

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Leipzig
(Direktor: Geheimrat Kruse)
und aus dem Laboratorium für angewandte Chemie und Pharmazie der
Universität Leipzig
(Direktor: Geheimrat Paal.)]

Die Gramsche Bakterienfärbung, ihr Wesen und ihre Bedeutung.

Von

Privatdozent Dr. Ernst Deußen.

Inhaltsangabe.

Einleitung S. 235—238. — Versuchsanordnung S. 238—239. — Einfluß einer geänderten Alkoholbehandlung auf den Ausfall der Gramreaktion S. 240—241. — Ersatz der 1 prozent. Jodjodkaliumlösung bei der Gramfärbung durch andere Halogenlösungen S. 242—245. — Einführende Versuche mit Fettlösungsmitteln und Säuren S. 246—248. — Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Kleinwesen S. 248—261. Verhalten gramfreier Kleinwesen S. 262—263. — Einwirkung verschiedener Lösungsmittel S. 264—271. — Verdauungserscheinungen gramfester Kleinwesen S. 271—283. — Gramfärbung von Fetten, Eiweiß- und anderen Stoffen S. 283—292. — Gramfärbung von Spermien S. 292—295. — Biondifärbung der Spermien S. 295—296. — Zusammenstellung der Literatur über nukleinhaltige Substanzen 296—302. — Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse S. 302—306. — Färbung zerriebener Kleinwesen S. 306—311. — Zur Frage der Färbungstheorien S. 311—313. — Zusammenfassung S. 313—319. — Literaturübersicht 320—322.

Einleitung.

Von den Forschern, welche sich mit den Ursachen der Gramfestigkeit gewisser Mikroorganismen beschäftigt haben, sind vor allem Unna, A. Fischer, Grimme, Brudny und Eisenberg zu nennen. Unna nimmt an, daß bei den gramfesten Bakterien sich eine inniger an das Gewebe haftende chemische Verbindung von Gewebe mit Paranosanilinsalz und Jod bildet als bei den gramfreien. A. Fischer dagegen, welcher zeigen konnte, daß Albumose, durch Kaliumdichromat, Platin-

chlorid u. a. gefällt, um so gramfester wurde, je größer die Granula waren, schloß hieraus, daß die Gramfestigkeit bei den Bakterien auf einem größeren Substanzreichtum beruhen müsse, welcher eine größere Adsorptionskraft bedinge. Danach ist der Ausfall der Gramreaktion auf eine physikalische Beschaffenheit des Bakterienkörpers zurückzuführen. Zu dem gleichen Ergebnisse gelangte Nikitine. R. und W. Albert führen die Gramfärbbarkeit von Dauerhefe auf einen Gehalt an stark färbbaren Eiweißkörpern zurück. Nach Brudny sind die plasmolysierbaren Bakterien gramfrei, die schwach plasmolysierbaren gramfest. Eisenberg erklärt die Verschiedenheit des Ausfalles der Gramreaktion durch die größere oder geringere Durchlässigkeit des Ektoplasmas, welches er sich aus Membran und plasmatischer Rindenschicht zusammengesetzt denkt. Grimmer gelang es, beim *Bac. tumescens* zu zeigen, daß die Bakterienmembran, demnach ein Teil des Eisenbergschen Ektoplasmas, für die Gramfestigkeit nicht verantwortlich zu machen ist. Das Wesen der Gramfärbung wurde durch Untersuchungen von Kruse in ein neues Licht gerückt; er wies experimentell nach, daß die gramfesten Bakterien gegen 1prozentige Kalilauge und gegen die Trypsinverdauung im allgemeinen weit widerstandsfähiger sind als die gramfreien. „Das kann“ — so faßt Kruse in seiner „Mikrobiologie“ die bisherigen Ergebnisse zusammen — „natürlich nicht erklärt werden durch ihre (d. h. der Bakterien) zu große, sondern höchstens durch ihre zu geringe Durchlässigkeit, die man am einfachsten mit A. Fischer auf eine größere physikalische Dichtigkeit des Zellkörpers der gramfesten Bakterien zurückführen dürfte. Aber auch die Auffassung Unnas hätte hier vorläufig Gleichberechtigung in dem Sinne, daß die größere Widerstandsfähigkeit gegenüber der Grambehandlung sowie den Lösungsmitteln auf chemischem Wege beruhte.“ Fr. Reichert (1913) geht in seiner Inauguraldissertation näher auf die Untersuchungen derjenigen Forscher ein, welche Beiträge zur Gramfärbung geliefert haben, das für uns Wichtige möge kurz erwähnt werden.

