[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“
zu Berlin.]

(Direktor: Geh. Ober-Med.-Rat Prof. Dr. Gaffky.)
(Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Lentz.)

Über den modifizierenden Einfluß von kohlehydrathaltigen Nährböden auf Bakterien.

Von

Dr. K. Saisawa
aus Tokio.

In der Sitzung der Berliner mikrobiologischen Gesellschaft am 7. März 1912 hat Prof. Dr. Lentz in der Diskussion kurz über meine Befunde bezüglich der Knopfbildung in den Typhuskolonien berichtet. In folgender Abhandlung will ich hierüber Genaueres mitteilen.

Vor etwa 4 Jahren hat Reiner Müller über interessante eigentümliche Knopfbildungen Mitteilung gemacht, welche der Typhusbazillus auf Rhamnose-Agarplatten und der Paratyphusbazillus (Typus B) auf Raffinose-Agarplatten im Innern der Mutterkolonien bilden. Er hat diese Knopfbildungen auf Mutation der Bazillen zurückgeführt. Seit der Veröffentlichung von Neisser und Massini ist von verschiedenen Seiten, so von Burk, Burri, Sobernheim und Seligmann, Hübner, Schottelius, Gruber und Fritsch, Gottschlich, Kruse u. a. über Mutation und mutationsartige Erscheinungen an den Bakterien — eigentümliche Eigenschaft der Kolonien, Säure- und Alkalibildung, Knopfbildung — mancherlei mitgeteilt worden. In der neuesten Zeit vertritt ferner Baerthlein die Ansicht, daß die Bildung verschiedener Kolonien, sowie die Änderung der Form der Bakterien, welche er bei verschiedenen Arten von Bakterien, und zwar bei Bazillen, Vibrionen und Kokken, beobachtete, auf echter Mutation beruhe. Jedenfalls ist die Erscheinung der Veränderlichkeit der

Bakterien und die sogenannte Vererblichkeit der veränderten Eigenschaft für die Biologie von großem Interesse; es ist aber doch noch sehr zweifelhaft, ob sie im Sinne von de Vries mit der bei höheren Organismen beobachteten Mutation verglichen werden darf. Auf Anregung von Prof. Dr. Lentz habe ich zunächst für praktische Zwecke die Befunde von Reiner Müller, sowie das Verhalten der verschiedenen zum Teil pathogenen und zum Teil nicht pathogenen Darmbakterien auf verschiedenen kohlehydrathaltigen Nährböden geprüft.

I.

Der Nährboden wurde in der Weise hergestellt, daß nach der Angabe von Reiner Müller zu gewöhnlichem Nähragar 1 Prozent Kohlehydrat hinzugefügt und die Mischung in Petrische Schalen gegossen wurde. Nachdem die Bakterien auf die Platte gesät waren, belegte ich den Deckel der umgekehrten Schale mit Watte, die mit sterilisiertem Wasser angefeuchtet war, um das Austrocknen im Brutofen, in dem die Platten etwa 2 Wochen gehalten wurden, zu verhüten. An dieser Stelle sei bemerkt, daß es von großer Wichtigkeit für die Entwicklung der Knopfkolonien ist, daß die Kultur immer feucht gehalten wird. Täglich habe ich dann das Wachstum der Kulturen beobachtet; dabei wurde die Schale gelüftet, indem ich den Deckel vorsichtig abnahm. Ich habe bei meinen Versuchen 16 verschiedene Kohlehydrate, die sämtlich von der Firma Merck bezogen waren, geprüft, nämlich Rhamnose, Raffinose, Sorbit, Mannose, Adonit, Erythrit, Mannit, Arabinose, Maltose, Dulcit, Inulin, Dextrose, Saccharose, Lävulose, Laktose und Galaktose. Bei der Prüfung der verschiedenen Bakterien erhielt ich folgende Resultate:

A. Typhusbazillen.

Die geprüften Stämme waren meist frisch aus den Fäzes von Kranken oder Bazillenträgern gezüchtet worden, nur einige wenige stammten aus der Institutssammlung. Ich habe auf Rhamnose und Raffinose je 25, auf Arabinose und Dulcit je 20 und auf den übrigen Nährboden je 10 Stämme geprüft. Sie bildeten sämtlich auf Rhamnoseagar nach 48 Stunden, manchmal bereits nach 24 Stunden, in den breiten Oberflächenkolonien mehrere kleine Knopfkolonien, welche in 4 bis 5 Tagen bedeutend wuchsen; spärliche, aber ziemlich große Knopfkolonien wuchsen auf Dulcitplatten in 4 bis 6 Tagen, zahlreiche, kleine Knopfkolonien auf Arabinose in 5 bis 7 Tagen und auf Erythritagar in etwa einer Woche sehr kleine, erst bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung gut sichtbare Tochterkolonien. Auf den übrigen Nährböden waren gar keine Knopfkolonien wahrzunehmen.

