufall, ob nur die Endglieder an beiden Seiten, oder der ganze Faden in seiner Totalität gleichmässig jenes Auswachsen der Einzelsporen in mehrweniger lange Bacillen darbietet. Tritt sie freilich auf, so ist der Anblick merkwürdig genug. — Dadurch, dass ich in meinen allerersten Untersuchungen nur immer gleichmässig gefärbt hatte, entweder schwach mit Methylenblau oder stark mit Fuchsin, hatte ich das Wesentlichste dieser Scheiben übersehen: die Sporen. Färbt man dagegen mit der oben angegebenen Violettbraun-Methode, so wird man die Existenz von Sporensubstanz sofort in den dunkel gefärbten Körnern annehmen müssen. Noch sicherer aber und überzeugender sind die ganz schwach mit alkoholischem Fuchsin gefärbten und mit Wasser abgespülten Präparate, in welchen die Sporen als helle, ungefärbte, nur in ihrer Randmembran gefärbte Kügelchen sichtbar sind und zwar in jeder einzelnen Scheibe; von jedem Kügelchen ausgehend wieder der sich entwickelnde (mehr oder weniger schlanke oder etwas verkrüppelte) Bacillus; alle Bacillen parallel nebeneinander zu einem langen, geraden oder gebogenen, gleichmässig breiten, oder an beiden Enden keulenförmig verdickten Faden vereinigt. Diese excessive Keulenbildung ist also in der That, wenn auch nicht gerade wie Fränkel-Franke wollen, als Dege-

neration, aber doch jedenfalls als ein Ausdruck gestörten Wachsthum aufzufassen; auch die Culturen, in denen ich diese Monstrositäten am ausgebildetsten fand, sind schlecht zu übertragen und bedürfen grösserer Impfmassen. Weniger ausgeprägte Formen finden sich allerdings auch in den besonders üppig wachsenden Culturen. — In den Oelculturen habe ich sie nie getroffen. — Die von den unverhältnissmässig breiten Sporen herührenden Endauftreibungen sind wie erwähnt als eine Form für sich aufzufassen.

Ich bin damit am Ende meiner Mittheilungen angelangt. Dieselben betreffen mehrere Arten von an verschiedenen Stellen gefundenen Bacillen. Aber gemeinsam ist sowohl ihr morphologisches Verhalten: die bacilläre und die keulenbildende Form, als die Art und Weise ihrer Fructification. Nahe verwandte Arten sind es demnach jedenfalls.

Ob aber die Xerose-Bacillen, die von mir aus dem Ulcus molle, ein anderes Mal aus Vaccinekrusten isolirten Bacillen mit diesen und mit den neuerdings aus Geschwürsbelag und Vaginalsecret gezüchteten ganz identisch sind, ist mit Sicherheit noch nicht zu entscheiden. Bestehen doch einzelne nicht unwesentliche Differenzen:

1. Die Xerosebacillen sind unbeweglich; die Bacillen aus Ulcus cruris und Vagina sind beweglich.

2. Auf Kartoffeln wachsen die Xerosebacillen (nach Fränkel und Franke) nicht, dagegen unsere Bacillen ganz gut.

3. Die Xerosebacillen sind nur (bis auf eine von Ernst constatirte Ausnahme) auf Blutserum gut zu cultiviren; auf Agar-Agar wachsen sie sehr schlecht und bieten sehr bald jene monströsen Keulen und langen Bacillenbänder.

4. Aehnlich verhält sich eine der von mir aus Ulcus molle cultivirten Arten; während aber die Xerosebacillen einen nach allen Beobachtern übereinstimmenden, fettigen, trockenen Belag bilden, war hier auf Blutserum eine kleine verflüssigungsähnliche Vertiefung entstanden. — Ueberimpfungen auf Agar ergeben auch hier nur einen dünnen schleierähnlichen Belag.

5. Die aus Vaccine, Ulcera cruris und Vaginalsecret gewonnenen Bacillen wachsen sehr üppig auf Agar-Agar, aber auch auf Blutserum, als ein reichlicher weisser, feuchter Belag.

Zwischen diesen letzten drei Arten habe ich durchgreifende Unterschiede nicht finden können.

Es ergibt sich demnach, obwohl nach dem, was mir von ihrem mikroskopischen Verhalten und ihrem Fortpflanzungsmodus bekannt geworden, alle diese Bacillen sich gleich verhalten, für die Xerosebacillen denn doch eine etwas eigenthümliche Stellung, die nicht zulässt, sie jetzt schon

als „Luftstäbchen“ einfach ad acta zu legen, sondern im Gegentheil als ein weiterer Anregungspunkt, ihrer wirklichen Bedeutung nachzuspüren, aufzufassen ist.