Grimme macht eine besondere Substanz in den Bakterien als Trägerin der Gramfestigkeit verantwortlich; diese Substanz würde durch heiße Salzsäure, 1prozentige Kalilauge, 5prozentige Sodalösung, Pepsin oder Trypsin nicht verändert und wäre relativ schwer in Alkohol löslich. Aronson brachte bei Tuberkelbazillen durch Behandlung derselben mit Trichloräthylen die Gramfestigkeit zum Verschwinden; nach Aronson soll hierbei eine Fettsubstanz herausgelöst werden. Nach der Ansicht von Weiss besteht die Gramsubstanz aus Eiweiß und außerdem noch aus einer wichtigen, aber unbekannten Verbindung; genügendes Beweismaterial wird

von Weiß für diese Ansicht nicht beigebracht. Much und Deycke führen gleichfalls die Gramfestigkeit auf das Vorhandensein einer Eiweißverbindung zurück, nehmen aber an, daß nebenher noch Neutralfette eine große Rolle spielen. Nach Cederncreutz sind es Fett, Stärke, Hemizellulose und Eiweiß, welche den positiven Ausfall der Gramreaktion bedingen. Tamura schied aus Tuberkelbazillen einen höheren Alkohol $C_{24}H_{56}O$, Mykol genannt, ab, welcher sich gram- und säurefest verhielt; er ist der Ansicht, daß die Gramfestigkeit von *Bac. tuberc.* (Typ. hum.) und von *Mycobact. lacticola* purug. auf der Anwesenheit des Mykols oder eines Esters desselben im Bakterienkörper beruhe. Nikitine gibt an, daß Fettlösungsmittel die Gramfestigkeit nicht herabsetzen, dagegen Säuren, Alkalien und Ammoniak. Staphylokokken, in Wasser aufgeschwemmt, werden nach den Untersuchungen von Braem mit zunehmendem Alter gramfrei. Paltauf fand, daß gewisse gramfreie Spaltpilze durch Müllersche Flüssigkeit (eine Lösung von Osmiumsäure in Alkohol) gramfest werden. — Was die Reichertschen Untersuchungen selbst betrifft, so sei an dieser Stelle nur erwähnt, daß er Milzbrand- und Diphtheriebazillen bei 37° mit Fettlösungsmitteln behandelte, wobei er fand, daß die genannten Bazillen gramfrei wurden; er zog daraus den Schluß, daß der Verlust der Gramfestigkeit auf der Extraktion von Lipoiden beruhe.

Schließlich sind die Ausführungen Hottingers anzuführen, welcher das Wesen der Gramreaktion nach kolloid-chemischen Gesichtspunkten zu erklären versucht. Experimentelle Angaben fehlen, sie sollen einer späteren Veröffentlichung vorbehalten bleiben. Nach Hottinger sind die Nukleoproteide und die bei der Fixierung gebildeten Nukleine gramfest, hingegen beteiligt sich das Protoplasma nicht an der Gramfärbung. Jedoch der größere oder geringere Gehalt an Nukleoproteiden in den Bakterienleibern ist für die Gramfestigkeit nicht maßgebend, sondern in erster Linie die Größe oder Zahl der sich färbenden Mizellen, welche aus Nukleoproteiden bestehen sollen. Hottingers kolloid-chemische Gesichtspunkte sind in Kürze folgende: Die Gramfestigkeit wird von ihm auf den Dispersitätsgrad zurückgeführt und zwar auf die Verteilung der Nukleoproteide in der Zelle und der optischen Auflösbarkeit dieser gramfesten Teilchen; in den gramfreien Bakterien bildet das gefärbte Nukleoproteid ein Kolloid von so hoher Dispersität, daß die optische Auflösbarkeit der einzelnen Teilchen nicht mehr gelingt, während bei den gramfesten Keimen die gefärbten Nukleoproteidteilchen aus einem mehr oder minder groben Emulsoid besteht. Gramfeste Keime werden nach Hottingers Annahme gramfrei, wenn der Dispersitätsgrad erhöht wird.