B. Paratyphus-Bazillen (Typus B).

Ich habe von diesem Typus 10 Stämme, welche sämtlich aus Krankenstühlen isoliert waren, auf Raffinose- und Rhamnoseagar und je 5 Stämme auf allen übrigen Nährböden geprüft. Die meisten Stämme bildeten auf Raffinose in 4 bis 5 Tagen mehrere deutliche Knopfcolonien, nur bei 2 Stämmen zeigte sich keine Knopfbildung. Auf Erythrit- und Saccharoseplatten bildeten sich, wie bei den Typhusbazillen, ganz kleine, nur mikroskopisch deutlich sichtbare Knopfcolonien.

C. Der Paratyphus-Bazillus (Typus A),

von dem auf jedem Nährboden 5 Stämme, sämtlich Laboratoriumsstämme, geprüft wurden, und das Bacterium coli, von dem auf Rhamnose- und Raffinoseagar je 6, auf den übrigen Nährböden je 2 Stämme, ebenfalls Laboratoriumsstämme, geprüft wurden, bildeten auf keiner Platte Knopfcolonien.

D. Vom Enteritis-Gärtner-Bacillus,

von dem ich auf Rhamnose und Raffinose je 10, auf den anderen Nährböden je 5 Stämme, sämtlich Laboratoriumsstämme, prüfte, bildeten 6 Stämme auf Raffinose in 6 bis 8 Tagen kleine Knöpfe, 4 dagegen nicht. Auf Erythrit erzeugten alle 5 geprüften Stämme mikroskopisch kleine Knöpfe.

E. Die Mäusetyphusbazillen,

von denen ich nur auf Rhamnose und Raffinose je 3 Laboratoriumsstämme geprüft habe, bildeten nur auf Raffinose in 6 bis 8 Tagen kleine Knopfcolonien.

F. Dysenteriebazillen,

Laboratoriums- und von Kranken frisch gezüchtete Stämme. Von ihnen habe ich 3 Stämme vom Shiga-Kruse-Typus auf alle Nährböden, je 2 Stämme vom Typus Flexner und Strong und 13 Y-Stämme auf Rhamnose- und Raffinoseagar und je 5 Stämme des letzteren Typus auf die übrigen Nährböden verimpft. Die Y-, Flexner- und Strongstämme erzeugten auf Rhamnoseagar stets Colonien mit deutlichen Knöpfen, die Shiga-Krusestämme bildeten dagegen auf diesem Nährboden nur kleine Knopfcolonien, 2 von ihnen auch auf der Raffinoseplatte. Auch hier waren die Tochtercolonien sehr klein. Auf Erythritagar bildeten alle Dysenteriestämme kleine, noch makroskopisch sichtbare spärliche Knopfcolonien und auf Adonit-, Saccharose- und Inulinagar mikroskopisch kleine Knöpfe, die kleinsten der Flexner-Stamm auf Saccharoseagar. Auf Sorbit-

agar bildeten nur der Shiga-Kruse- und Strong-Typus, auf Maltose- und Dulzitaragar der Y- und Strongtypus, auf Arbinoseagar der Shiga-Kruse-, der Y- und Flexnertypus mikroskopisch kleine Knopfcolonien. Drei als „Pseudodysenteriebazillen“ bezeichnete Sammlungsstämme habe ich auf Rhamnose und Raffinose geprüft; 2 von ihnen bildeten nur auf Rhamnose feine, aber deutliche Knöpfe; einer bildete nur auf Raffinose dicke Knöpfe.

