II.

Ueber die entwicklungshemmenden Stoffwechselproducte der Bacterien und die sog. Retentionshypothese.

Von

Dr. Sirotinin
aus St. Petersburg.

Es ist eine weitverbreitete Ansicht, dass die Heilung einer Infectionskrankheit und auch die durch einmaliges Ueberstehen bewirkte Immunität gegen Recidive derselben Krankheit dadurch zu Stande kommt, dass von den krankheitserregenden Spaltpilzen bei ihrer Lebensthätigkeit im Organismus Stoffe geliefert werden, welche einestheils die pathogenen Mikroorganismen auf der Höhe der Krankheit zum Absterben bringen, anderentheils durch ihr längeres Verweilen im Körper letzteren gegen eine spätere Invasion und Vermehrung derselben Bacterien schützen.

Ursprünglich war diese Annahme durch die Beobachtung veranlasst, dass bei verschiedenen Gährungen (z. B. Milchsäure-, Buttersäure-, Harngährung u. s. w.), wenn ein bestimmter Gehalt der Nährflüssigkeit an Gährungsproducten erreicht ist, selbst nach Zuführung neuer Nährstoffe kein weiteres Wachsthum der Pilze und keine weitere Zerlegung der gährfähigen Substanzen stattfindet. Diese Beobachtungen glaubten viele Autoren mit um so grösserem Rechte auf die Lebensvorgänge der krankheitserregenden Spaltpilze übertragen zu dürfen, als man lange Zeit den krankmachenden Einfluss der letzteren auf den thierischen Körper als einen der Gährwirkung der Hefen und gährungserregenden Bacterien analogen Vorgang auffasste. Bei diesem Analogieschluss wurde indessen ausser Acht gelassen, dass das Aufhören der Gährungen immer erst bei einem sehr hohen Gehalte der Nährflüssigkeit an Gährproducten eintritt, bei Concentrationen, die im lebenden Körper auch nicht entfernt möglich gedacht werden können.

Wenn trotzdem die Hypothese einer Retention von bacterienschädlichen Stoffwechselproducten im Körper und die auf Grund derselben versuchte Erklärung der Immunität in weiteren Kreisen Eingang gefunden hat, so ist dies wohl hauptsächlich einigen Beobachtungen, die später bei der Eiweissfäulniss gemacht wurden, zuzuschreiben.

Bei Untersuchungen von faulenden eiweisshaltigen Flüssigkeiten fanden nämlich mehrere Forscher in diesen Stoffwechselproducte der Bacterien, welche schon in weit geringerer Concentration als die bei den vorgenannten Gährungen entstehenden Körper das Wachsthum von Mikroorganismen zu verhindern im Stande sind. Es waren dies Körper der aromatischen Reihe, wie Indol, Scatol, Kresol und vorzüglich Phenol, welch' letzterem in der Zeit, in welcher diese Entdeckungen zuerst gemacht wurden, eine weit grössere desinficirende Kraft zugeschrieben wurde, als nach neueren Untersuchungen in der That besteht.

Der Erste, welcher bei der Eiweissfäulniss die Bildung von Phenol nachwies, war Baumann.¹ Dieser stellte aus einer sechs Tage bei 40° C. gefaulten Mischung von 100 ^{grm} Pancreas, 100 ^{grm} Muskelfleisch und 250 ^{grm} Wasser 0.002 ^{grm} reines Phenol dar. Baumann drückt bei Gelegenheit dieses Befundes nur seine Verwunderung darüber aus, dass bei der Fäulniss Stoffe entstehen, die dem Fortschreiten des Fäulnissprocesses selbst schädlich sein müssen, ohne dass er jedoch daran weitere Schlussfolgerungen anknüpft.

Dagegen bezeichnet Nencki² als Ursache des Aufhörens mancher Fäulnissprocesse nach bestimmter Zeit geradezu eine übermässige Ansammlung von Stoffwechselproducten der Fäulniss erregenden Bacterien. Die Beobachtungen, welche ihn zu dieser Ansicht führten, machte Nencki gelegentlich der experimentellen Nachprüfung einer Behauptung von Gunning, nach welcher bei Luftabschluss keine Fäulniss stattfindet, oder doch wenigstens nach sehr kurzer Zeit aufhört. Die von Gunning erhaltenen Resultate glaubt Nencki wesentlich auf zwei Ursachen zurückführen zu können.

In den Fällen, in welchen überhaupt keine Fäulniss in den luftleeren Röhren auftrat, sind wahrscheinlich zufällig nur aërobe Bacterien vorhanden gewesen. Wenn aber die Fäulniss sich zwar Anfangs einstellte, nach kurzer Zeit jedoch wieder aufhörte, so ist dieses nach Nencki dadurch zu erklären, dass von den Bacterien bei ihrer Lebensthätigkeit giftige Producte geliefert waren, durch welche dieselben ihrer eigenen Weiterentwicklung ein Hinderniss in den Weg legten. Auch bei seinen eigenen Versuchen sah Nencki ein baldiges Aufhören der Fäulniss in zugeschmolzenen oder sonstwie hermetisch geschlossenen Gefässen.

Dass dieses Sistiren der Zersetzung durch Anhäufung flüchtiger Stoffwechselproducte der Bacterien bewirkt werde, glaubt Nencki durch Hinweis auf analoge Vorgänge bei höheren Thieren, welche ja auch für sie selbst nachtheilige Stoffwechselproducte liefern, und auf das Vorkommen von desinficirenden Körpern der aromatischen Reihe in Fäulnissgemischen begründen zu können.

¹ *Zeitschrift für physiolog. Chemie.* Bd. I. S. 60.

² *Journal für praktische Chemie.* Mai 1879.

Auch Nencki selbst gelang es in seinen eigenen Versuchen, geringe Mengen derartiger Stoffe aus verschiedenen Faulflüssigkeiten rein darzustellen.

Aus einer gefaulten Mischung von zerriebenen Pancreas mit Wasser liessen sich 0.0472 ^{grm} picrinsaures Indol gewinnen. In derselben Flüssigkeit waren auch bedeutendere Mengen von flüchtigen Fettsäuren, besonders von Buttersäure, enthalten. In einem anderen Falle isolirte Nencki aus einer faulen Mischung von 2330 ^{grm} Pankreas, 500 ^{grm} Muskelfleisch und 8000 ^{grm} Wasser 0.3 ^{grm} Scatol (0.005 Procent). In 1750 ^{grm} stinkendem Eiter fand er 0.082 ^{grm} Indol und 0.008 ^{grm} Phenol (0.005 Proc. Indol und 0.0005 Proc. Phenol).

Die Ansicht Nencki's fand dann an Wernich¹ einen energischen Vertreter, welcher daraus denn auch die auf die Infectionskrankheiten bezüglichen Schlüsse zu ziehen wagte. In Bezug auf das Vorkommen von Körpern der aromatischen Reihe in durch Bacterien zersetzten Flüssigkeiten führt Wernich zunächst an, dass auch E. und H. Salkowski derartige Stoffe (wie Indol, Scatol, Phenol, Phenylelessigsäure, Hydrozimmtsäure u. s. w.) in mehr weniger grossen Mengen aus Fäulnissgemischen darstellen konnten.

Wernich suchte nun in einer umfangreichen Versuchsreihe festzustellen, welche Concentrationen dieser Körper nothwendig sind, um die Entwicklung von Bacterien in faulfähigen Flüssigkeiten zu hindern.

An der Hand eines allerdings im Vergleich zu unseren heutigen Methoden nicht sehr exacten Verfahrens fand er, dass hierzu folgender Gehalt ausreichte:

Chem. Körper	In saurer Lösung	In neutraler Nährlösung
Scatol	0.04 %	0.03 %
Indol	0.06 „	0.03 „
Kresol	0.08 „	0.04 „
Phenol	0.5 „	0.5 „
Phenylelessigsäure .	0.12 „	0.16 „
Hydrozimmtsäure .	0.06 „	—

Zur Behinderung der Fäulnis gekochten Fleisches waren noch stärkere Concentrationen erforderlich: 0.05 Proc. Scatol, 0.2 Proc. Kresol, 0.1 Proc. Indol.

In den Analysen von Nencki und Baumann bleibt die Menge der aus Fäulnissgemischen dargestellten bacterienfeindlichen Stoffe procentisch weit hinter dem Gehalt, welchen Wernich als zur Erzielung einer Entwicklungshemmung notwendig gefunden hat, zurück. Trotzdem behauptet Wernich, „dass die Bacterien sich selbst die Bedingungen ihres Unterganges bereiten“, und „dass sehr kleine Mengen der so entstandenen Gifte genügen, um die Culturen gegen die Infection mit frischen gleichartigen Bacterien zu schützen.“

Beim Wachsthum pathogener Bacterien im Körper liegen nach Wernich's Meinung die Verhältnisse nicht wesentlich anders, ja derselbe hält es, bei dem cyclischen Verlauf mancher Infectionskrankheiten, geradezu für eine logische Forderung, dass die Krankheitserreger durch Gifte, welche sie selbst während

¹ Die aromatischen Fäulnisprodukte in ihrer Einwirkung auf Spalt- und Sprosspilze. Virchow's Archiv. Bd. LXXVIII.

ihres Wachsthums und ihrer Vermehrung ausscheiden, nach einer gewissen Zeit ihren Untergang finden.

Bei dem Versuch, die Immunität durch Zurückhaltung äusserst geringer Mengen von Stoffwechselproducten der Bakterien im Organismus zu erklären, verhehlt sich Wernich allerdings nicht, dass eine solche Retention physiologisch ohne jede Analogie sei; doch weist er darum die Möglichkeit eines Zustandekommens der Immunität auf diesem Wege keineswegs von der Hand.

Chauveau, gleichfalls einer der wärmsten Vertheidiger der Retentionshypothese, hat es versucht, auf einem anderen Wege die Richtigkeit seiner Theorie wahrscheinlich zu machen. Dieser Autor beobachtete vielfach, dass die Lämmer algerischer Schafe, die während der Tragzeit Milzbrand überstanden haben, gegen diese Krankheit immun sind. Da Chauveau im Fötalblut von an Milzbrand erkrankten algerischen Schafen nur ganz ausnahmsweise Milzbrandbacillen nachweisen konnte, so glaubt er sich zu dem Schlusse berechtigt, dass die Immunität der Lämmer durch einen löslichen Stoff, welcher im Körper der Mutter von den Milzbrandbacillen gebildet wird und durch die Zotten in das Blut des Fötus hinüber diffundirt, hervorgebracht ist. Offenbar lässt aber dieser Befund von Chauveau auch verschiedene andere Deutungen zu.