Aus der Einleitung ersieht man zur Genüge, daß die Ansichten über das Wesen der Gramschen Bakterienfärbung wenig geklärt sind und sich häufig widersprechen. Eingehende Untersuchungen gibt es nur recht wenige, desto häufiger findet man gelegentliche, nicht gar sehr ausführliche Beobachtungen, welche zur Klärung der Gramreaktion wenig oder gar nichts beitragen. Um eine Klärung herbeizuführen, war es erforderlich, nicht nur die Ergebnisse früherer Forscher auf ihren wahren Wert hin zu prüfen, sondern auch selbst möglichst reichhaltiges Tatsachenmaterial zu sammeln. Unter diesem Gesichtspunkte wurde vorliegende Arbeit nach den notwendigen einführenden Vorprüfungen in Angriff genommen. — Zunächst möge das Wichtigste über die von mir benutzte Versuchsanordnung mitgeteilt werden.

Allgemeines zur Versuchsanordnung.

1. Zu den Versuchen wurde frisch übergeimpftes Bakterienmaterial von Schrägagarkulturen genommen, falls nichts anderes angegeben ist; Hefe gelangte in Form der käuflichen frischen Bäckereipreßhefe zur Anwendung.

2. Bei den ersten Versuchen im Laufe dieser Arbeit wurden die Keime ohne Vorbehandlung, nur durch vorsichtiges Abheben derselben vom Agar verwendet; im weiteren Verlaufe wurde das Material in den vielen Fällen einmal oder mehrere Male mit destilliertem Wasser zentrifugiert, und das vom anhaftenden Wasser möglichst befreite Zentrifugat zu den Bakterienaufschwemmungen benutzt.

3. Das so vorbereitete Bakterienmaterial wurde jedesmal auf sein Gramverhalten geprüft; nur normal gefärbte Proben wurden berücksichtigt.

4. Die Versuche wurden, falls es sich um Aufschwemmungen von Bakterienmaterial handelte, in gut gereinigten (Vorbehandlung mittels Chromsäure-Schwefelsäuregemisches), aber nicht sterilisierten Reagenzgläsern aus Jenenser Glas angesetzt, welche durch prall ansitzende Korkstopfen verschlossen wurden. Diejenigen Fälle, wo ein anderer Verschuß gewählt wurde, sind in der Arbeit besonders verzeichnet.

5. Auf die Reinigung der Deckgläser wurde große Sorgfalt angewendet; folgendes Verfahren wurde eingehalten und hat sich bei dem großen Verbrauche an Deckgläsern als praktisch erwiesen.

Die im Handel befindlichen Deckgläser wurden in heiße Chromschwefelsäure, die sich in einem weiten Reagenzglase befand, einzeln hineingegeben; nach Verlauf von ein oder mehreren Stunden wurde das erkaltete Säuregemisch abgossen, worauf die Deckgläser mehrmals mit Wasser und schließlich mit Alkohol kurz ausgekocht wurden. Der Alkohol wurde ersetzt durch eine Mischung von Alkohol und Äther, in welcher die Deckgläser fertig zum Gebrauch aufbewahrt wurden. Das Abwischen der so geimpften fettfreien Deckgläser geschah in der üblichen Weise mit Mullläppchen, welche des öfteren erneuert wurden. Ein Säubern der bei dieser Manipulation in Betracht kommenden Fingerspitzen mittels Toluols, Xylols oder Alkohols er-

scheint erforderlich zu sein, um Spuren fettartiger Substanz von den Deckgläsern fernzuhalten. Erfolgt übrigens die Behandlung der Deckgläser mit klarem Alkoholäther gründlich, so hat es sich als recht zweckmäßig und angenehm erwiesen, die so gereinigten Deckgläser einzeln in schräger Stellung einfach abtropfen und den Alkoholäther an der Luft verdunsten zu lassen; ein Abwischen mit Mull kann dann in den allermeisten Fällen unterbleiben, was zu einem sparsamen Verbräuche der Gläsern sehr beiträgt.

6. Die in Reagenzgläsern oder ähnlichen Gläsern angesetzten Bakterienaufschwemmungen wurden täglich kräftig umgeschüttelt, doch immer mit der Vorsicht, daß die Flüssigkeit nicht den Stopfen des Gefäßes benetzte; bei den Flußsäureaufschwemmungen in Platintiegeln war ein gelinderes Schütteln des Inhaltes geboten.