Vergleicht man meine Resultate mit denen von Reiner Müller, so wird man finden, daß ziemlich große Unterschiede zwischen beiden bestehen. Reiner Müller hat mit 18 Kohlehydraten Hunderte von Bakterien untersucht. Nach seinen Angaben kamen die Knopfcolonien bei dem Typhusbacillus (120 Stämme) nur auf Rhamnoseplatten vor, auf Arabinoseplatten nur bei typhusähnlichen Bakterien, während er nach einem früheren Berichte in der „freien Vereinigung für Mikrobiologie“ auf Dulcit, Arabinose, Erythrit an manchen Bakterien, ohne daß er ein bestimmtes nennt, Knopfbildung beobachtet haben will. Ich fand dagegen bei meinen Typhusstämmen außer auf Rhamnoseagar regelmäßig auch auf Dulcit-, Arabinose- und Erythritagar Knopfcolonien. Bei dem Paratyphus B-Bacillus, gewonnen aus klinisch akut verlaufenden Fällen, sah er Knöpfe nur auf Raffinoseagar, ich dagegen auch auf Erythrit- und Saccharoseagar. Müller fand aber keine Knopfbildung auf Raffinoseagar bei den Mäusetypus- und Enteritis-Gärtnerbazillen, während ich sie auf diesen Nährböden bei den Mäusetyphusbazillen regelmäßig, unter den Enteritistämmen bei 6 von 10 fand. Unter den Dysenteriebazillen beobachtete Müller bei manchen Pseudodysenteriestämmen und dem Flexner-Stamm die Knöpfe nur auf der Rhamnoseplatte, dagegen gar keine bei dem Originalstamm (Shiga-Kruse). Bei meinen Versuchen bildeten indessen auf der Rhamnose- und der Erythrit-, Adonit-, Saccharose und Inulinagarplatte sämtliche Dysenteriestämme Tochtercolonien; während die Flexnerstämmen außer auf den genannten Nährböden auch noch auf Arabinoseagar Knopfcolonien bildeten. Diese Abweichung zwischen unseren Beobachtungen kann ich mir nicht erklären. Ich kann nur sagen, daß ich bei meinen Versuchen die reinsten Materialien (Kulturen und Zuckerarten) verwendet und die Beobachtung des Wachstums der Kulturen sehr lange und genau durchgeführt habe. Aus den von mir gefundenen Resultaten ergibt sich, daß der Knopfbildung der Bakterien auf kohlehydrathaltigen Nährböden keine so große diagnostische Bedeutung zukommt, wie R. Müller das annimmt. Ein und derselbe Bacillus, wie z. B. der Typhusbacillus, bildet die Knöpfe auf verschiedenen kohlehydrathaltigen Nährböden, wenn auch die Größe und Entwicklungsstärke der Knöpfe verschieden ist; andererseits bilden auf dem gleichen kohlehydrathaltigen Nährboden die verschiedenen Bakterien Tochtercolonien in

mehr oder weniger gleicher Zahl und Größe. Besonders leicht scheinen die Dysenteriebakterien Knöpfe zu bilden.

Bei den meisten Bakterien tritt die Knopfbildung erst nach ziemlich langer Zeit ein. Eine auffallende Ausnahme hiervon machen die Typhuskulturen auf Rhamnoseagar und die meisten Paratyphus-B-Bazillen auf Raffinoseagar; hier tritt die Knopfbildung in der Regel schnell und kräftig in die Erscheinung.

II. Über die Eigenschaften der Knopfkolonien.

Die Kolonien der Typhusbazillen sind auf Rhamnoseagar etwas kleiner als auf gewöhnlichem Agar. Die Knopfkolonien des Typhusbazillus auf Rhamnoseagar sind dick, fast rundlich, gelblichbraun und stark lichtbrechend. Mit der Zeit werden sie größer und treten mehr hervor; auch nimmt ihre Zahl in der Mutterkolonie, die zart weißgrau erscheint, allmählich zu. Größe und Zahl der Knöpfe sind verschieden, je nach den Stämmen und Kolonien. Selbst ein und derselbe Stamm bildet manchmal viele kleine Knöpfe, während er ein andermal wenige, aber größere Knöpfe bildet. Für die Lage der Knöpfe läßt sich keine feste Regel finden. Manchmal liegen im Zentrum mehrere zusammen, manchmal wachsen nur einige am äußeren Rand der Mutterkolonie und treten nach außen hervor, so daß der Rand der Kolonie bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung eine einer Blumenfigur ähnliche Kontur zeigt. Auf lackmushaltigem Rhamnoseagar erzeugt die Knopfkolonie keine Farbenänderung. Auf Rhamnose-Endonährboden zeigen die gut gewachsenen Knöpfe bei schwacher Vergrößerung die Andeutung einer Rosettenform. Die Ränder der Knöpfe sind ausgebuchtet, und von mehreren zentripetal gerichteten feinen, kurzen Furchen unvollkommen geschnitten. Zwischen den Furchen bemerkt man geringe Mengen reduzierten roten Fuchsins, während der knopflose Teil der Kolonie rosarot aussieht. Der Knopf selbst ist dunkelgelb. R. Müller teilt in seinem schon einmal erwähnten ersten Berichte mit, daß die Knopfkolonien auf Endo-Rhamnoseagar Säure bilden; in seiner letzten Arbeit jedoch spricht er die Vermutung aus, daß die Farbenänderung der Nährböden eine andere Ursache habe als Gas- und Säurebildung. Ich habe ferner Knopfkolonien und auch knopflose Kulturen auf ein Gemisch von lackmushaltiger 1 prozentiger Peptonlösung und je einem Kohlehydrat (Rhamnose, Dulcit, Arabinose) geimpft. Es trat keine Rötung ein, die Nährböden wurden sogar etwas dunkler blau.