Andere Autoren acceptiren zwar nicht die Erklärung der erworbenen Immunität durch die Retentionshypothese, aber betonen die Möglichkeit eines desinfectorischen Einflusses der Stoffwechselproducte verschiedener Bakterien.

So weist Koch¹ darauf hin, dass für die Abschwächung von Milzbrandbacillen (welche ja einer Schädigung gleichzuachten ist) deren eigene Stoffwechselproducte vielleicht theilweise von Bedeutung sind; ferner, dass das rasche Zugrundegehen von Choleraspirillen² in faulenden Flüssigkeiten möglicherweise durch eine ungünstige Wirkung der Stoffwechselproducte der Fäulnisbacillen bedingt sei. Virchow³ theilte ferner auf der Choleraconferenz eine Beobachtung von Babès mit, nach welcher Choleracolonien auf Gelatineplatten in der Nähe von mit Saprophyten gezogenen Strichen nicht gut wachsen, und sprach die Meinung aus, dass hierfür die Stoffwechselproducte der Saprophyten verantwortlich zu machen seien.

Aehnliche Anschauungen werden auch von Garrè⁴ vertreten. Dieser Forscher fand, dass Gelatineplatten, auf welchen alternirend Striche mit *Staphylococcus aureus* und *B. fluorescens putidus* gezogen wurden, keine oder doch nur geringe Entwicklung der Staphylokokken zeigten, ohne dass die Aussaat des *Mitrococcus* etwa von dem Saprophyten überwuchert wäre. Ferner erwies sich Gelatine, auf welcher *B. fluorescens putidus* gewachsen war, nach Entfernung der Cultur als zur erneuten Ansiedelung dieses Pilzes selbst, sowie einiger anderer, auch pathogener Bakterien ungeeignet. Auch bei anderen Mikroorganismen war die Beobachtung zu machen, dass sie beim Wachsthum ihren Nährboden so verändern, dass manche Bakterien auf ihm nicht mehr fortkommen. Garrè schliesst aus diesen Beobachtungen, dass zwischen manchen Bakterienarten ein gewisser Antagonismus besteht, der namentlich darin seinen Grund hat, dass von den Mikroorganismen giftige, entwicklungshem-

¹ *Ueber Milzbrandimpfung*. Eine Entgegnung u. s. w. 1882. S. 35 und 36.

² *Verhandlungen der Choleraconferenz*.

³ *II. Choleraconferenz*. S. 67.

⁴ Ueber Antagonisten unter den Bakterien. *Correspondenzblatt für schweizer Aerzte*. 1887.

mende Producte geliefert werden. In der Natur zeigt sich ein derartiger Antagonismus zwischen Saprophyten und pathogenen Bakterien z. B. in dem raschen Zugrundegehen von Choleraspirillen in Fäulnisgemischen. Garrè hält es nicht für unmöglich, dass auch im thierischen Körper, in ähnlicher Weise, wie in seinen Versuchen mit künstlichen todtten Nährböden, eine antagonistische Wirkung von Bakterien derselben oder verschiedener Art statthaben könne, und dass dadurch vielleicht einiges Licht auf die Ursache der Immunität und der örtlichen und zeitlichen Disposition bei Infectiouskrankheiten geworfen werde. Endlich scheint es Garrè nicht ausgeschlossen zu sein, dass der Antagonismus der Bakterien sogar zu therapeutischen Zwecken zu verwerthen ist.

In letzterem Sinne hat übrigens schon vor der Veröffentlichung Garrè's Cantani¹ auf Grund eines Versuches Inhalationen von „*Bacterium termo*“ zur Bekämpfung der Lungentuberkulose empfohlen.

Um nun Aufklärung darüber zu erlangen, welche Art von Stoffwechselproducten einen ungünstigen Einfluss auf das Wachstum und Gedeihen der Bakterien ausüben, und in welcher Ausdehnung sich dieser Einfluss geltend macht, habe ich eine besondere Versuchsreihe angestellt, deren Aufgabe es war, zu ermitteln,

1. in wie weit gewisse saprophytische und pathogene Bakterienarten durch ihre eigenen Stoffwechselproducte am Wachstum gehindert werden, und
2. in welcher Weise Stoffwechselproducte saprophytischer und pathogener Bakterienarten oder auch die in Gemischen von Bakterien (faulende Flüssigkeiten u. s. w.) producirten Stoffe das Wachstum anderer Mikroorganismen beeinflussen.

A. Versuchsanordnung.

Zunächst einige Worte über die Methode, nach welcher ich meine Versuche angestellt habe.

Da die Stoffwechselproducte der Spaltpilze nur sehr unvollkommen bekannt sind, so konnte ich natürlich nicht mit bestimmten chemischen Körpern experimentiren, sondern war genöthigt, von ausgewachsenen Culturen auszugehen, welche sämtliche Stoffwechselproducte der in ihnen gewachsenen Bakterien, höchstens mit Ausnahme einiger gasiger oder sehr flüchtiger Stoffe, enthalten.

Derartige von den darin vorhandenen lebenden Bakterien befreite Culturen lassen sich in beliebigem Verhältnisse verschiedenen Nährsubstraten zufügen, und man kann dann auf diesen den Einfluss der Stoffwechselproducte auf das Wachstum eingimpfter Bakterien leicht beobachten.

¹ *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften*. 1885.

Als ich an die Ausführung derartiger Versuche herantrat, musste ich mir zunächst die Frage vorlegen, welchen Modus der Sterilisation ich für die Culturen zu wählen hatte, um sicher zu sein, dass in der sterilisirten Flüssigkeit noch sämmtliche in der ursprünglichen Cultur enthaltenen Stoffwechselproducte vorhanden waren. Die sonst zur Sterilisation von Flüssigkeiten gewöhnlich gebräuchliche Erhitzung auf 100° liess von vornherein den Einwand zu, dass dabei entweder ein Theil der deletären Stoffe zerstört wird, oder dass die bei 100° flüchtigen Körper entweichen könnten. Auch durch eine discontinuirliche Sterilisation bei mässig erhöhter Temperatur liess sich dieser Einwand nicht völlig vermeiden.

Als das vollkommenste Mittel, um alle in der alten Culturflüssigkeit enthaltenen Stoffe in sterilisirter Lösung zu bekommen, erschien mir die Filtration durch ein Pasteur-Chamberland'sches Porcellanfilter. Wenn bei Anwendung dieses Verfahrens die Vorsicht beobachtet wird, das Filtrat erst aufzufangen, nachdem die Filtration schon eine Zeit lang im Gange war, so kann man sicher sein, dass alle in der unfiltrirten Cultur gelösten Stoffe in der filtrirten Flüssigkeit in voller Menge ebenfalls vorhanden sind. Die Benutzung der zuerst ablaufenden Flüssigkeit muss jedoch durchaus vermieden werden, weil das Porcellanfilter — wie ich leider erst nach einer Reihe von Fehlversuchen erfuhr — manche Stoffe Anfangs zurückhält und dieselben erst passiren lässt, nachdem es sich vollständig mit ihnen gesättigt hat. Meine in dieser Beziehung gemachten Erfahrungen habe ich am Schlusse der Arbeit in einem Nachtrage zusammengestellt.

Die ausschliessliche Anwendung der Filtrationsmethode würde jedoch jedes einzelne Experiment so mühsam und zeitraubend gestaltet haben, dass ich nur wenige Bacterien in Untersuchung hätte ziehen können. Nun ergaben aber mehrfache Vergleiche der Stoffwechselproductlösungen, welche durch Filtriren und derjenigen, welche durch Kochen der Culturen hergestellt waren, in ihrer Wirkung auf das Wachsthum der Bacterien keinerlei Unterschied, obgleich ich zu diesen Versuchen absichtlich zum Theil Culturen von bei der Fäulniss betheiligten und zahlreiche flüchtige übelriechende Producte liefernden Mikroorganismen wählte, nämlich *Proteus vulgaris* und *Bac. fluorescens liquefaciens*; ausserdem stellte ich einen solchen Vergleichsversuch mit *Bac. anthracis* an.

Auf Grund dieser Resultate — welche unten in Tabelle 2, 5 und 11 ausführlich mitgetheilt sind — habe ich mich berechtigt gefühlt, im Folgenden grösstentheils die Methode des Sterilisirens durch Hitze (meist 10 Minuten langes Verweilen in strömendem Dampf von 100°) anzuwenden; und ich habe um so weniger gezögert, dieses Verfahren einzuschlagen,

als es mir auf solche Weise möglich wurde, eine weit grössere Zahl von Bakterien in den Bereich der Untersuchung zu ziehen.

Bei den Filtrationsversuchen gestaltete sich die Methode folgendermaassen:

In grossen ca. 1 Liter fassenden Erlénmeyer'schen Kolben wurde Bouillon, welche in etwa 2.5 cm hoher Schicht den Boden der Gefässe bedeckte, mit den Mikroorganismen, deren Stoffwechselproducte geprüft werden sollten, besät. Die Kolben standen dann 3 bis 4 Wochen bei 22° C.

Diese Culturen wurden nun durch ein Pasteur'sches Filter unter Anwendung einer Druckluftpumpe filtrirt. Um die ablaufende sterile Flüssigkeit während der meist einen ganzen Tag dauernden Filtration vor Verunreinigungen zu schützen, bediente ich mich folgender Anordnung. Der Ausflusssapfen des Filters wurde so fest wie möglich mit einem Gummischlauch verbunden, dessen anderes Ende in fester Verbindung mit einem Glasrohr stand, welches durch die eine Oeffnung eines dreifach durchbohrten Kautschukstopfens in eine graduirte Messflasche mündete. In der zweiten Oeffnung dieses Stopfens steckte ein kurzes abwärts gebogenes und mit einem Wattepropfen verschlossenes Rohr *A*, das beim Einfliessen der Flüssigkeit ein Entweichen der Luft gestattete. In der dritten Oeffnung endlich war ein bis auf den Boden der Flasche reichendes Glasrohr angebracht, welches oberhalb des Kautschukstopfens ebenfalls nach abwärts gebogen und in eine feine Spitze ausgezogen war. Der Kautschukstopfen und der Hals der Flasche waren dicht mit Watte umwickelt. Dieses Gefäss sammt dem durch den Kautschukschlauch daran hängenden Thoncylinder wurde nun durch mehrere Stunden im strömenden Wasserdampf sterilisirt und dann mit der Filtration der Culturen begonnen. Waren etwa 150 bis 200 ccm Flüssigkeit durchfiltrirt, so wurden dieselben mittelst Einblasens von Luft in das Rohr *A* durch die feine Spitze des langen Rohres vollständig aus der Flasche entleert. Als unbrauchbar, weil nicht alle Stoffwechselproducte enthaltend, wurden 200 ccm erstes Filtrat betrachtet. Diese Menge erschien genügend, da in den Vorversuchen mit Typhusculturen und Alkaloidlösungen schon nach Filtration von 50 bis 60 ccm die Retentionsfähigkeit des Filters fast gleich Null geworden war.