Gehe ich weiter auf die allgemeine Bedeutung der erörterten Fragen ein, so möchte ich noch einmal hervorheben, dass wesentlich der darin enthaltene Beitrag zur Sporenfrage von Wichtigkeit erscheint. Ich ging offen gestanden aus, um Arthrosporen zu suchen und bin durch meine eigenen Befunde zu der Ueberzeugung gelangt, endogene Sporen gefunden zu haben. Dass diese Sporen Dauersporen sind, habe ich wenn auch nicht ganz sicher, aber doch sehr wahrscheinlich machen können.

Dass die hier angewandte Methode auch bei anderen Mikroorganismen mit Erfolg zur Sporenuntersuchung angewendet werden kann (und angewandt worden ist), brauche ich nicht besonders zu betonen, mehrten sich doch schon seit Monaten Sporenbefunde in Bacterienarten, welche bisher als sporenfrei galten. Abgesehen von den Bacillen, sind auch von den Kokkenarten sporenhaltige festgestellt worden. Zu der von Hauser entdeckten Sarcinospore hat Ernst neuerdings einen nicht näher beschriebenen Diplococcus — ein ganz besonders werthvoller Befund — hinzugefügt. Auch in Hefen, besonders einer ovalen Form, finden sich wunderbare sporoiden Gebilde. — Doch möchte ich darauf hinweisen, dass nicht jede innerhalb einer Bacterienzelle auftretende, chemische, durch Tinction nachweisbare Modification eo ipso eine Spore sein muss. Stets muss die Beziehung zur Fructification auch erwiesen werden.

Ich selbst habe mich eingehender nur noch mit drei Arten beschäftigt: mit den Streptokokken, den Choleraspirillen und den kleinen Bacillen der Hühnercholera.

In letzteren habe ich die event. als Spore imponirende Lücke absolut nicht färben können, weder in frisch dem Thierkörper entnommenen Präparaten, noch in Culturen; auch auf experimentellem Wege habe ich von Dauerformen nichts nachweisen können. —

Was die Streptokokken anlangt, so bleibt nach den unzähligen Erfahrungen, welche über das Haften des Erysipelgiftes an Betten, Wohnungen etc. mit monatelangem Erhaltenbleiben der Virulenz vorliegen, nichts anderes übrig, als hier irgend eine Art von Dauerform anzunehmen. Trotz aller möglichen Färbungsversuche ist es mir nicht gelungen weder in älteren noch in jungen Culturen¹ sporenähnliche Befunde zu machen. —

¹ Dieselben waren gewonnen: 1. aus Erysipel; 2. aus Halsabscessen, welche auffallend häufig nur Streptokokken ohne Staphylokokken enthielten; 3. aus Fluor vaginalis; 4. aus dem Bläscheninhalt von Impetigo contagiosa; 5. aus dem Sekret einer weiblichen gonorrhoeischen Urethritis; 6. aus Sputum.

Am allerverlockendsten zu einer solchen Annahme waren wieder einige der auf festen Nährböden gewachsene alte Culturen, für uns besonders dadurch interessant, dass wir in ihnen lange, den oben beschriebenen Bacillenbändern ähnliche Kokkenreihen wiederfinden. In einer solchen langen Kette finden sich auch abwechselnd ganz mattgefärbte Kokkenpaare und einzelne durch die Intensität ihrer Färbung wie ihre Grösse hervorstechende Kugeln. Auch hier handelt es sich aber nur um absonderliche durch ungünstige Wachstumsverhältnisse gebildete Wuchsformen, wie sie sich in üppig und schnell wachsenden Culturen nie finden. Bald sind es wie hohl aussehende Einzelkugeln, bald leicht überfärbbare und dadurch einheitlich aussehende Conglomerate von unregelmässigen Körnern und Platten; am häufigsten aber handelt es sich um grosse in Theilung begriffene Kokken. Die Theilung tritt ja in flüssigen Nährböden immer nur so ein, dass die beiden Hälften eines sich spaltenden Coccus in der Längsrichtung der Kette nebeneinanderliegend die Kette verlängern. Auf festen Nährböden ändert sich häufig dies Verhalten, da hier auch Quertheilungen (also die Theilungsachse parallel der Kettenachse) so angetroffen werden, dass aus ihnen haufenförmige Gruppen entstehen. In den oben beschriebenen Ketten nun ist diese Quertheilung, combinirt mit absonderlicher Grösse der Einzelindividuen, die häufigste Ursache der Kugelbildung; übrigens auch Vierer-Formen kommen zur Beobachtung. Ich habe also weder durch Färbung noch durch sonstige Beobachtung den Nachweis führen können, dass Sporen, als endogene Formen vorhanden seien. Als Arthrosporen kann man die beschriebenen Gebilde insofern auffassen, als in solchen ganz alten Culturen nur einzelne Glieder langer Ketten in der geschilderten Weise durch intensive Färbbarkeit und Theilungsvorgänge das Vorhandensein einer bestehenden bez. erhöhten Vitalität aufwiesen. — Einzelne solcher kugeligen Gebilde waren aber sicher Degenerationsformen. —