Die knopfförmigen Tochterkolonien und den knopflosen Teil der Mutterkolonien kann man leicht ganz rein isolieren. Die isolierten Knopf-

kolonien wachsen auf Rhamnoseagar etwas stärker und dicker als der knopflose Teil; ganz isoliert stehende Kolonien erreichen manchmal ganz enorme Größen. Sie bilden keine Knöpfe mehr, sind also rhamnose-unempfindlich, wie ich es einmal kurz ausdrücken will; während die aus dem knopflosen Teil gewonnenen Kulturen wieder Knöpfe bilden, also noch rhamnose-empfindlich sind. Die Formen der Bazillen aus den Knopfkolonien und aus dem knopflosen Teile sind in Trockenpräparaten sowohl, wie auch im hängenden Tropfen in keiner Beziehung von einander zu unterscheiden. Auch nach Überpflanzung auf gewöhnlichen Agar zeigt sich kein Unterschied; während die Kolonien auf Rhamnoseagar etwas kleiner erscheinen als die auf gewöhnlichem Agar. Auch die biologischen Eigenschaften und das kulturelle Verhalten der Kulturen aus Mutter- und Tochterkolonien stimmen vollkommen überein. Gegen Immunsrum (Agglutinations-Titer 1:10000) agglutinieren die Ausgangskultur, die Knöpfe tragenden und die knopflosen Kolonien bis zum Endtiter. Außerdem ist die Toxität gegen Mäuse und Meerschweinchen bei den drei Kulturen im großen und ganzen gleich. Die aus Knopfkolonien gewonnenen Kulturen wurden einerseits auf Rhamnoseagar fortlaufend von einer Platte auf die andere und andererseits auf gewöhnlichem Agar fortlaufend von Röhrcchen zu Röhrcchen in Zwischenräumen von 1 bis 2 Tagen bis zur 60. Generation überpflanzt. Niemals trat nach der Überimpfung dieser beiden Reihen auf Rhamnoseagar wieder Knopfbildung auf, während die aus den knopflosen Teilen der Mutterkolonien gewonnenen Kulturen auf Rhamnoseagar stets Knopfbildung zeigten.

Von Interesse ist der Einfluß eines größeren oder kleineren Gehaltes des Nährbodens an Rhamnose auf die Knopfbildung. Ich habe Nährböden mit 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 8 und 10 Prozent Rhamnosegehalt hergestellt und sie mit derselben Typhuskultur geprüft. Das Wachstum wird durch größeren Rhamnosegehalt etwas, aber nur sehr wenig gehemmt; auf die Knopfbildung jedoch hat der verschiedene Rhamnosegehalt gar keinen Einfluß. Reiner Müller hat sogar bei nur $\frac{1}{100}$ Prozent Gehalt keinen auffälligen Unterschied gegenüber einem Gehalt von 1 Prozent beobachtet. Die Knopfbildung tritt also sowohl bei geringerem als auch bei größerem Gehalt des Nährbodens an Rhamnose ein, ohne daß das Wachstum der Typhusbazillen erheblich abnimmt. Daraus könnte man folgern, daß die Knopfbildung nicht auf einer Schädigung der Typhusbazillen durch die Rhamnose beruht.