7. Die Probeentnahme bei den Aufschwemmungen in Reagenzgläsern wurde mit Ausnahme der HF-haltigen mittels einer Pipette vorgenommen; bei den Flußsäurepräparaten wurde die nötige Menge aus dem Platintiegel abgegossen, und der Rand derselben mit Fließpapier gesäubert.

8. Die bei den Versuchen angewandte Temperatur schwankte, mit Ausnahme der von 36° und anderen Fällen, innerhalb einiger Grade; im Verlaufe dieser Arbeit wurde bei den Bakterienaufschwemmungen in Reagenzgläsern der Unterschied auf etwa 2° eingeschränkt; jedoch immer waren die einzelnen Aufschwemmungen einer jeden Versuchsreihe den gleichen Temperaturschwankungen ausgesetzt, mithin die Versuche unter sich vergleichbar.

9. Die Gramfärbung wurde in der folgenden Weise ausgeführt. Die Karbolgentiana- und Jodjodkaliumlösung (Lugolsche Lösung) beließ man gewöhnlich je 1 Minute auf dem Präparate; nur die Behandlung mit Alkohol wurde öfters geändert, was jedesmal in den Tabellen vermerkt wurde. Mit verdünnter Fuchsinlösung wurde 5 bis 15 Sekunden nachgefärbt. Die angegebenen Zeiten wurden an Hand der Taschenuhr kontrolliert.

Wasserspülung fand nach dem Zusatze von Alkohol und von Fuchsin statt, zum Unterschiede von A. Fischer (S. 287), welcher nach jedesmaligem Hinzufügen der Gentiana- und Jodlösung Wasserspülung anwendete, ein Verfahren, welches die bakteriologische Technik als unzulässig ansieht.

Die Änderung in der Alkoholbehandlung ist in den Tabellen jedesmal vermerkt, folgende Abkürzungen wurden gebraucht:

1. Die übliche Färbungsvorschrift: Gentiana-, Jodjodkaliumlösung und Alkohol zur Differenzierung je 1 Minute = je 1 Minute ohne Tröpfeln;
2. die geänderte Färbungsmethode: Gentiana- und Jodjodkaliumlösung je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute 30 Tropfen (oder $\frac{1}{4}$ Minute 15 Tropfen) Alkohol auf das Deckglas tröpfeln = je 1 Minute, $\frac{1}{2}$ (bzw. $\frac{1}{4}$) Minute Alkohol tröpfeln.

Weitere Abkürzungen in den Tabellen dieser Arbeit sind hiernach ohne weiteres verständlich. Auf die Darstellung einer möglichst klaren Karbol-Gentianalösung wurde besonders Wert gelegt.

Änderungen im Gramschen Verfahren sind vielfach vorgeschlagen worden; so z. B. hat es sich bisweilen als zweckmäßig erwiesen, der

Behandlung mit Alkohol eine mit Salzsäure-Alkohol folgen zu lassen (Gram-Günther) oder nach Nicolle statt des Alkohols eine Mischung von Alkohol mit Azeton zu verwenden. Näher auf diese und andere Abänderungen im Gramschen Färbeverfahren einzugehen, würde zu weit führen. Da sich bald im Anfange meiner Untersuchungen und noch mehr im Verlaufe derselben die Gramsche Reaktion als ein ausgezeichnetes diagnostisches Mittel für gewisse chemische Vorgänge in der Zellsubstanz erwies, so benutzte ich ein Verfahren, welches mir gestattete, in schneller und bequemer Weise Änderungen in der Zusammensetzung der Zellsubstanz zu erkennen. Das folgende Kapitel soll über diesen Punkt Aufschluß geben.

Über den Einfluß einer geänderten Alkoholbehandlung (sog. Tröpfelmethode) auf den Ausfall der Gramreaktion.