Diese Streptokokken-Ketten können mit Recht als „Coccothrix“ bezeichnet werden; die in ihnen auftretenden Kugeln sind und bleiben stets Kugeln, also Kokken, während die oben beschriebenen „Körner“ und die Kugelform nur als ein Stadium im Laufe der Entwicklung auftreten und im weiterem Verlaufe zum Bacillus sich entwickeln. Ist auch jeder Coccus eine Kugel, so doch nicht jede Kugel ein Coccus. —

Gehe ich nun zur Cholera über, so habe ich auch hier versucht der Frage der Sporenexistenz näher zu treten. Die Thatsache, dass ganz alte, wie es schien absolut eingetrocknete Culturen noch verimpfbar waren (die älteste der von mir untersuchten Culturen war 1 Jahr 10 Mon. alt), musste die Frage nach der Existenz von Sporen immer wieder wachrufen. Freilich überzeugte ich mich sehr bald, dass selbst sehr alte Culturen,

die trocken aussahen, beim Abstreifen eben dieses Belages oft noch zähe waren, also entschieden noch eine Spur Feuchtigkeit enthielten; intensiv oder bei freier Verdunstungsmöglichkeit getrocknete Massen waren nie verimpfbar.

Am dauerhaftesten erwiesen sich in Agar-Agar oder in *Fucus crispus*-masse angelegte Sticheulturen, eben weil sie stets der Vertrocknung grösseren Widerstand entgegensetzten, als die auf schrägen Gläschen geimpften Beläge. — Der Bodensatz ganz verflüssigter Gelatine ist auch nach vielen Monaten meist noch aufzuchtbar. Stets sind Uebertragungen grösserer Mengen nöthig, um die lebendigen, wahrscheinlich doch nur vereinzelt Keime sicher mit zu übertragen. Bei alten Agarculturen war es oft nöthig, direct Brühe aufzugliessen; ich erhielt damit noch positive Resultate in Fällen, in denen ich bereits vergeblich abgeimpft hatte. — Das Wachsthum dieser aufgezüchteten Culturen ist fast regelmässig ein langsames; besonders durch lange Kälteeinwirkung scheint die Verflüssigungsfähigkeit mehr oder weniger verloren zu gehen, immer erst nach wiederholtem Umzüchten kehrten die normalen Verhältnisse allmählich zurück. In den so entstehenden weisslichen, zähflüssigen, an der Oberfläche wie im Stich reichlich wachsenden Massen treten colossale, durch viele Gesichtsfelde sich hindurchziehende, plumpe, verhältnissmässig breite Spirillen auf, deren korkzieherähnliche Windungen es mir seit Jahren sicher gemacht haben, dass auch die feine Choleraspirille frischer Culturen nicht in einer Ebene gebogen, sondern korkzieherartig gewunden sei. — Agarculturen andererseits gaben so kurze, plumpe, oft hohle Einzelformen, dass Niemand dieselben für Cholerakommata halten könnte. —

Auf alten Agarculturen finden sich sehr häufig gelbbraunliche, krystallinisch aussehende Concremente. Dieselben enthalten aber keine lebensfähigen Keime. —

Die Möglichkeit es mit Sporen zu thun zu haben, wurde auch mikroskopisch nahe gelegt durch die eigenthümlichen Löcher- und Kugelchenbildungen, welche in Agarculturen — besonders den durch Kälte etc. modificirten — bei einer schwachen Fuchsinfärbung auftreten, sei es, dass man nur mit einer ganz dünnen Fuchsinlösung färbt, oder stärker, event. in heissem Wasser entfärbt. Diese Kugelchen treten entweder als ein einziges central im Kommabacillus gelegenes oder zu zweien nebeneinander auf, sodass eine Art Zweitheilung des Kommabacillus zu Stande kommt. Eine eigene Färbbarkeit besitzen sie zwar nicht, aber das Bild eines solchen vacuolenhaltigen Kommabacillus oder auch Spirillum ist in der That frappant einer Sporenbildung ähnlich.

Um mich von der Natur dieser Gebilde zu überzeugen, habe ich nun theils auf dem Wege der Erhitzung, theils der Erfrierung, theils der

Eintrocknung ganz frische Culturen ohne solche Kügelchen, ferner ältere mit solchen, endlich ganz alte körnige detritushaltige, aber noch aufzüchtbare Culturen verglichen, um den Dauergrad dieser auffallenden Gebilde festzustellen.