Ich habe ferner das Wachstum der Knopfkolonien nicht nur auf der Oberfläche der Platte, sondern auch in der Tiefe des Nährbodens geprüft, indem ich flüssig gemachten Rhamnoseagar mit Bazillenkultur beschickte und dann in Petrische Schalen goß. Nach 24 Stunden entstanden in der

Tiefe gelblichbraune, wetzsteinartige Kolonien, welche an der Seite einen oder mehrere zarte, kleine Auswüchse von grauweißer Farbe zeigten. Nach weiteren 24 und 48 Stunden hatten sich die Kolonien sowohl, als auch die Auswüchse vergrößert, so daß erstere bauchig erschienen. Die ganze Kolonie war dann häufig von einem hauchartigen Hof umgeben, der manchmal geschlossen, häufig aber auch eingebuchtet war. Die Entstehung der Einbuchtung und auch die Bildung des Hofes verdanken ihre Entstehung der Bildung von Tochterkolonien, eben jenen Auswüchsen, die mir mit den Knopfkolonien an der Oberfläche identisch zu sein scheinen.

Auch die Knopfkolonien der Typhusbazillen auf Dulcitaragar und die der Paratyphusbazillen (Typus B) auf Raffinoseagar konnte ich leicht vom knopflosen Teile die Mutterkolonien isolieren; dagegen gelang die Isolierung der Knöpfe der Typhusbazillen auf Arabinoseagar erst nach Überwindung mancher Schwierigkeit. Auch die Isolierung der Knopfkolonien der Dysenteriebazillen (von Y- bzw. Strong- und Flexnerstämmen), sowie besonders des Mäusetyphusbacillus auf Raffinoseagar war recht schwierig. In diesen Fällen (besonders bei Typhus-Arabinose-Knopfkolonien und bei Mäusetyphus-Raffinose-Knopfkolonien) gelang die Isolierung der Knopfkolonien leichter durch Anlegen von Strichlinien oder gewundenen Strichkulturen auf den Nährböden als durch Aussaat mit dem Spatel zur Erzielung von einzelnen Kolonien, weil im ersteren Falle die Kulturen häufig etwas dickere und größere Knöpfe in dem Kulturrasen bildeten. Ich stach dann mit ganz feinen sterilisierten Nadeln oder mit feinen Spitzenmandarinen die Knöpfe unter dem Mikroskop ab. Die obengenannten Bakterien bilden auf den verschiedenen Kohlehydratnährböden etwas kleinere Kolonien als auf den entsprechenden gewöhnlichen Nährböden. Die isolierten Knopfkolonien und die knopflosen Teile verhalten sich morphologisch, biologisch, kulturell und serologisch genau so wie die Knopfkolonien und knopflosen Teile der Typhuskolonien auf Rhamnoseagar. Es dürfte sich deshalb eine weitere Beschreibung erübrigen.

Durch das Hinzufügen von gewissen Kohlehydraten zu Nährböden wird also ein Teil der auf ihnen wachsenden Kultur zu intensiverem Wachstum angeregt (Knopfbildung), verliert dabei aber die Fähigkeit, bei weiterer Verimpfung auf dem gleichen Nährboden Knopfkolonien zu bilden. Es fragt sich nun, worin das Wesen dieser Veränderung besteht. Es scheint mir nicht angängig, die Veränderung ohne weiteres mit den Mutationerscheinungen bei höheren Organismen zu vergleichen. Bei der Mutation verändert sich der Organismus plötzlich infolge unbekannter, innerer Ursachen, also ganz unabhängig von irgend einer äußeren, bekannten Veranlassung. Bei der Entstehung der Typhusknopfkolonien auf Rhamnoseagar liegt es nun aber wohl sehr nahe, anzunehmen, daß

die dem Typhusbacillus plötzlich als vollständig neuer und höchst wichtiger Faktor entgegentretende Rhamnose die äußere und Hauptursache der Veränderung ist, wenn man auch noch nicht entscheiden kann, ob die Rhamnose als solche oder erst ein aus ihr unter dem Einfluß des Bakterienwachstums abgespaltener chemischer Körper das eigentlich wirk-same Agens darstellt. Ganz analog liegen die Verhältnisse bei der Entstehung der Knopfkolonien auf den anderen kohlehydrathaltigen Nährböden. Berücksichtigt man aber, daß die geschilderten Veränderungen durch äußere Ursachen veranlaßt werden, so wird man sofort an die durch äußere Einflüsse hervorgerufenen Modifikationserscheinungen erinnert, welche in der Pflanzenwelt vielfach zu beobachten sind, die aber mit einer echten Mutation nichts zu tun haben. Ich erinnere in dieser Beziehung nur an das verschiedene Wachstum des Edelweiß auf Bergeshöhen und in der Ebene.