Nach Ablassen dieser ersten Portion des Filtrates wurde die Filtration fortgesetzt, bis die zum Versuche nöthige Menge Flüssigkeit erhalten war.

Die auf solche Weise gewonnenen Stoffwechselproducte konnten nicht mit sicherem Ausschluss von Verunreinigungen mit frischer Nährgelatine gemischt werden. Es waren deshalb in diesen Fällen Strich- oder Stichculturen nicht anwendbar, sondern nur das Plattenverfahren zu wählen, bei welchem einige fremde Bakterien nicht sonderlich störend sind. Ferner war auch die sonst gebräuchliche Nährgelatine leider nicht anwendbar. Da nämlich gerade verflüssigende Bakterien (*Proteus*, *B. fluoresc. liquef.*, Milzbrand) zu den Versuchen dienten, also Arten, die ein Gelatine lösendes (peptonisirendes) Ferment liefern, so erstarrte die mit den Stoffwechselproducten und also auch mit diesem Ferment gemischte Gelatine entweder gar nicht, selbst wenn ich zur Mischung 15procentige Gelatine nahm, oder aber sie wurde nach kurzem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wieder flüssig.

Versuche, die Gelatine durch geringen Agar-Agarzusatz vor der Verflüssigung zu schützen, schlugen fehl; es blieb also nichts übrig, als reinen Nähragar zum Anfertigen der Platten zu benutzen.

Da der Nähragar bei höchstens 40° mit den Stoffwechselproducten gemischt werden durfte, um dem Einwande zu entgehen, dass bei höherer Temperatur einige bakterienfeindliche Stoffe zerstört werden könnten, so war die einmalige Mischung einer grösseren Menge des stoffwechselproducthaltigen Nährbodens und nachherige Verteilung in Reagensgläser nicht wohl angängig. Ich habe deshalb bei der Herstellung der Platten folgenden Weg eingeschlagen, welcher auch die Schwierigkeit, in dem eben vor dem Erstarrungspunkte stehenden Agar mehrere Verdünnungen herstellen zu müssen, beseitigte. 5 ^{cem} der stoffwechselproducthaltigen Flüssigkeit wurden aus dem Auffanggefässe durch die feine Rohrspitze in sterilisirte Reagensgläser geblasen und diese mit Wattepfropfen verschlossen. Die gleiche Anzahl von sterilisirten Reagensgläsern wurde mit je 5 ^{cem} sterilisirten destillirten Wassers gefüllt. In letzterem war eventuell vorher die gleiche Reaction wie die des stoffwechselproducthaltigen Filtrates hergestellt.

Die Reagensgläser wurden dann in Wasserbäder mit einer Temperatur von 35° C. gesetzt und auf dieser Temperatur bis zur Mischung mit dem Agar erhalten. Vor der Mischung wurden in ihnen direct die Verdünnungen angelegt, und zwar von jedem zu untersuchenden Mikroorganismus 5 in beiden Flüssigkeiten. Die Erfahrung hat mir gezeigt, dass auf diese Weise fast immer je zwei unter einander die gleiche Zahl von Colonieen zeigende Platten erhalten werden. Nach Anlegung der Verdünnungen wurden zu jedem Glase 5 ^{cem} flüssigen 40° warmen $1\frac{1}{2}$ procentigen Nähragars gegossen, rasch gemischt und die Mischung sogleich in einer Petri'schen Schale zur Platte ausgegossen. Wenn man schnell genug verfährt, so lässt sich nicht nur eine gleichmässige Mischung der Flüssigkeit mit dem Agar erreichen, sondern der Inhalt des Glases kann auch bis auf den letzten Tropfen in die Schalen gebracht werden.

Die so hergestellten Platten wurden darauf sämmtlich in demselben Brüt-ofen bei 22° C. gehalten. Nach ca. 48 Stunden wurde die Grösse der auf den mit alkalischem Wasser hergestellten Controlplatten gewachsenen Colonieen mit denen der entsprechenden stoffwechselproducthaltigen Platte von gleicher Colonieenzahl verglichen. Nach dieser Methode ist es sehr wohl möglich, eine etwa stattfindende Wachstumsverlangsamung oder Wachstumshehmung sogar quantitativ abzuschätzen (vgl. die vorstehende Arbeit von Smirnow).

Zur Bereitung der Stoffwechselproductlösungen mit Hilfe des Sterilisirens durch Hitze wandte ich folgendes Verfahren an: Ein grosser Kolben mit 50 bis 200 ^{cem} gewöhnlicher 5 procentiger Fleischwasserpeptongelatine, welche, um dem Sauerstoff genügend Zutritt zu gewähren, nur in wenige Centimeter dünner Schicht den Boden des Gefässes bedeckte, wurde durch einige Stiche mit den zu untersuchenden Bakterien geimpft; darauf, um die Reinheit der wachsenden Culturen zu constatiren, 2 bis 3 Tage bei 20 bis 22° C. gehalten und dann für 10 bis 12 Tage in einen Brüt-ofen gesetzt, dessen Temperatur 35° C. betrug. Durch die erhöhte Temperatur wurde die Gelatine verflüssigt und konnte so leichter und schneller von den Bakterien gleichmässig durchwachsen werden.

Wenn sich im Verlauf mehrerer Tage oder Wochen die anfänglich eingetretene Trübung der Gelatine zu Boden gesetzt hatte, und die obenstehende

Flüssigkeit vollständig klar geworden war, wurde letztere abgehebert und durch 20 bis 30 minutenlanges Kochen im Dampfoden sterilisirt.

Die so erhaltene stoffwechselproducthaltige Flüssigkeit fügte ich entweder in der Weise dem frischen Nährboden zu, dass ich dieselbe mit dem gleichen Quantum 10 procentiger Fleischwasserpeptongelatine (mit 1 Procent Pepton und 0·5 Procent NaCl) versetzte; die Nährgelatine hatte dann ungefähr den üblichen Gehalt an Nährstoffen und enthielt die Hälfte der Stoffwechselproducte, die unter natürlichen Verhältnissen in alten Culturen vorkommen.

Oder es wurde, um auch Gelatine mit der ganzen Menge der Stoffwechselproducte zu bekommen, der aus den alten Culturen gewonnenen Flüssigkeit einfach 1 Procent Pepton, 0·5 Procent Kochsalz und 7 bis 8 Procent Gelatine zugesetzt.

Die so gewonnene, meist völlig klare Gelatine wurde in Mengen von 5 bis 8 ccm in Reagensgläser gefüllt und durch kurzes Aufkochen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen sicher sterilisirt. Die Gelatine blieb nach dem Zusatz der stoffwechselproducthaltigen Flüssigkeiten, auch wenn dieselbe von verflüssigenden Arten herstammte, stets gut fest. Es war also das Gelatine lösende Ferment durch Kochen zerstört.

In den Gläschen mit der stoffwechselproducthaltigen Gelatine wurden nun Stichculturen von zuverlässigen Reinculturen verschiedener Bacterien angelegt. Es wurden jedesmal zwei Röhrchen mit demselben Mikroorganismus geimpft, und ebenso zum Vergleich zwei Gläschen mit gewöhnlicher Fleischwasserpeptongelatine, die in den erstbezeichneten Versuchen mit dem gleichen Volum destillirten Wassers verdünnt war.

Bei der Impfung der Gelatine war es natürlich von Wichtigkeit, immer annähernd dieselben Mengen Culturmateriel in die einzelnen Gläschen zu bringen, da durch eine stärkere Einsaat leicht ein energischeres Wachsthum, besonders im Anfang, vorgetäuscht werden kann. Eine gleichmässige Impfung lässt sich indessen ziemlich vollkommen erreichen, wenn man stets denselben Platindraht benutzt und diesen jedesmal bis zu der gleichen Tiefe in die Cultur, von welcher abgeimpft werden soll, einsenkt, und wenn man ausserdem bei flüssigen Culturen noch darauf achtet, dass längs des Platindrahtes nicht etwa kleine Tröpfchen hängen bleiben. Wenigstens sahen wir bei Anwendung dieses Verfahrens in je zwei zusammengehörigen Gläschen kaum jemals störende Differenzen im Wachsthum auftreten.

Dass alle zu einem Versuch gehörigen Röhrchen stets unter genau denselben äusseren Bedingungen, Temperatur, Feuchtigkeit etc., gehalten wurden, bedarf kaum der besonderen Erwähnung.

B. Versuchsergebnisse.

Ich lasse nunmehr die Resultate der einzelnen Experimente folgen und zwar zunächst die Ergebnisse der mit Reinculturen verschiedener Bacterien ohne Berücksichtigung der gasigen Stoffwechselproducte (insbesondere der CO₂) angestellten Versuche. Sodann lasse ich einige Beobachtungen über das Verhalten von Gemengen von Fäulnisbacterien folgen; und füge schliesslich einige Versuche über den wachsthumhemmenden Einfluss der CO₂ an.

1. Versuche mit Reinculturen (ohne Berücksichtigung der CO₂).

Der erste Versuch betraf die Feststellung des Einflusses der Stoffwechselproducte von *Proteus vulgaris* (Hauser).

Die Versuchsgelatine war zum Theil durch Vermischen gleicher Volumina völlig ausgewachsener sterilisirter Proteuscultur und 1 procentiger Nährgelatine, zum Theil aber auch nur durch Zufügen fester Nährsubstanz, unter Erhaltung der vollen Concentration der Stoffwechselproducte, hergestellt.

Die „Proteusgelatine“ reagirte ziemlich stark alkalisch, während dieses bei der Controlgelatine in geringerem Maasse der Fall war.

Tabelle I.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Proteus vulgaris* (Hauser); Sterilisation der alten Cultur durch Erhitzen.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Proteusgelatine und Controlgelatine
Spir. Chol. asiat.	Wächst schneller und üppiger in „Proteusgelatine“ desgl.
Spir. Finkler u. Prior.	
B. anthracis	desgl.
B. typh. abd.	Etwas besser in „Proteusgelatine“
B. pneumoniae	Kein Unterschied
B. sputig. crass. (Kreibohm)	desgl.
Micrococcus tetragenus	Besseres Wachsthum in „Proteusgelatine“
Proteus vulgaris (Hauser)	desgl.
Bacillus fuscus	desgl.