Nach dem üblichen Differenzierungsverfahren mit Alkohol beläßt man denselben 0·1 bis 3 Minuten auf dem Untersuchungspräparate; bekannt ist ja, daß Alkohol, welcher hierbei die Reste der Lugolschen Lösung aufnimmt, ein schlechteres Entfärbungsvermögen besitzt als reiner Alkohol. Der jodjodkaliumhaltige Alkohol hat noch einen anderen Nachteil; wenn man ihn nämlich in der üblichen Weise auf dem Deckglase beläßt, ihn durch Abgießen entfernt und durch Wasserspülung ganz beseitigt, so haften dem mikroskopischen Präparate in größerer oder geringerer Menge gramfeste Klümpchen und Kügelchen an, welche das mikroskopische Bild bei meinen in Betracht kommenden Untersuchungen oft unangenehm und störend beeinflussen. Ein sorgsames Filtrieren der Gentianalösung durch ein doppeltes Filter führte nur selten zu einem befriedigenden Erfolge. Ändert man jedoch die Alkoholbehandlung derart ab, daß man bei schräg gestelltem Deckglase (oder Objektträger) auf den Rand desselben den Alkohol auftröpfelt, so wird die Bildung gramfester Farbstoffklümpchen zum größten Teile vermieden, da diese in reinem Alkohol löslich, wenig löslich in jodjodkaliumhaltigem und unlöslich in Wasser sind. Die Tröpfelmethode wurde in der Weise ausgeführt, daß man während $\frac{1}{2}$ Minute 30 Tropfen Alkohol, bei einer Dauer von $\frac{1}{4}$ Minute 15 Tropfen auf das schräg gestellte Deckglas gibt, nachdem man mit Gentiana- und Jodlösung je 1 Minute das Präparat gefärbt hatte. Den Alkohol läßt man vom Rande des Deckglases herunterfließen, und wenn man die Vorsicht gebraucht, daß das Herabfließen durch Wenden des Deckglases von 2 oder 3 Kanten desselben geschieht, so wird man ein für die Gramreaktion brauchbares Präparat erhalten. Diese Tröpfelmethode hat außerdem noch

den großen Vorteil, daß sie feinere Unterschiede in der Gramfärbung der Bakterienindividuen hervortreten läßt, wie dies aus dieser Arbeit deutlich hervorgeht.

In welcher Weise die Tröpfelmethode auf den Ausfall der Gramreaktion wirkt, veranschaulicht die folgende Tabelle. Gefärbt wurde mit Karbol-Gentianaviolett und Jodjodkalium je 1 Minute lang. In dieser Tabelle sind nur die Versuche von Deckglaspräparaten mit Hefe berücksichtigt.

Im folgenden bedeutet

- α : 1 Min. Alkohol in der üblichen Weise auf dem Deckglase belassen;
- β : $\frac{1}{2}$ „ 30—40 Tropfen Alkohol auf das Deckglas geträpfelt;
- γ : 2 „ etwa 80 Tropfen Alkohol auf das Deckglas geträpfelt;
- δ : 3 „ etwa 180 Tropfen Alkohol auf das Deckglas geträpfelt;
- ϵ : 5 „ mehr als 180 Tropfen Alkohol auf das Deckglas geträpfelt.

Versuch I.

- α = normal, gramfeste Farbstoffpartikelchen;
- β = normal, klareres Bild, keine Farbstoffpartikelchen;
- γ = normal, klareres Bild, einige Zellen im Innern rotblau;
- δ = größtenteils normal, jedoch an Zahl mehr blaue Zellen als bei γ ;
- ϵ = im allgemeinen normal, aber in jedem Hefehäufchen eine mehr oder minder große Zahl rotgefärbter Zellen oder im Beginne der Rotfärbung.

Versuch II.

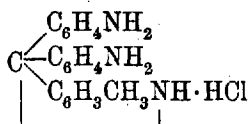
- | | |
|--|-------------------------------------|
| frische käufliche Hefe | nach 7 tägiger Lagerung bei 8—10° |
| α = normal | normal, etwa 3 rote Zellen |
| β = normal, klareres Bild | normal, etwa 1 Dutzend roter Zellen |
| δ = in der Hauptsache normal, vereinzelt rosa Zellen und Übergänge. | — |

Obige Versuche zeigen die Vorzüge der Tröpfelmethode. Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, die Tropfzahl während $\frac{1}{2}$ Minute auf 30 zu beschränken und nach Bedarf auf 15 Tropfen bei einer Dauer von $\frac{1}{4}$ Minute herunterzugehen. Analoge Versuche mit Mycoides und Aureus sind S. 273 angegeben.

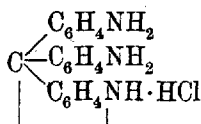
Über den Ersatz der 1prozentigen Jodjodkaliumlösung bei der Gramfärbung durch andere Halogenlösungen nebst Abänderungen im Färbeverfahren.