Die Verschiedenheit der Knopfkolonien der Typhusbazillen auf Rhamnose-, Dulcit- und Arabinoseagar, sowie die der anderen geprüften Bakterien auf den verschiedenen kohlehydrathaltigen Nährböden in Zahl, Größe bzw. Entwicklungstärke kann man sich wahrscheinlich so erklären, daß die das Bakterienwachstum in so spezifischer Weise beeinflussenden Substanzen an verschiedenen Molekülen des Bazillenprotoplasmas oder, wie es R. Müller ausdrückt, an verschiedenen Rezeptoren des Bazillenleibes angreifen.

III.

Lohnend schien es mir noch, zu untersuchen, wie sich eine durch das Wachstum auf einem kohlehydrathaltigen Nährboden spezifisch veränderte Kultur anderen Kohlehydraten gegenüber verhält, ob z. B. eine aus einem Knopf von einer Rhamnoseagarkultur des Typhusbacillus gewonnene Kultur, die ja nun auf Rhamnoseagar nicht mehr Knöpfe bildet, diese Eigenschaft auf Dulcit- und Arabinoseagar noch besitzt oder vielleicht auch verloren hat; zugleich wollte ich dabei auch die Frage prüfen, ob etwa die durch Rhamnoseagar hervorgerufene Veränderung durch eines der anderen wirksamen Kohlehydrate wieder aufgehoben werden kann. Zu diesem Zweck habe ich verschiedene aus Knöpfen von Rhamnose-, Dulcit- und Arabinoseagar gewonnene Typhuskulturen auf die für sie noch fremden Kohlehydratnährböden gebracht (vgl. die folgende Skizze).

Erklärung zu nebenstehender Skizze.

R = Rhamnose. D = Dulcit A = Arabinoseagar.

= knopftragende, kohlehydrat-empfindliche Kolonien.

= knopflose, kohlehydrat-unempfindliche Kolonien.

Die Zahlen geben an, wieviele Stämme auf jedem Nährboden geprüft wurden.

Sie verhielten sich hier stets wie frische Kulturen, d. h. sie bildeten Kolonien mit Tochter-(Knopf-)Kolonien. Isolierte ich nun diese Knopfkolonien, so bildeten sie keine Knöpfe auf den schon passierten zwei Nährböden, während der knopflose Teil auf dem zuletzt verwandten Nährboden stets noch Knopfkolonien bildete. Beschickte ich nun mit den auf dem zweiten Nährboden gewachsenen Knöpfen (Tochterkolonien) die drei Nährböden, so bildeten sich nur wieder auf den noch nicht passierten Nährböden Kolonien mit Knöpfen wie bei einer frischen Kultur. Die aus diesen Knöpfen gewonnenen Kulturen bilden nun aber auf keinem der Nährböden Knöpfe, während der knopflose Teil auf dem zuletzt passierten Nährboden noch Knöpfe bildet. Die Bazillenform der jetzt über drei Nährböden gegangenen Stämme zeigte keinen Unterschied von der Ausgangskultur, auch ihr biologisches und serologisches Verhalten ist gänzlich unverändert.

Die Fähigkeit der Typhusbazillen auf einem mit Rhamnose (bzw. Dulcit oder Arabinose) versetzten Nährboden Tochterkolonien zu bilden, wird also durch vorhergehende Passage über einen mit Dulcit oder Arabinose (bzw. Rhamnose oder Arabinose, bzw. Rhamnose oder Dulcit) versetzten Agar in keiner Weise beeinflusst. Es gelang vielmehr durch den geschilderten Versuch mit Hilfe der drei Nährböden, aus einer Ausgangskultur sieben verschiedene Modifikationen herauszuzüchten.

IV.