Tabelle II.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Proteus vulgaris*; Sterilisation der alten Cultur durch Filtration.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Art des Wachstums verglichen mit Controlplatten
Bac. anthracis	Wachsthum auf Proteusagar etwas besser als auf Controlagar
Bac. typhi abdomin.	Die oberflächlichen Colonieen zeigen auf Proteusagar eine etwas stärkere Ausbreitung
Proteus vulgaris	Kein Unterschied gegenüber den Controlplatten

Aus Tabelle I ist ersichtlich, dass alle geprüften Mikroorganismen, *Proteus* selbst nicht ausgenommen, in der „Proteusgelatine“ nicht nur

nicht schlechter, sondern meist sogar schneller und üppiger wachsen, als in der Controlgelatine, vermuthlich in Folge der stärker alkalischen Reaction. Ein schädlicher Einfluss der Stoffwechselproducte lässt sich also in keiner Weise constatiren. Tabelle II lässt sodann erkennen, dass auch die mittelst Filtration sterilisirten Proteusculturen keinen schädigenden, sondern eher einen begünstigenden Einfluss auf das Bacterienwachsthum äussern.

Ferner habe ich, da vielfach den Stoffwechselproducten der Bacterien auch abschwächende Eigenschaften zugeschrieben werden, meine Aufmerksamkeit auch noch darauf gerichtet, ob vielleicht eine Abnahme der Virulenz bei den auf der stoffwechselproducthaltigen Gelatine gewachsenen pathogenen Mikroorganismen stattfindet. Es ist dies allerdings, da das gute Wachsthum der Bacterien ein Vorhandensein schädigender Momente fast mit Sicherheit ausschliesst, von vornherein wenig wahrscheinlich; während es sehr wohl denkbar ist, dass dann, wenn deutlich wachsthumhemmende Einflüsse, z. B. saure oder zu intensiv alkalische Reaction durch die alten Culturen in das Nährsubstrat eingeführt werden, gelegentlich auch eine Virulenzabnahme zum Vorschein kommen kann. Bezüglich der Proteusgelatine ergaben denn auch die Versuche das erwartete Resultat, dass selbst nach mehreren Uebertragungen die Virulenz der eingepfunden Bacterien (*Bac. anthracis*, *Bac. sputigenus*, *Micrococcus tetragenus*) nicht gelitten hatte.

Den zweiten Versuch stellte ich mit dem *Bac. fluorescens liquefaciens* an, einem ebenfalls bei der Fäulniss eiweisshaltiger Flüssigkeiten oft vorkommenden Spaltpilz. Das Resultat entsprach durchaus dem bei *Proteus* erhaltenen. In der Versuchsreihe, in welcher ich die alten Culturen durch Erhitzen sterilisirte, trat eher ein besseres Wachsthum der eingepfunden Bacterien in derjenigen Gelatine hervor, welche mit der halben (Tabelle III) oder mit der vollen Menge (Tabelle IV) der Stoffwechselproducte des *Bac. fluor.* versetzt war. Nur dieser selbst wuchs etwas schlechter als in der Controlgelatine.

Auch die alten Culturen des *Bac. fluor.* reagirten stark alkalisch; und es erschien daher möglich, dass sowohl in dieser Versuchsreihe, wie auch in der vorigen mit *Proteus* angestellten, die stärkere Alkalescenz des Nährsubstrates die Ursache des besseren Wachsthums mancher Bacterien war.

Um dies näher festzustellen, habe ich einmal Controlgelatine zum Vergleich benutzt, welche auf die gleich starke alkalische Reaction gebracht war, wie die mit Fluorescencultur hergestellte. Wie aus Tabelle III hervorgeht, hörten damit in der That die Unterschiede zwischen beiden Nährböden auf.

Tabelle III.

Gelatine mit Stoffwechselproducten des *Bac. fluorescens liquefaciens*. Sterilisation durch Hitze. (Gleiche Theile Cultur und 10 procent. Fleisch-wasserpeptongelatine gemischt).

Eingeimpfte Mikroorganismen	Gelatine mit Stoffwechselproducten des <i>B. fluorescens liquefac.</i>	Stark alkalische Controlgelatine	Schwach alkalische Controlgelatine
Spirill. Chol. asiatic.	gutes und gleiches Wachstum	gutes u. gleiches Wachstum	schwächeres Wachstum
Spirill. Finkler u. Prior	desgl.	desgl.	desgl.
B. anthracis	desgl.	desgl.	desgl.
B. typh. abdom.	desgl.	desgl.	desgl.
M. tetragenus	gutes Wachstum	—	schwächeres Wachstum
B. pneumoniae (Friedländer)	desgl.	—	Ebenso gutes Wachstum wie in Gelatine mit Stoffwechselproduction
B. murisepticus	desgl.	—	desgl.
B. fluorescens liquefaciens	Wachstum langsamer und weniger kräftig wie in Controlgelatine	gutes Wachsth.	gutes Wachstum

Tabelle IV.

Gelatine mit Stoffwechselproducten des *Bac. fluorescens liquefaciens*. Sterilisation durch Hitze. (Die alte Cultur mit 1 Proc. Pepton, 0.5 Proc. NaCl und 7 Proc. Gelatine versetzt. Controlgelatine schwach alkalisch).

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Gelatine mit Stoffwechselproducten und Controlgelatine
Spirill. Chol. asiatic.	Gleich gutes Wachstum in Controlgelatine und in stoffwechselproductehaltiger Gelatine
Spir. Finkler u. Prior	desgl.
B. anthracis	desgl.
B. murisepticus	Wächst etwas weniger üppig in Controlgelatine
B. fluorescens liquefac.	Wächst besser in Controlgelatine

Zweitens versuchte ich in der Versuchsreihe, bei welcher zum Sterilisiren der alten Culturen die Filtrationsmethode benutzt wurde, die stark alkalische Reaction der mit dem Filtrat gemischten Gelatine durch Zusatz von Salzsäure bis zu dem üblichen Grade von Alkalescenzenz abzustumpfen. Auch dann hörte fast jede Differenz in der Wachstumsenergie

auf (Tabelle V). Nur die Culturen der Typhusbacillen gedeihen nicht ganz so gut auf Fluorescens-Agar; wobei möglicherweise der bei der Neutralisation hergestellte höhere Chloridgehalt des Substrats von Einfluss ist.

Tabelle V.

Versuche mit Stoffwechselproducten des *Bac. fluorescens liquefaciens*; Sterilisation der alten Cultur durch Filtration; die starke alkalische Reaction durch HCl-Zusatz abgestumpft.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Art des Wachstums verglichen mit Controlplatten (Agar)
<i>Bac. anthracis</i>	Kein Unterschied
<i>Bac. typhi abdom.</i>	Etwas besseres Wachsthum auf den Controlplatten
<i>Bac. fluoresc. liquef.</i>	Kein Unterschied

Eine geringe Verzögerung des Wachstums machte sich in den Versuchen der Tabellen III und IV mit Einimpfung des *Bac. fluorescens* selbst geltend. Dass dieselbe wesentlich durch die stark alkalische Reaction veranlasst war, geht aus dem Erfolg der Neutralisation in Tabelle V hervor. In geringem Grade mögen aber auch noch andere Gründe mitwirken, da die gleich stark alkalische, aber von Stoffwechselproducten freie Controlgelatine nicht ganz dieselbe Wachstumsverzögerung bewirkte. Wie wir aus den weiter unten folgenden Versuchen entnehmen dürfen, ist am wahrscheinlichsten eine gewisse Erschöpfung an Nährstoffen, vielleicht aber auch eine geringfügige schädigende Wirkung durch noch unbekannte Stoffwechselproducte als Ursache dieser ungünstigeren Beschaffenheit der *Fluorescens*-Gelatine anzusehen.

Versuche mit Culturen des *Bacillus Indicus ruber* bestätigten im Ganzen die bisher gewonnenen Resultate.

Da die Reaction der *Indicusgelatine* ziemlich stark alkalisch war, so wurde ein Theil derselben bis zur schwach alkalischen Reaction, etwa derselben, wie die Controlgelatine sie zeigte, mit verdünnter Salzsäure versetzt.

Aus Tabelle VI ist ersichtlich, dass alle untersuchten Microorganismen auf der alkalischen *Indicusgelatine* besser wuchsen, als in Controlgelatine resp. in neutralisirter *Indicusgelatine*.

Nur für den *Bacillus Indicus ruber* selbst schien die stark alkalische Reaction nicht günstig zu sein; nach Beseitigung der übermässigen Alkaliscenz wuchs er aber auf der *Indicusgelatine* so gut wie auf der Controlgelatine.

Tabelle VI.

Versuche mit Stoffwechselproducten des *B. Indicus ruber*. Sterilisation durch Erhitzen.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschied gegenüber Controlgelatine und neutralisirter Indicusgelatine
Spir. Chol. asiatic.	Wächst am besten in alkalischer Indicusgelatine
Spir. Finkler u. Prior	desgl.
B. anthracis	desgl.
M. tetragenus	desgl.
B. murisepticus	desgl.
B. Indicus ruber.	Wächst etwas besser in neutralisirter Indicusgelatine als in alkalischer

Einen weiteren Versuch stellte ich mit dem *Bac. acidi lactici* an. Von diesem ist zwar bekannt, dass er ein Stoffwechselproduct von energisch wachstumshemmender Wirkung liefert, nämlich die Milchsäure.

Es schien mir indessen wünschenswerth, zu erfahren, ob nicht ausser der Säure noch andere das Bacterienwachsthum hemmende Nebenproducte gebildet werden, und ob auch bei Neutralisation der freien Säure mit Sodalösung eine solche Wirkung zu Tage tritt.

Die Milchsäurebakterien wurden in einer 3 procentigen Traubenzuckerlösung mit Zusatz von 1 Procent Pepton und 0.1 Procent Fleischextract cultivirt. Nach achttägigem Aufenthalt der Cultur im Brütöfen bei 35° C. war die über einem nicht sehr bedeutenden Bodensatz stehende Flüssigkeit vollständig klar und von stark saurer Reaction. Wurde der Säuregrad auf Milchsäure bezogen, so betrug der Gehalt der Flüssigkeit an dieser 0.314 Procent. Diese saure Flüssigkeit versetzte ich mit 1 Procent Pepton, 0.5 Procent NaCl und 8 Procent Gelatine und filtrirte nach dem Kochen. Darauf wurde ein Theil der völlig klaren Gelatine mit Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaction neutralisirt. Zur Controle diente gewöhnliche 8 procentige Bouillongelatine von neutraler Reaction.