Über den Einfluß des Zusatzes von Jodjodkalium zur Gentianaviolettlösung bei der Gramfärbung findet man in der Literatur nur wenige Angaben. Nach Gottstein fällt KJ als salzartige Verbindung das Gentianaviolett aus den Gewebselementen; dem Jod des Jodjodkalium wird hierbei keine besondere Wirkung zugeschrieben. A. Fischer (a. a. O.) stimmt dem bei, nur hat er beobachtet, daß die JKJ-Lösung eine stärkere Fällung mit Gentianaviolett hervorbringt als eine 1prozentige KJ-Lösung allein. Näheres über die Niederschläge von Farbstoff mit KJ und mit JKJ wird von Fischer nicht mitgeteilt. Unna befaßte sich in seiner Schrift „Die Rosaniline und Pararosaniline“ eingehender mit diesen Verhältnissen. Aus dieser Schrift möge das, was für die weiter unten angegebenen Versuche von Belang ist, herausgegriffen werden.

Unna untersuchte die Einwirkung von KJ, HJ, JKJ und J in gelöster Form auf die Hydrochloride des Rosanilins und Pararosanilins:



Rosanilinsalz



Pararosanilinsalz

Die Niederschläge dieser jodhaltigen Reagenzien mit Rosanilin und Pararosanilin waren dunkelfarbig, teils löslich in Wasser, teils unlöslich, dagegen alle löslich in Alkohol und dann immer die Pararosanilinniederschläge schwerer löslich als die entsprechenden Rosanilinfällungen. Unterschiede in dem Verhalten dieser Niederschläge stellte er fest, erörterte auch die Umsetzungsmöglichkeiten u. a. m. Er ist der Ansicht, daß bei Färbungen das Jod keine feste Verbindung mit der Zellsubstanz der Bakterien eingeht, sondern sich nur mit dem Pararosanilin allein verbindet; die Jodfarbstoffverbindung würde mehr oder weniger stark an das Gewebe gekettet, je nach der chemischen Verwandtschaftskraft des betreffenden Gewebes zu dem Jodfarbstoffe. Diese Ausführungen schließt Unna mit folgenden Worten über die von ihm aufgestellte Theorie der Färbung: „Ich will aber durchaus nicht . . . gesagt haben, daß ich den Grund sicher eintretender chromatischer Differenzen jedesmal auf chemische Verschiedenheiten im Objekte zurückzuführen gedächte. Ich habe nur mehrfach im Laufe dieser Untersuchungen betonen zu müssen geglaubt, daß das Gewebe dem Farbstoffe gegenüber in den meisten Fällen die

Rolle eines chemisch verwandten Körpers übernimmt und von demselben dann nicht durch physikalische Kräfte, z. B. durch Diffusion, sondern nur durch eine in Tätigkeit gesetzte neue chemische Anziehung, durch diese aber mit Leichtigkeit getrennt werden kann.“

Die hier von Unna ausgesprochene Ansicht zeigt zur Genüge, daß er durchaus nicht zu den unbedingten Anhängern der chemischen Theorie der Färbung zu zählen ist; er weist an mehreren Stellen der genannten Schrift deutlich darauf hin, daß Färbungsunterschiede bei mikroskopischen Schnitten auch auf physikalische Ursachen zurückgeführt werden können.

Bei meinen Versuchen über den Ersatz der 1prozentigen JKJ-Lösung durch andere Halogenlösungen konnte auch ich feststellen, daß JKJ und KJ, beide in 1prozentigen wässrigen Lösungen, im Überschusse zugesetzt, mit Gentianalösung farbige Niederschläge geben. Zum Unterschiede von Unna benutzte ich die für Gramfärbung übliche, mit Karbolwasser versetzte Gentianaviolettlösung. Mit JKJ trat sofort ein brauner Niederschlag ein, welcher unlöslich in Wasser, löslich in 97prozentigem Alkohol war, zu einer blauroten (kirschroten) Flüssigkeit. Nach dem Zusatze von KJ zu Gentianaviolett machte sich zunächst nur eine himmelblaue Trübung bemerkbar, allmählich bildete sich ein Niederschlag, welcher an Menge geringer war als in dem Falle von JKJ. Bemerkenswert ist, daß dieser himmelblaue Niederschlag sich in Wasser zu einer blauroten Flüssigkeit löste.