Nunmehr wende ich mich der Frage zu, ob die einmal veränderten, kohlehydrat-unempfindlichen aus Knopfkolonien gewonnenen Kulturen auf irgend eine Weise die Eigenschaften der Ausgangskultur, die Kohlehydratempfindlichkeit, wieder gewinnen können. Ich habe zu dem Zweck nach dem Vorgang von Massini die modifizierten Typhuskulturen zunächst auf karbolsäurehaltigen Agar und in ebensolche Bouillon verimpft; ferner habe ich mit ihnen Agarkulturen angelegt und diese 1 bis 2 Monate alt werden und trocknen lassen; ich habe sie weiterhin auf malachitgrün-, harnsäure- und coffeinhaltige Nährböden verimpft. Eine Prüfung dieser Kulturen ergab jedesmal ein negatives Resultat; die modifizierten Kulturen hatten ihre einmal geänderte Eigenschaft festgehalten. Weiter habe ich Kulturen 1 Stunde lang bei 50° C erhitzt, sie außerdem mit Menschenkot gemischt und diese Mischung 3 bis 4 Tage stehen lassen. Auch die dann gewonnenen Kulturen erwiesen sich als unverändert. Dann habe ich die Kulturen an ein Meerschweinchen und einen Affen mit Sonde verfüttert, nachdem zuvor der Magensaft der Tiere mit Natrium bicarbonicum neutralisiert worden war. Beide Tiere zeigten keine Krank-

heitserscheinungen. Aus den weichen Stühlen, welche an den folgenden Tagen entleert wurden, habe ich wieder Typhuskolonien bekommen; aber sie zeigten keine Knöpfe, ein Zeichen, daß es auch durch dieses Verfahren nicht möglich ist, den modifizierten Stämmen die Eigenschaften der Ausgangskultur wiederzugeben.

Ich versuchte nunmehr, da es inzwischen Bernhardt und Markoff gelungen war, einem modifizierten Dysenteriebazillenstamm durch Passage durch dysenterie-empfindliche Affen die Eigenschaften der Ausgangskultur wiederzugeben, mein Ziel dadurch zu erreichen, daß ich die modifizierten Typhusbazillenstämme unter Wachstumsbedingungen brachte, die mehr den natürlichen Existenzbedingungen dieser spezifisch-menschenpathogenen Mikroorganismen entsprechen. Hierzu verimpfte ich einen Rhamnose-unempfindlichen und zwei der im vorigen Kapitel erwähnten Rhamnose-Dulcit-Arabinose-unempfindlichen Kulturen 1. zweimal hintereinander auf frisch hergestellte Ascitesagarplatten, 2. in mit Menschengalle versetzte Peptonröhrchen und hielt diese 14 Tage lang im Brutofen bei 37° C. Von den Ascitesagar- und Gallekulturen legte ich dann gleichzeitig mit einer unbehandelten Originalkultur des modifizierten Stammes als Kontrolle Kulturen auf Rhamnoseagar an. Nach etwa 10 Tagen fand ich in beiden Serien sowohl auf den mit Ascitesagarkultur, als auch auf den mit Gallekultur beschickten Platten mehrere Kolonien, welche kleine, aber schon makroskopisch sichtbare Knöpfe trugen, und bei schwacher Vergrößerung konnte ich auch in allen übrigen Kolonien auf diesen Platten Knöpfe erkennen, während in den Kolonien auf den Kontrollplatten sich keine Knöpfe zeigten. In einer 3. Versuchsanordnung habe ich die gleichen modifizierten Ausgangskulturen Mäusen intraperitoneal eingespritzt, nach dem Tode der Mäuse aus dem Herzblut auf gewöhnlichem Agar eine neue Kultur gezüchtet, und diese wieder zur Injektion benutzt usw. bis zur 5. Mäusepassage. Die sodann aus dem Herzblut der Mäuse auf Rhamnoseagar gewonnene Kultur zeigte auf Rhamnoseagar Kolonien mit kleinen, aber schon makroskopisch sichtbaren Knöpfen, während die gleichzeitig angelegten Kontrollkulturen von dem modifizierten Stamm keine Knöpfe in den Kolonien erkennen ließen.

V.

Analog den oben geschilderten Versuchen mit Typhusbazillen habe ich auch einem modifizierten Mäusetyphusstamm die Eigenschaften des Originalstammes zurückgeben können. Ich habe dazu mit einer Raffinose-unempfindlichen Kultur des Mäusetyphusbacillus (Stamm Wassermann) einen Fütterungsversuch an weißen Mäusen vorgenommen. Um zu prüfen,