Von allen drei Sorten Gelatine wurden immer je zwei Gläschen mit demselben Mikroorganismus geimpft, und zwar diesmal absichtlich mit ziemlich grossen Mengen, um aus den Röhrchen, in welchen nichts gewachsen war, nach längerer Zeit Proben entnehmen zu können, an denen festgestellt werden konnte, ob etwa die Entwicklungsfähigkeit des eingebrachten Materials gelitten hatte.

Wie Tabelle VII zeigt, war auf der sauern Milchsäuregelatine keiner der eingeimpften Spaltpilze gewachsen. Dagegen waren auf neutralisirter Milchsäuregelatine und Controlgelatine bemerkenswerthe Unterschiede im Wachsthum nicht zu constatiren. Es war also die freie Säure die ein-

zige entwicklungshemmend wirkende Substanz unter den Stoffwechselproducten des Milchsäurebacillus.

Tabelle VII.

Versuche mit Stoffwechselproducten des Bacteriums der Milchsäuregährung. Sterilisation durch Erhitzen.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Saure Milchsäure-Gelatine	Wachstumsunterschied in neutralisirter Milchsäuregelatine und Controlgelatine
Spirill. Chol. asiatic.	kein Wachsth.	Gutes Wachsthum; kein Unterschied
Spir. Finkler u. Prior	„	desgl.
B. anthracis	„	Wachsthum in Milchsäuregelatine etwas kräftiger wie in Controlgelatine
M. tetragenus	„	desgl.
B. typhi abdom.	„	Wachsthum etwas besser in Controlgelatine
B. pneumon. (Friedländer)	„	Gutes Wachsthum; kein Unterschied
B. sputigenus crassus	„	desgl.
Staphylococcus pyogenes albus	„	Etwas besseres Wachsthum in Controlgelatine
B. murisepticus	„	desgl.
Bac. der Kaninchen-septicämie	„	Gutes Wachsthum; kein Unterschied

Um nun noch festzustellen, ob durch längeren Aufenthalt auf dem sauern Nährboden die eingeimpften Bacterien nur in ihrer Entwicklungsfähigkeit beeinträchtigt oder aber getödtet waren, wurden von den Gläsern, welche mit grösseren Mengen des Impfmateriels versehen waren, eventuell nach Verflüssigung und Mischung des Inhalts, je zwei Stieh- oder Platten-culturen mit normaler Fleischwasserpepton-gelatine angelegt. Es stellte sich hierbei heraus, dass sämmtliche Mikroorganismen mit Ausnahme der (sporenhaltigen) Milzbrandbacillen, todt waren.

Unter den pathogenen Bacterien wählte ich als erstes Versuchsobject die Spirillen der Cholera asiatica. Eine 16 Tage alte, bei 35° C. gezüchtete, vollständig ausgewachsene Cultur von Spirillum Cholerae in 5procentiger Nährgelatine, wurde filtrirt, durch Hitze sterilisirt und dann mit der gleichen Menge 10procentiger Fleischwasserpepton-gelatine versetzt. Die Reaction dieses Gemisches war stark alkalisch; daher wurde ein Theil der Controlgelatine durch reichlichen Sodazusatz auf den gleichen starken Alkalescentzgrad gebracht.

Die Choleraspirillen selbst, Spir. Finkler, Milzbrand-, Typhus- und Pneumoniebacillen zeigten in Choleragelatine und alkalischer Controlgelatine ein gleich üppiges und schnelles Wachsthum (Tabelle VIII); einige

andere Bacterien, wie *Micrococcus tetragenus*, *Staphylococcus pyogenes* u. s. w., bei welchen schwächer alkalische Gelatine zur Controle diente, wuchsen in dieser sämtlich schlechter als in Choleragelatine (Tabelle IX).

Tabelle VIII.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Spirillum Cholerae asiaticae*.
Sterilisation durch Erhitzen.

A. Controlgelatine ebenso stark alkalisch wie Choleragelatine.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Controlgelatine und Choleragelatine
<i>Spir. Cholerae asiaticae</i>	Gleich kräftiges und rasches Wachstum in Cholera- und Controlgelatine
<i>Spir. Finkler</i> u. <i>Prior</i>	desgl.
<i>B. anthracis</i>	desgl.
<i>B. typhi abdom.</i>	desgl.
<i>B. pneumon.</i> (Friedländer)	desgl.

Tabelle IX.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Spirillum Cholerae asiaticae*.
Sterilisation durch Erhitzen.

B. Controlgelatine schwächer alkalisch als Choleragelatine.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Controlgelatine und Choleragelatine
<i>M. tetragenus</i>	Wächst in Choleragelatine rascher und kräftiger als in Controlgelatine
<i>Staphylococcus pyogenes albus</i>	Wächst in Choleragelatine etwas rascher als in Controlgelatine
<i>B. murisepticus</i>	Wächst in Choleragelatine bedeutend besser als in Controlgelatine
<i>Bac. der Kaninchen-septicämie.</i>	Wächst besser in Choleragelatine
<i>B. sputigenus crassus</i> (Kreibohm)	Wächst viel besser in Choleragelatine

Etwas andere Resultate ergab ein Versuch mit Milzbrandbacillen-cultur. Die stoffwechselproducthaltige alte Cultur, welche sauer reagirte, wurde theils durch Erhitzen sterilisirt und mit 1 Proc. Pepton, 0.5 Proc. Kochsalz und 8 Proc. Gelatine versetzt; theils durch Chamberlandfilter gepresst, und dann in der oben beschriebenen Weise in neues Cultursubstrat umgewandelt. Auf Grund der bei den Milchsäurebacterien gemachten Erfahrungen wurde ausserdem eine Portion der so erhaltenen saueren Gelatine mit 10 procentiger Sodalösung bis zur schwach alkalischen Reaction versetzt.

Tabelle X.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Bacillus anthracis*.
Sterilisation durch Erhitzen.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Saure Milzbrandgelatine	Wachstumsunterschied in neutralisirter Milzbrandgelatine und schwach alkalischer Controlgelatine
Spir. Chol. asiat.	kein Wachsth.	Wächst etwas rascher in Milzbrandgelat.
Spir. Finkler u. Prior	„	desgl.
B. anthracis	„	Gleich gutes Wachsthum in beiden Gelatinen
B. typhi abdominalis	„	Wächst etwas besser in Controlgelatine
B. pneumoniae (Friedländer)	„	Gleich gutes Wachsthum in beiden Gelatinen
M. tetragenus	„	Wächst etwas besser in Milzbrandgelat.
B. sputigenus crassus	„	Gleich gutes Wachsthum in beiden Gelatinen
B. murisepticus	„	Gleich gutes Wachsthum
Bac. der Kaninchen-septicämie	„	desgl.

Tabelle XI.

Versuche mit Stoffwechselproducten von *Bac. anthracis*. Sterilisation der alten Cultur durch Filtration. Die filtrirte Cultur ist durch Soda-zusatz schwach alkalisch gemacht.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Unterschiede gegenüber Control-Agarplatten
Bac. anthracis	Kein Unterschied
Bac. typhi abdom.	Etwas besseres Wachsthum auf Milzbrandplatten
Bac. pneumoniae (Friedländer)	Kein Unterschied.

Bei der Impfung einiger Gläser wurde wie bei der Milchsäuregelatine eine grössere Menge des Impfmateri als eingebracht, da ich eventuell feststellen wollte, ob durch mehrwöchentlichen Aufenthalt der Bacterien in der saueren Milzbrandgelatine nicht nur eine Entwicklungshemmung, sondern auch eine Tödtung derselben erfolgt.

Auf der nicht neutralisirten Milzbrandgelatine zeigte nun keiner der Spaltpilze auch nur das geringste Wachsthum; dagegen beweist die Uebersicht auf Tabelle X, dass in der neutralisirten Milzbrandgelatine die Entwicklung keinesfalls schlechter, hier und da sogar besser vor sich ging, als in der Controlgelatine. — Das gleiche Resultat ergaben die durch Filtration sterilisirten Proben, wie Tabelle XI ausweist.

Nach 22 Tagen wurden die in die saure Milzbrandgelatine gebrachten, aber nicht gewachsenen Bacterien auf ihre Entwicklungsfähigkeit dadurch geprüft, dass von dem Inhalt des Gläschens Stich- bez. Plattenculturen angelegt wurden. Es ergab sich, dass nur *Spir. Cholerae* und Finkler und die Bacillen der Mäuse- und Kaninchensepticämie zu Grunde gegangen waren. Alle anderen Culturen entwickelten sich normal. Es waren also auf der sauren Milzbrandgelatine entsprechend ihrem erheblich geringeren Säuregehalt viel weniger Bacterien abgestorben, als auf der Milchsäuregelatine.

Bezüglich des Verhaltens alter Typhusculturen hatte ich bereits bei früherer Gelegenheit¹ die Erfahrung gemacht, dass, wenn Typhusbacillen auf schräger Gelatine-Oberfläche gezüchtet sind und dann die Gelatine nach Entfernung dieses Belages sterilisirt und von Neuem mit Typhusbacillen besät wird, nur eine kümmerliche Entwicklung der Bacterien eintritt. Je dünner die Schicht Gelatine, auf welcher die erste Züchtung erfolgt, desto ausgesprochener ist die Erscheinung. Lässt man 25 bis 30^{cem} Gelatine in grossen Cylindern in schräger Fläche erstarren und verfährt dann, wie angegeben, so kann man nach der zweiten Impfung noch eine Ernte bekommen, die zwar bedeutend geringer ist, als die erste, aber immerhin noch ziemlich ansehnlich. Wird dagegen der Versuch mit einer gewöhnlichen schrägen Gelatineoberfläche im Reagensglas angestellt, so findet nach dem zweiten Besäen fast gar kein Wachstum statt. Hier lag von vornherein die Vermuthung nahe, dass das schlechte Wachstum bei der zweiten Cultur in der That durch die Anwesenheit schädigender Stoffe bedingt ist. Dennoch ergab die genauere Untersuchung ein etwas anderes Resultat, dass nämlich grösstentheils eine Erschöpfung des Nährbodens die Ursache der Wachstumsbehinderung war.

Die Versuchsanordnung, aus welcher dies hervorging, war folgende: Gelatine, die in Reagensgläsern in schräger Fläche erstarrt war, wurde mit Typhusbacillen geimpft. Nach Beendigung des Wachstums wurde der die Oberfläche bedeckende Belag möglichst sorgfältig entfernt, die Gelatine sterilisirt und wieder zum Erstarren gebracht. Es wurden dann Typhusbacillen und verschiedene andere pathogene Mikroorganismen auf ihre Wachstumsfähigkeit in dieser Typhusgelatine geprüft. Das Resultat war (siehe Tabelle XII), dass die Typhusbacillen bedeutend langsamer und kümmerlicher wuchsen als in Controlgelatine. Cholera und Mäusesepticämie wuchsen normal, die übrigen Bacterien zeigten ein etwas verzögertes Wachstum.