Zu den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden Deckglaspräparate von Aureus, Mycoides und Hefe benutzt und nach Gram entweder in der üblichen Weise oder nach der Tröpfelmethode (Alkoholtröpfelmethode) gefärbt. Neben der üblichen 1prozentigen JKJ-Lösung wurden folgende Halogenlösungen berücksichtigt: Jodwasser (0·03 Proz.), Bromwasser (1 Proz.) Chlorwasser (0·03 Proz.) und 1proz. wässrige KJ-Lösung. In einem Falle (bei Mycoides) wurde die übliche Reihenfolge der Gramflüssigkeiten derart abgeändert, daß zuerst die JKJ-Lösung auf das Deckglas gegeben wurde und dann Karbolgentianaviolett, Alkohol und Fuchsin.

Über die verschiedene Wirkung der angewandten Halogenlösungen auf Aureus, Mycoides und Hefe ist folgendes zu sagen¹:

Bei Aureus ist der färberische Erfolg mit Bromwasser und mit Jodwasser so ziemlich der gleiche, durch Jodwasser (nach Einwirkung von 10 Minuten) tritt ein dunklerer blauer Farbenton ein, von dem bläuscharnen des Jodjodkaliums verschieden. Vielleicht ist die geringe Kon-

¹ Die hierzu gehörige Tabelle ist der Raumersparnis wegen weggelassen worden; sie enthält die für die Versuche nötigen Angaben (wie Behandlungsweise mit Alkohol, Zeitangaben u. a. m.).

zentration, in welcher das Jodwasser herzustellen ist, trotz 10 Minuten langer Einwirkung zu schwach, um das Blauschwarz hervorzubringen. Der Ersatz des Jodjodkaliums durch KJ hat den Erfolg, daß das Gentianaviolett fast völlig durch Alkohol entfernt wird; die Kokken sind nicht mehr als gramfest zu bezeichnen.

Bei *Mycoides* wurden nur die jodhaltigen Lösungen untersucht. Es zeigte sich hier, daß Jodwasser (nach Einwirkung von 10 Minuten und Ersatz durch frisches Reagenz) die gleiche Wirkung hervorzurufen imstande ist wie das Jodjodkalium: die Stäbchen sind gut gramfest gefärbt. Jodkalium dagegen bleibt ohne Einwirkung, genau so wie in dem Falle, wo die übliche Reihenfolge der Gramflüssigkeiten abgeändert wurde in Jodjodkalium—Gentianaviolett—Alkohol—Fuchsin.

Die Versuche mit Hefe und den Halogenlösungen wurden ein wenig eingehender gemacht und auf Chlorwasser ausgedehnt, vorzüglich aus dem Grunde, um die Farbwirkungen bei den Halogenen Chlor, Brom und Jod kennen zu lernen. Maßgebend für unsere Betrachtungen hinsichtlich des Chlorwassers ist der Versuch, bei welchem die Einwirkungszeit des Chlors auf 10 Minuten ausgedehnt wurde. Man sieht, daß Chlor den hellsten Farbenton bei der „Gramreaktion“ liefert, Jod den dunkelsten: durch Chlor erhält man einen bläulichen, durch Brom einen tief dunkelblauen und durch Jod einen schwarzblauen Farbenton, welcher von der normalen Färbung durch JKJ nicht zu unterscheiden ist. Von Interesse ist auch das Verhalten der 1prozentigen Jodkaliumlösung auf Hefe an Stelle der üblichen Jodjodkaliumlösung: die Zellen sind dunkelblau, tiefblau bis schwarzblau gefärbt, jedoch nicht durchgängig, ein kleiner Teil verliert bei der Alkoholbehandlung den Dunkelblauton und nimmt einen helleren Blauton an.