ob die Mäuse nicht schon spontan Mäusetyphus, bzw. Paratyphusbazillen in ihrem Verdauungstraktus beherbergten, habe ich sie, jede in besonderem Glase, nach dem Vorgange von Heuser zunächst eine Zeitlang nur mit Eiweißnahrung gefüttert; sie erhielten 10 Tage lang nur zur Herstellung von Bouillon ausgekochtes Rindfleisch. Sie blieben dabei vollständig gesund. Dann gab ich jeder Maus ein Stück Brot, das mit einer Kochsalzemulsion einer 24stündigen Agarkultur jenes raffinose-unempfindlichen Mäusetyphusstammes getränkt war. Auf diese Weise nahm jede Maus etwa 2 Ösen Bazillenmenge auf. Nach 7 bis 10 Tagen starben sie alle unter den typischen und anatomischen Veränderungen des Mäusetyphus in den inneren Organen. Aus Herzblut, Milz, Leber und Darminhalt züchtete ich die Mäusetyphusbazillen heraus und beschickte mit den gewonnenen Kulturen und je einer Kultur des modifizierten Ausgangsstammes, sowie des nicht modifizierten Originalstammes als Kontrollen Raffinoseagar. Nach etwa 1 Woche entwickelten sich in vielen Kolonien der aus den Mäusen gezüchteten Stämme gelbliche Knöpfe, genau wie bei der nicht modifizierten ursprünglichen Mäusetyphuskultur; während sich auf der Kontrollplatte der modifizierten Ausgangskultur keine Knopfbildung erkennen ließ. Die rückverwandten Stämme verhielten sich auch insofern genau wie der nicht modifizierte Originalstamm, als eine Abimpfung aus den auf Raffinoseagar gebildeten Knöpfen sofort wieder einen modifizierten, raffinose-unempfindlichen Stamm ergab.

Es ist mir also auf verschiedenen Wegen gelungen, den Beweis dafür zu erbringen, daß die Kohlehydrat-Unempfindlichkeit gegen bestimmte modifizierte Typhus- und Paratyphusbazillen keine unveränderliche Eigenschaft ist, sondern ihnen vielmehr, wie sie ihnen willkürlich künstlich angezüchtet, auch wieder willkürlich genommen werden kann. Durch meine Versuche wird einmal die Annahme von Reiner Müller widerlegt, daß die Knopfbildung in Typhuskolonien auf Rhamnoseagar auf einer Mutation im Sinne von de Vries beruhe, sodann aber auch die Behauptung von Baerthlein, daß die Zurückführung der „mutierten“ Bakterienstämme in die ursprüngliche Form weiter nichts als Atavismus sei. Mutation und Atavismus sind entgegengesetzte Vorgänge in der Natur, deren Gesetze wir nicht kennen, und die wir nicht willkürlich hervorrufen können. Die hier zur Debatte stehenden Vorgänge in Bakterienkulturen haben wir dagegen vollständig in der Hand, wir können den Typhusstämmen verschiedene Eigenschaften anzüchten und sie ihnen nehmen, d. h. wir können sie modifizieren oder variieren, die gewonnenen Eigenschaften bleiben aber labil.

Literatur-Verzeichnis.

-
- Neisser, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXXVIII. Beiheft 1906.
 Massini, *Archiv für Hygiene*. 1907. Bd. LVI.
 Reiner Müller, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XLII. Beiheft 1903.
 Derselbe, *Ebenda*. 1911. Bd. LVIII.
 Derselbe, *Münchener med. Wochenschrift*. 1909. Nr. 17.
 Derselbe, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1910. Bd. LI.
 Sobernheim u. Seligmann, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1910. Bd. L.
 Hübner, *Ebenda*. 1909. Bd. XLIV.
 Burk, *Archiv für Hygiene*. 1908. Bd. LXV.
 Bärthlein, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1911. Nr. 9 u. 31.
 Derselbe, *Ebenda*. 1912. Nr. 4 u. 16.
 Derselbe, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1912. Bd. LXVI.
 Derselbe, *Deutsche med. Wochenschrift*. 1912. Nr. 31.
 Burri, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1910. I. Abt. Orig. Bd. LIV.
 Derselbe, *Ebenda*. 1910. II. Abt. Bd. XXVIII.
 Kruse, *Allgemeine Mikrobiologie*. 1911.
 Baur, *Einführung in die experim. Vererbungslehre*. Berlin 1911.
 Beneke, *Bau und Leben der Bakterien*. 1912.
 Bernhardt, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1912. Nr. 15.
 Derselbe, *Diese Zeitschrift*. 1912. Bd. LXXI.
 Bernhardt u. Markoff, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1912. Bd. LXV.
 Gruber u. Fritsch, *Archiv für Hygiene*. Bd. VIII.
 Schottelius, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1906. Bd. XXXVI.
 Gottschlich, *Ebenda*. 1906. Bd. XXXVIII.
 Heuser, *Diese Zeitschrift*. 1910. Bd. LXV.
-