¹ *Diese Zeitschrift.* Bd. I. S. 478.

Tabelle XII.

Versuch mit Typhusgelatine. Sterilisation durch Erhitzen.

a) Ohne Zusatz von Nährstoffen.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Typhusgelatine und Controlgelatine
B. typhi abdom.	In Stiehculturen auf Typhusgelatine kein oberfl. Belag; in Stiehculturen ungemein dünn
Spir. Chol. asiatic.	Kein bemerkenswerther Unterschied
B. anthracis	Wächst etwas besser in Controlgelatine
B. murisepticus	Kein Unterschied
Bac. der Kaninchen-septicämie	Wächst ziemlich erheblich kräftiger in Controlgelatine
M. erysipelat.	(Striehcultur) Belag in Controlgelatine stärker; auch Wachstum dort etwas schneller.

Tabelle XIII.

Versuch mit Typhusgelatine. Sterilisation durch Erhitzen.

b) Nach Zusatz von 1 Procent Pepton und 0.1 Procent Fleischextract.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede in Typhusgelatine und Controlgelatine
B. typh. abdom.	(Stich- und Striehcultur). Wachstum in beiden gut und kräftig; etwas besser in Controlgelatine
M. erysipel.	(Striehcultur). Belag in Controlgelatine um ein geringes dicker
Bac. der Kaninchen-septicämie.	In beiden Gelatinen gutes kräftiges Wachstum
Spir. Chol. asiatic.	Kein Unterschied
Spir. Finkler u. Prior	desgl.
B. anthracis	desgl.
Staphylococcus albus	desgl.
B. murisepticus	Etwas üppigeres Wachstum in Typhusgelatine.

Da die Reaction der Typhusgelatine nicht verändert war, wich das erhaltene Resultat von den früheren Versuchen in sofern ab, als letztere bei normaler Reaction der aus alten Culturen hergestellten Gelatine niemals irgend erhebliche Wachstumsverzögerung hatten erkennen lassen.

Allerdings war auch die Versuchsanordnung bei dem Experiment mit Typhusbacillen in einem Punkte abweichend. In den früheren Versuchen wurde den alten Culturen stets neue Gelatine (oft auch Pepton u. s. w.) zugefügt, weil jene Culturen unter Verflüssigung der Gelatine gewachsen

oder von Anfang an in flüssigem Substrat angelegt waren, weil aber die Vortheile des festen Nährbodens erhalten bleiben sollten. Dadurch war stets neuer Nährstoff in die Culturen gebracht. Den Typhusculturen war dagegen nichts hinzugefügt; und somit war es, schon um völlige Vergleichbarkeit mit den früheren Versuchen herzustellen, geboten, in einer anderen Versuchsreihe auch die Typhusgelatine mit neuen Nährstoffen zu versehen.

Unter dem Einfluss eines solchen Zusatzes von 1 Procent Pepton und 0.1 Procent Fleischextract, gestalteten sich die Resultate ganz anders. Es trat dann (Tabelle XIII) bei allen Bacterien eine so wesentliche Besserung des Wachstums auf, und die Unterschiede zwischen Typhus- und Controlgelatine wurden, wo sie überhaupt noch vorhanden waren, so gering, dass zweifellos das schlechtere Wachstum in der ersten Versuchsreihe hauptsächlich durch eine theilweise Erschöpfung der Nährstoffe bedingt war. Die kleinen Differenzen zwischen Controlgelatine und Typhusgelatine zu Ungunsten der letzteren, beruhen vielleicht auf einer noch ungenügenden Deckung des Nährstoffdeficits, vielleicht auch auf der Wirkung noch unbekannter, aber keinesfalls intensiv schädigender Stoffwechselproducte.

Um den in diesem Versuch hervorgetretenen Einfluss der Nährstofferschöpfung noch genauer kennen zu lernen, stellte ich weiterhin einige Experimente mit solchen Bacterien an, welche die Gelatine fest lassen und deren alte Culturen daher auch ohne neuen Gelatinezusatz die Vortheile des starren Nährbodens gewähren.

Ich wählte hierzu den *Bac. murisepticus*, den *Bac. fluorescens putidus*, *Bac. pyrogenes foetidus* und *Bac. sputigenus crassus*. Von jedem wurden 4 bis 6 Culturen auf schräger Gelatinefläche angelegt, und zwar der Art, dass das Impfmateriel über die ganze Fläche verbreitet wurde. Der entstandene Belag wurde entweder entfernt, oder auch absichtlich unberührt gelassen; dann wurden die Röhren durch Erhitzen sterilisirt, eventuelle Säure oder übermässig alkalische Reaction wurde beseitigt, die Gelatine wieder in schräger Fläche zum Erstarren gebracht und auf's Neue theils mit denselben, theils mit anderen Bacterien besät. Eine zweite Hälfte der Röhren wurde dagegen vor dem Sterilisiren ausserdem mit einer Zugabe von 1 Procent Pepton und ca. 0.1 Procent Fleischextract versehen. Die Resultate ergeben sich aus nebenstehender Tabelle.

Uebersieht man die bisherigen Versuchsergebnisse, so zeigt sich deutlich, dass zwei von den Bacterien selbst ausgehende Einflüsse das Wachstum derselben zu beeinträchtigen vermögen. Einmal die Erschöpfung des Nährsubstrats an irgend einem wesentlichen Nähr-

Tabelle XIV.

Gelatine mit Stoffwechselproducten von	Eingeimpfte Mikroorganismen	Gelatine ohne Zusatz	Gelatine neutralisirt	Gelatine neutralisirt und mit Nährstoffzusatz
Bac. pyog. foet.	B. pyog. foet.	Wachsthum schwach	W. etwas besser	W. zieml. kräftig
Bac. fluoresc. putid.	B. fluor. put.	W. schwach	W. schwach	W. schwach
do.	B. typhi abd.	kein W.	W. sehr schwach	W. kräftig, nur verzögert
Bac. sputigen. crass.	B.-sputig. cr.	W. gut	—	—
do.	B. typh. abd.	W. schwach	W. zieml. gut	W. zieml. gut
Bac. murisepticus	B. murisept.	W. undeutlich; Gel. fast flüssig	W. sehr schwach	W. zieml. kräftig

stoff; zweitens einige von den Bakterien gebildete Stoffwechselproducte, jedoch zeigen sich in merklichem Grade und bei zahlreicheren Bakterienarten nur freie Säure bez. eine zu grosse Menge alkalisch reagirender Producte, vorzugsweise wohl repräsentirt durch Ammoniumcarbonat, wirksam.

Für andere Stoffwechselproducte ausser Säure- oder Alkaliüberschuss konnte eine hemmende Wirkung nur ausnahmsweise gefunden werden. Denn wenn jene durch Neutralisation unschädlich gemacht waren, und wenn ausserdem für ausreichenden Ersatz der verbrauchten Nährstoffe gesorgt war, zeigte sich gewöhnlich keinerlei Störung mehr in der Entwicklung neuer Culturen auf dem alten Substrat. Ein abweichendes Verhalten trat nur bei Bac. fluor. putidus und in geringem Grade vielleicht bei Bac. typhi abd. hervor.

Mit diesen Resultaten lassen sich auch viele der früheren positiven Angaben über Wachsthumshemmung durch Stoffwechselproducte sehr wohl in Einklang bringen. So z. B. die Beobachtung von Babès, dass Cholera-colonien auf Platten in der Nähe von mit Saprophyten gezogenen Strichen eine kümmerliche Entwicklung zeigen. Auch hier ist möglicherweise Nährstofferschöpfung oder saure Reaction die Ursache der Hemmung gewesen. Uebrigens kann man unter Umständen das gerade entgegengesetzte Phänomen beobachten; wählt man Saprophyten, die etwas stärker alkalische Reaction des Nährsubstrats hervorrufen, so gedeihen viele pathogene Organismen sogar besser in der Nähe der Saprophytencolonien.

Auch der Ablauf der natürlichen Zersetzungs- und Fäulnisvorgänge wird leichter verständlich, wenn man nicht etwa eine Hemmung vorzugsweise durch aromatische, vermuthlich auf alle Mikroorganismen an-

nähernd gleich schädlich wirkende Producte annimmt, sondern wenn man die Regulirung des Bacterienlebens in faulenden Substraten durch die Nährstoffconcentration und die Reaction des Gemisches erfolgen lässt. Offenbar ist die Empfindlichkeit der einzelnen Bacterienarten gegen beide Momente eine sehr verschiedene, und so kann es zu einer Ablösung vieler Saprophyten und Schimmelpilze kommen, bis schliesslich eine sehr weitgehende Zerlegung des Nährmaterials erfolgt ist. Die „spontane“ Gährung der Milch und des Harns liefern typische Beispiele für diesen Wechsel der biologischen Bedingungen und den gleichzeitigen Wechsel der vorherrschenden Bacterienarten.

Um jedoch zu sehen, ob auch in stark gefaulten Substraten wirklich keine anderen wachstumshemmenden Momente in Betracht kommen, als in den bisher von mir untersuchten Reinculturen, habe ich noch einige weitere Experimente angestellt mit Flüssigkeiten, in welchen durch Bacteriengemenge aller Art tiefe Zerstörung bewirkt war.

2. Versuche mit Bacteriengemengen.

Als Versuchsflüssigkeiten dienten mir stark gefaultes Fleischinfus und Abortsjäuchen.

Die Herstellung des faulen Fleischwassers geschah in folgender Weise: 250^{gram} gehacktes Rindfleisch wurden in 200^{ccm} Wasser vertheilt und das Gemisch in einem hohen Standcylinder 8 Tage lang bei 35° C. der Fäulniss überlassen. Die hohe Flüssigkeitsschicht wurde deshalb gewählt, um auch die besonders tiefgreifende Zersetzungen verursachenden anaëroben Bacterien an dem Processe theilnehmen zu lassen.

Nach 8 Tagen wurde die mässig alkalische Flüssigkeit durch Leinwand filtrirt und im Dampföfen sterilisirt. Die nach Zusatz von 1 Procent Pepton, 0.5 Procent Kochsalz und 8 Procent Gelatine erhaltene Gelatine war in flüssigem Zustande von stark fauligem Geruch. Eine ungünstige Beeinflussung des Wachstums verschiedener pathogener Bacterien war auf dieser Gelatine entweder gar nicht oder nur in sehr geringem Maasse zu constatiren (siehe Tabelle XV). Das Wachstum des *B. murisepticus* war auf dieser Gelatine ein so auffallend üppiges und schnelles, wie ich es bis dahin auf Nährgelatine niemals beobachtet hatte.