Ich brauche über die einzelnen Versuche, die nach allen Richtungen hin variirt sind und von denen jeder einzelne fortwährend wiederholt wurde, wohl nicht einzeln zu berichten. War doch das Resultat ein ganz eindeutiges. Nirgends zeigte sich eine grössere Resistenz der körnerhaltigen Culturen, eher war umgekehrt eine Cultur um so weniger widerstandsfähig, je älter sie war. Von Dauerform war also gar keine Rede. —

Was die Eintrocknungsversuche betrifft, so müssen dieselben, wie bereits erwähnt, mit einer gewissen Vorsicht verwerthet werden. Man kann es dem Faden unmöglich mit voller Sicherheit anmerken, ob er ganz trocken, d. h. steril geworden ist, oder ob er noch eine Spur Feuchtigkeit und damit event. aufzüchtbare Bacillen enthält.

Ich machte deshalb Versuche in folgender Weise: In eine ca. 1.5^{cm} weite, 15^{cm} lange sterile Glasröhre wird ein mehrere Tage in Bouilloncholera-cultur getauchter Leinwandfleck eingebracht. An beiden Seiten wird die Glasröhre mit durchbohrten, glasröhrenhaltigen Kautschuckpfropfen verschlossen. An die eine Seite wird nun ein Gebläse angebracht, die andere Seite mit Reagensgläsern in Verbindung gesetzt, welche ca. 3^{cm} über dem Boden einen senkrecht abgehenden Ansatz tragen. (Ich benutze solche Reagensgläser sonst zu den Versuchen, irgend welche Gasarten auf Culturen einwirken zu lassen).

Die Gläser waren vorher so mit schräg erstarrtem Agar gefüllt, dass die durch das Seitenrohr einströmende Luft die Agarfläche treffen musste. Wurde nun der ganze Apparat mit einander in Verbindung gesetzt, so wurde durch das in Thätigkeit gesetzte Gebläse (durch Watte filtrirte) Luft unter einem mässigen Druck durch den Cholerafleck und schliesslich auf die Agaroberfläche getrieben. Das Resultat war wie erwartet und leicht erklärlich ein durchaus negatives: so lange der Fleck noch feucht war konnten durch den Luftstrom Keime nicht abgerissen werden, und als diese physikalische Möglichkeit nach dem vollkommenen Trocknen eintrat, waren sie nicht mehr verimpfbar. Nie wuchs also durch den „Luftstrom“ verbreitet, Cholera auf den Agar-Gläschen. —

Ich habe also nichts von irgend welcher Dauerform bei den Choleraspirillen nachweisen können.

Eine Menge von Einzelheiten, die mir sonst noch aufstiegen, übergehe ich, nur möchte ich noch darauf hinweisen, dass zwischen den collosalen Spirillen, wie ich sie oben erwähnte, und den keulenartigen Fäden

und Rändern der Xerose- und ähnlichen Bacillen, sowie den groben Kugeln der Streptokokken-Ketten eine gewisse Analogie zu bestehen scheint; alle diese Formen sind excessive, den Beginn einer Degeneration anzeigende, durch Wachstumsbehinderung zu Stande gekommene Abnormalitäten.

Litteratur-Verzeichniss.

1. Kuschbert und Neisser, Zur Pathologie und Aetiologie der Xerosis epithelialis conjunctivae u. s. w. — Sitzung der medic. Section der schles. Gesellschaft für vaterl. Cult. 21. Juli 1882. — *Breslauer ärztliche Zeitschrift*. 1883. Nr. 4.
 2. Kuschbert, Die Xerosis conjunctivae u. s. w. (nebst Anmerk. v. Neisser). *Deutsche medicinische Wochenschrift*. 1884. Nr. 21.
 3. Schleich, Zur Xerosis conjunctivae. *Mittheilungen aus der ophthalmolog. Klinik*. Tübingen 1884. Bd. II. S. 145.
 4. Eugen Fränkel und E. Franke, Ueber den Xerosebacillus und seine ätiologische Bedeutung. Knapp-Schweigger's *Archiv f. Augenheilk.* 1887. Bd. XVII.
 5. Ernst, Ueber den Bacillus Xerosis und seine Sporenbildung. *Diese Zeitschrift*. 1888. Bd. IV.
 6. Eugen Fick, *Ueber Mikroorganismen im Conjunctivalsack*. Bergmann. Wiesbaden 1887. S. 55.
 7. Bordoni-Uffreduzzi, Cultur der Leprabacillen. *Diese Zeitschrift*. 1887. Bd. III.
 8. Hueppe, Refer. vorstehender Arbeit. *Fortschritte*. 1887. S. 788.
-