Die Versuche mit Jauche wurden in ganz ähnlicher Weise angestellt. 200^{ccm} stark stinkende Jauche wurden filtrirt, sterilisirt und mit Nährstoffen und Gelatine versetzt. Das so erhaltene Nährsubstrat reagirte ausserordentlich stark alkalisch. Wie aus Tabelle XVI hervorgeht, wuchsen in dieser Gelatine die meisten Bacterien gar nicht, einzelne dagegen ziemlich gut, der *Bac. murisepticus* sehr üppig. Es war von

Tabelle XV.

Versuche mit Nährgelatine aus faulem Fleischwasser. Pepton und Nährsalze zugefügt.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede zwischen Controlgelatine und Gelatine mit faulem Fleischwasser
Spir. Chol. asiat.	Kein Unterschied
Spir. Finkler u. Prior	desgl.
B. anthracis	desgl.
Typhus abdom.	Etwas besser in Controlgelatine
B. pneumoniae (Friedländer)	desgl.
M. tetragenus	Kein Unterschied
B. sputig. crassus	desgl.
Staphylococcus pyog. albus	desgl.
B. murisepticus.	Bedeutend schneller und üppiger in Fleischwassergelat.

Tabelle XVI.

Versuche mit Jauchegelatine. Stark alkalische Reaction, kein HCl-Zusatz.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede zwischen Controlgelatine und Jauchegelatine
Spir. Chol. asiat.	Wächst nicht in Jauchegelatine
Spir. Finkler u. Prior	Wächst, aber etwas langsamer wie in Controlgelatine
B. anthracis	Ziemlich gleich gut in beiden Gelatinen
B. typhi abdom.	Wächst nicht in Jauchegelatine
B. pneumoniae	desgl.
M. tetragenus	desgl.
B. sputig. crassus	desgl.
B. murisepticus	Wächst in Jauchegelatine bedeutend schneller und üppiger wie in Controlgelatine.

vornherein nicht unwahrscheinlich, dass die starke Alkalescentz die Ursache der theilweisen Wachsthumshemmung war; und daher stellte ich eine zweite Versuchsreihe mit einer ebenso bereiteten Gelatine an, welche aber durch HCl-Zusatz theilweise neutralisirt war. Selbst nach Zufügung ziemlich bedeutender, mittelst Bürette abgemessener Quantitäten von Salzsäure blieb die Reaction immer noch stark alkalisch. Nachdem indessen der Gehalt der Flüssigkeit an Chlorammonium durch den Zusatz der Salzsäure bis auf 2.1 Procent gestiegen war, wurde auf weiteres und vollständiges Neutralisiren verzichtet und der Flüssigkeit nur noch 1 Procent Pepton und 8 Procent Gelatine zugesetzt.

Tabelle XVII.

Versuche mit Jauche. (Die ursprünglich stark alkalische Reaction durch HCl-Zusatz etwas gemindert).

Eingeimpfte Mikroorganismen	Wachstumsunterschiede zwischen Controlgelatine und Jauchegelatine
Spir. Chol. asiat.	Wachsthum etwas langsamer wie in Controlgelatine
Spir. Finkler u. Prior	Wachsthum etwas rascher in Controlgelatine; aber auch in Jauchegelatine recht kräftig
B. anthracis	Etwas besseres Wachsthum in Controlgelatine
Typhus abdom.	Die Ausbreitung des oberflächlichen Belages geht in Jauchegelatine etwas langsamer
B. pneumoniae	Wachsthum in Controlgelatine etwas massiger
M. tetragenus	Oberfl. Wachsthum in Controlgelatine um ein geringes besser
Staph. pyogenes albus	Wachsthum schneller in Controlgelatine
B. sputigenus crassus	Oberfl. Belag etwas dicker in Controlgelatine
Bac. der Kaninchen-septicämie	Wachsthum etwas besser in Controlgelatine
B. murisepticus	Wachsthum bedeutend besser und üppiger in Jauchegelatine.

Tabelle XVII zeigt nun, dass die meisten Mikroorganismen auf dieser Gelatine zwar nicht ganz so gut fort kamen, wie auf der Controlgelatine, doch war von einer auffallenden Behinderung oder gar Hemmung des Wachstums nichts mehr zu bemerken. Der Bac. murisepticus gedieh auch in dieser Gelatine bedeutend besser als in den Controlröhrchen.

Die auch nach der theilweisen Neutralisation noch bestehenden geringen Wachstumsunterschiede haben gewiss nichts Auffälliges, wenn man erwägt, dass die Jauchegelatine 2.1 Procent Chlorammonium enthielt, dass sie noch immer abnorm stark alkalisch war und dass sie gewiss manche der in der Fleischwasserpeptongelatine enthaltenen Nährstoffe in ungenügender Menge enthielt.

Als wesentlich schädigendes Stoffwechselproduct, welches thatsächlich in solcher Menge in faulenden Flüssigkeiten entsteht, dass es auf Bacterien eine ungünstige Wirkung zu entfalten vermag, konnte ich somit das kohlen saure Ammoniak nachweisen. Nach den letzthin veröffentlichten Untersuchungen von Kitasato¹ ist es auch gar nicht unwahrscheinlich, dass sowohl die kleinen Mengen freier Säure, wie auch die bedeutenderen Quantitäten von Ammoniumcarbonat, welche von Saprophyten in Faulflüssigkeiten producirt werden, auf hineingelangende empfindliche pathogene Mikroorganismen z. B. Choleraspirillen sogar direct tödtend

¹ Diese Zeitschrift. Bd. III. S. 404.

wirken können. Kitasato fand, dass z. B. 0.4 Procent Milchsäure Typhusbacillen tödtet, 0.25 Procent Choleraspirillen; während Ammoniumcarbonat in einer Concentration von 0.9 Procent Typhusbacillen, bei 1.2 Procent Choleraspirillen vernichtet. Unzweifelhaft werden diese Grenzwerte in Fäulnisgemengen sehr häufig erreicht bez. — wie in den hier benutzten Jauchen, wo der Gehalt an Ammoniumcarbonat mehr als 2.5 Procent betrug — weit überschritten.

Jedoch werden bei dem Zugrundegehen pathogener Bacterien in Fäulnisgemischen auch noch andere Momente, wie z. B. die durch die Saprophyten bewirkte energische Nährstoffentziehung, der Sauerstoffmangel, die CO_2 -Anhäufung, mitwirken; während bis jetzt keine Anhaltspunkte dafür haben, dass noch anderen unbekannten Stoffwechselproducten, oder den etwa vorhandenen Spuren von aromatischen Verbindungen eine so bedeutende Rolle zukommt, wie man dies früher anzunehmen geneigt war.

3. Einige Versuche über die Einwirkung der Kohlensäure auf das Wachstum von Bacterien.

Um über die wachstumshemmende Eigenschaft der CO_2 , auf welche bereits von Liborius¹ aufmerksam gemacht wurde, Genaueres zu erfahren, stellte ich noch einige Experimente mit den vorstehend benutzten Bacterien-Reinculturen an. Die Versuchsanordnung war folgende:

Durchleitungsröhrchen für Cultur von Anaëroben, wie sie Liborius verwendete, wurden mit Nährgelatine beschickt, die Gelatine sterilisirt und mit einer geringen Menge Bacterien infectirt. Dann wurde in der von Liborius beschriebenen Weise CO_2 während 20 Minuten durch die flüssige Gelatine geleitet und das Röhrchen noch während des Durchtretens des CO_2 -Stromes zugeschmolzen. In der wiedererstarrten, bei 22° C. gehaltenen Gelatine wurde dann das Wachstum der Colonieen beobachtet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle XVIII zusammengestellt.

Um ausserdem noch festzustellen, ob in den Gelatineröhrchen, welche kein Wachstum erkennen liessen, nur Entwicklungshemmung oder Tödtung der eingepfropften Bacterien stattgefunden hatte, wurden die Röhrchen mit Einsaat von *B. fluorescens*, *B. anthracis*, *B. cuniculicida* und *B. murisepticus* nach 14 tägigem Aufenthalt im Brütöfen auf 35° erwärmt, um die Gelatine zu verflüssigen; dann wurde unter allen Cautelen Luft, welche durch sterilisirte Watte filtrirt war, hindurchgeleitet; und die wieder zugeschmolzenen Röhrchen abermals in den Brütöfen gebracht. — Nach zwei Tagen hatten sich in allen Gläsern kräftige Colonieen der eingesäten Bacterien entwickelt.

¹ Diese Zeitschrift. Bd. I, Heft I.

Tabelle XVIII.

Culturversuche in zugeschmolzenen Röhren nach Durchleitung von CO₂.
Normale Gelatine.

Eingeimpfte Mikroorganismen	Art des Wachstums verglichen mit Culturen bei Luftzutritt
Bac. typhi abdom.	Langsameres und weniger starkes Wachstum in den CO ₂ -Röhren
Spir. Chol. asiat.	desgl.
Spir. Finkler	desgl.
Staphylococcus albus	desgl.
Bac. fluor. liquef.	In den CO ₂ -Röhren wenige ausserordentlich kleine, kaum sichtbare Colonien
Bac. anthracis	In den CO ₂ -Röhren kein Wachstum
Bac. cuniculicida	desgl.
Bac. murisepticus	desgl.

Somit lag nur eine Wachstumshemmung vor. Dass bei dieser aber in der That auch ein positiv schädigender Einfluss der CO₂ und nicht etwa allein der Sauerstoffmangel in Frage kommt, das geht aus den citirten Versuchen von Liborius hervor, in welchen die Wachstumshemmung, welche bei verschiedenen Bakterien durch Entfernung der Luft mittelst eines indifferenten Gases erzielt wurde, entschieden schwächer ausfiel, als in den mit CO₂ angestellten Experimenten.

Energisch schädigend wirkt somit die CO₂ auf die hier untersuchten Bakterien freilich nicht; und namentlich ist sie in ihrer Wirkung dem Ueberschuss an fixer Säure bez. an Alkali nicht entfernt vergleichbar. Dennoch wird unter natürlichen Verhältnissen ein Einfluss dieses allgemeinsten Stoffwechselproductes der Bakterien manchmal mit zur Geltung kommen; namentlich in höheren Flüssigkeitsschichten, in grösseren Haufen faulender Substrate, sowie in tieferen Bodenschichten.

Ueerblicken wir die gesammten Resultate der hier mitgetheilten Experimente und wenden wir uns wieder zu dem Ausgangspunkt, zu der sogenannten Retentionshypothese, so zeigt sich, dass für eine Wachstumshemmung der Bakterien durch Stoffwechselproducte vorzugsweise freie Säure, Alkaliüberschuss und eventuell noch CO₂ in Betracht kommen.

Es ist nun aber völlig undenkbar, und mit den physiologischen Erfahrungen unvereinbar, dass diese selben Stoffe, nachdem sie etwa von den Vaccins in einer gewissen Menge gebildet sind, im lebenden Körper für längere Zeit zurückgehalten werden und dort in Bereitschaft bleiben,

um neu eindringende Bakterien an der Entwicklung zu hindern. Wir finden somit in dem Verhalten der Bakterien in den Culturen keinerlei Stütze für die Retentionshypothese; und man müsste, wollte man an derselben festhalten, schon die Annahme machen, dass die Bakterien im lebenden Organismus ganz andere Stoffwechselproducte bilden, als auf dem toten Nährsubstrat.

Dafür, dass auch unter solcher Annahme die Retentionshypothese auf kaum überwindliche Widersprüche stösst, sind in den folgenden Arbeiten Dr. Bitter's Beweise gegeben. Ich verzichte darauf dieselben hier näher zu erörtern, da es mir nur darauf ankam festzustellen, ob wirklich jene verbreitete Hypothese aus dem Verhalten der Bakterien ausserhalb des Körpers abgeleitet werden darf.

A n h a n g.

Notiz über die Wirkung Pasteur'scher Filter auf Alkaloidlösungen.

Die Autoren, welche sich bisher des Chamberlandfilters zur Trennung der Bakterien von ihren Stoffwechselproducten bedienten, haben, wie mir scheint, angenommen, dass beim Filtriren durch Thonzellen wirklich alle gelösten Stoffe in's Filtrat gelangen. Gelegentlich meiner Versuche über die Giftigkeit sterilisirter Typhusculturen fand ich indessen, dass beim Filtriren von Typhusaufschwemmungen durch Chamberland'sche Filter die ersten Portionen des Filtrates ganz ungiftig sind und dass erst bei länger dauerndem Filtriren die ablaufende klare Flüssigkeit giftige Eigenschaften zeigt.

Die folgenden Versuche lassen dieses Verhalten genauer erkennen:

I. Versuch.

Von 20 schrägen Gelatineoberflächen, welche mit 6 Tage alter Typhuscultur bedeckt waren, wurde mit im Ganzen 95^{cem} 0.7 procentiger Kochsalzlösung eine Aufschwemmung bereitet und dieselbe durch eine Pasteur'sche Thonzelle unter Anwendung der Druckpumpe filtrirt. In kurzer Zeit waren 20^{cem} ganz klarer Flüssigkeit durchgelaufen, welche, wie durch Plattencultur nachgewiesen wurde, bakterienfrei war. (Es mag hier bemerkt werden, dass ich bei allen folgenden Filtrationsversuchen niemals ein Durchgehen von Bakterien durch das Thonfilter beobachtet habe). Von diesem Filtrate wurden drei Kaninchen je 2, 3 und 5^{cem} in die Ohrvene injicirt. Keines der Thiere zeigte auch nur die geringsten Krankheitserscheinungen. Ein Kaninchen, welches 2^{cem} der unfiltrirten Aufschwemmung bekommen hatte, war am folgenden Tage sehr krank, war matt, frass nicht und hatte starken Durchfall, erholte sich jedoch wieder.

II. Versuch.

Eine Typhuscultur-Aufschwemmung von 25 schrägen Gelatineoberflächen in 100^{cem} physiologischer Kochsalzlösung wurde durch ein Thonfilter filtrirt.

Von den ersten 20^{cem} des Filtrates wurden 3 Kaninchen je 2, 3 und 6^{cem} in die Ohrvene injicirt. Die Thiere bleiben gesund. Nur eines, welches 6^{cem} bekommen hatte, schien etwas krank zu sein, doch war auch dieses bald wieder völlig normal.

Zwei Kaninchen, welchen 1 und 2^{cem} der unfiltrirten Aufschwemmung injicirt waren, starben im Laufe von 24 Stunden und zeigten bei der Section die gewöhnlichen Erscheinungen.

III. Versuch.

Eine Aufschwemmung von 45 schrägen Gelatineoberflächen in 160^{cem} physiologischer Kochsalzlösung wurde in ein Chamberland-Filter gebracht und unter Druck filtrirt. Die ersten 35^{cem} des Filtrates wurden nicht benutzt. Von den folgenden 15^{cem} wurden einem Kaninchen 5^{cem} in die Ohrvene injicirt. Am folgenden Tage ist das Thier sehr krank; es ist matt, frisst nicht, hat starken Durchfall und liegt ruhig auf der Seite. Die Körpertemperatur ist auf 37·6° gesunken. Jedoch erholte sich das Thier nach zwei Tagen wieder.

Von den folgenden 10^{cem} bekam ein Kaninchen 4^{cem}. Nach einigen Stunden schon zeigte dasselbe die gewöhnlichen Krankheitssymptome und als es nach ca. 18 Stunden gestorben war, fanden sich am Darm u. s. w. die nach Injection von Typhusculturen auftretenden charakteristischen Veränderungen.

5^{cem} des bei weiterer Fortsetzung der Filtration gewonnenen Filtrates hatten bei einem Kaninchen denselben Erfolg, nur waren die pathologisch-anatomischen Erscheinungen stärker ausgeprägt.

Zwei Mäuse, welche von dem letzten Filtrat 0·5 und 0·7^{cem} in die Bauchhöhle bekommen hatten, starben im Verlaufe von 12 bis 20 Stunden und boten bei der Section das früher beschriebene Bild dar.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, dass das Filtrat von Typhusculturen anfangs ungiftig ist, dass aber bei länger dauernder Filtration die letzten Portionen wieder annähernd die volle Giftigkeit der nicht filtrirten Culturen zeigen. Bei noch länger fortgesetzter Filtration würden voraussichtlich auch die letzten Unterschiede in der Giftigkeit der unfiltrirten Aufschwemmung und des Filtrates verschwinden.

Die Erscheinung, dass die giftigen Producte der Typhusbacillen anfangs im Filter zurückgehalten werden und erst später allmählich in immer grösserer Menge in das Filtrat übergehen, ist nicht ohne Analogie. Falk und später Soyka haben die Beobachtung gemacht, dass wenn man Lösungen von Alkaloiden (Chinin, Strychnin, Morphin) entsprechend langsam durch Erde filtrirt, die Alkaloide nicht in's Filtrat gehen, sondern in der filtrirenden Schicht zurückgehalten werden. Selbst wenn man unter stärkerem Druck filtrirt, so läuft anfangs immer eine viel weniger concentrirte Lösung der Alkaloide ab, als die ursprünglich auf die Erdschicht aufgegossene. Filtrirt man dagegen immer neue Mengen Lösung

durch dasselbe Erdfilter, so tritt auch bei Filtration unter gewöhnlichem Druck bald der Zeitpunkt ein, wo im Filtrat wieder geringe Mengen der Alkaloide nachzuweisen sind, bis schliesslich die oben aufgegossene Lösung unten fast unverändert abfließt. Es handelt sich hier offenbar um eine Flächenattraction. Die relativ grossen Moleküle der Alkaloide u. s. w. werden beim Passiren der enormen Oberfläche des Filters so lange von dieser zurückgehalten, bis gleichsam die ganze Fläche mit einer dünnsten Lage überzogen ist oder bis, wie man sich ausdrückt, das Filter mit der betreffenden Lösung gesättigt ist. Genau derselbe Fall, wie bei den Erdfiltern, scheint auch bei den porösen Thonzellenfiltern vorzuliegen, da ja hier ebenfalls die zu filtrierende Flüssigkeit eine sehr grosse Oberfläche passiren muss. — In der That verhalten sich Alkaloide und sonstige Körper mit grossem Molekül (wie Pepton, Pepsin) dem Thonfilter gegenüber geradeso, wie im Erdfilter. Die Resultate einiger in dieser Richtung von mir angestellter Versuche mögen dies erläutern:

Wurde eine 0.5 procentige Peptonlösung durch das Thonfilter filtrirt, so zeigte sich, dass die ersten 15 ^{ccm} des Filtrates gar kein Pepton enthielten; die zweiten 15 ^{ccm} zeigten Spuren; mit der dritten Portion erhielt man schon eine deutliche Reaction und in der vierten Portion von 15 ^{ccm} war kaum mehr ein Unterschied gegen die ursprüngliche Lösung zu constatiren. Der annähernd quantitative Nachweis des Peptons geschah auf vergleichend colorimetrischem Wege durch Zusatz stets gleicher Mengen von Kalilauge und Kupfersulfatlösung zu stets gleichen Flüssigkeitsproben.

Pepsinlösung, deren Concentration durch die Schnelligkeit der Lösung der gleichen Menge gekochten Hühnereiweisses in 0.2 Procent Salzsäurelösung einigermaßen abgeschätzt werden konnte, verhielt sich ähnlich wie Pepton.

Ebenso waren bei Filtration einer 0.065 procentigen Lösung von Strychninum nitricum die ersten 15 ^{ccm} für Frösche ganz ungiftig. (0.1 ^{ccm} der ursprünglichen Lösung rief bei Fröschen das typische Bild der Strychninvergiftung hervor.)

Von den zweiten 10 ^{ccm} des Filtrates bewirkten 0.5 ^{ccm} eine ganz geringe, schnell vorübergehende Erhöhung der Reflexerregbarkeit.

In den folgenden 20 ^{ccm} des Filtrates liess sich das Vorhandensein von Strychnin auch durch die chemische Reaction (doppelt-chromsaures Kali und Schwefelsäure) schon deutlich erkennen; 0.1 ^{ccm} erwies sich bei Fröschen schon ziemlich wirksam, wenn auch nicht in dem Maasse wie dieselbe Menge der unfiltrirten Lösung. Weiterhin gewonnene 10 ^{ccm} des Filtrates zeigten nur noch kaum merkliche Unterschiede gegenüber der unfiltrirten Lösung.

Diese Eigenschaft der Porcellanthonfilter, Körper von grossem Molekül bis zur Sättigung des Filters zurückzuhalten, muss bei Versuchen, mittelst Filtration die Bacterien von ihren Stoffwechselproducten zu trennen, wohl berücksichtigt werden, wenn man nicht zu unrichtigen Resultaten kommen will. Meines Wissens ist bis dahin dieser Eigenschaft der Chamberlandfilter noch von keiner Seite Erwähnung geschehen.