Überblickt man die Ergebnisse, die wir bei der Einwirkung der verschiedenen Halogenlösungen auf *Aureus*, *Mycoides* und Hefe erhalten haben, so ist das eine gewiß, daß man durch Jodwasser bei geeigneter, d. h. längerer Einwirkung desselben auf *Mycoides* und Hefe eine durchaus gramfeste Färbung erzielen kann; unsicher ist noch der Erfolg bei *Aureus*, wo nur ein dunkelblauer Farbton erhalten wurde. Gleichwohl will es mir scheinen, als ob das Jod allein maßgebend für das Zustandekommen der Gramschen Schwarzblaufärbung sei; ob freilich in allen Fällen, dies zu entscheiden, dazu müßte ein reichlicheres Versuchsmaterial vorliegen. Immerhin ist die Vermutung nicht von der Hand zu weisen, daß es Zweckmäßigkeitsgründe gewesen sein mögen, dem Jodjodkalium vor dem Jod den Vorzug zu geben; zu nennen wäre die stärkere Konzentration, in welcher die Jodjodkaliumlösung hergestellt werden kann, ferner die

genauere und bequemere Dosierung dem Jodwasser gegenüber und schließlich auch die etwas bessere Haltbarkeit der Jodjodkaliumlösung.

Betrachtet man weiter die Wirkung von Brom- und Chlorwasser auf den Ausfall der Gramreaktion, so erkennt man trotz des knappen Versuchsmateriales schon recht deutlich, daß an Stelle des Gramschen Schwarzblaus eine Dunkelblaufärbung bei Brom, eine Blaufärbung (Hellblaufärbung?) bei Chlor eintritt. Man darf annehmen, daß die Ursache in der Bildung entsprechend gefärbter Jod-, Brom- und Chlorverbindungen mit dem Gentianaviolett liegt. Ob bei dieser Reaktion das Halogen sich an die Stelle des Säureanteils im Pararosanilin setzt oder eine Nebenreaktion stattfindet, bei welcher das Halogen auch in den Benzolkernen in irgendeiner Form eintritt, ist auf rein chemischem Wege zu entscheiden. Auch der Einfluß wäre dann zu untersuchen, den hierbei der Zusatz von Phenol bzw. Anilin zur Gentianaviolettlösung im Vergleiche zu einer reinen Farbstofflösung ausüben kann.

Ändert man bei Mycoides die Reihenfolge der Gramflüssigkeiten ab in Jodjodkalium—Gentianaviolett—Alkohol—Fuchsin, so werden die Stäbchen durchweg gramfrei. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, daß es bei dieser Anordnung nicht bis zur Bildung des in Alkohol schwer löslichen jodhaltigen Farbstoffes kommt.

Was die Wirkung der 1prozentigen Jodkaliumlösung (an Stelle der Lugolschen Lösung) auf den Ausfall der Gramreaktion betrifft, so verhalten sich Aureus, Mycoides und Hefe etwas verschieden: Mycoides erscheint durchaus gramfrei, Aureus blau und Hefe dunkelblau. Wir beobachteten demnach in einem Falle (bei Mycoides) kein Haften des Farbstoffes, in den beiden anderen Fällen eine Blaufärbung bei Aureus, eine Dunkelblaufärbung bei Hefe. Warum wird das eine Mal der Farbstoff durch Alkohol herausgelöst, das andere Mal nicht oder nur unbedeutend, während doch in allen drei Fällen bei analoger Einwirkung der Jodkaliumlösung auf den Gentianafarbstoff dieser in der gleichen chemischen Zusammensetzung auf den Zelleib niedergeschlagen werden mußte? Meines Erachtens lassen sich diese Unterschiede sowohl physikalisch (nach A. Fischers Hypothese) als auch chemisch erklären: physikalisch durch Annahme eines größeren Substanzreichtums oder einer dichterem Beschaffenheit der Zelle, chemisch dadurch, daß es wie beim Jodjodkalium auch bei Anwendung von Jodkalium zur Bildung eines J- oder KJ-haltigen Farbstoffes kommt, welcher mit der für die Gramfärbung maßgebenden Zellsubstanz eine in Alkohol mehr oder weniger lösliche Verbindung eingeht.

Einführende Versuche mit Fettlösungsmitteln und Säuren.

Wie aus der Einleitung zu ersehen ist, wird von einigen Forschern den Fettlösungsmitteln eine Bedeutung für den Ausfall der Gramreaktion beigemessen; durch Behandlung mit solchen organischen Flüssigkeiten werden nach Beobachtungen dieser Forscher „Lipoid“-verbindungen, welche die Gramfestigkeit mancher Bakterien bedingen sollen, herausgelöst. Auch von mir wurden derartige und andere Versuche angestellt, die, obwohl nur Vorprüfungen, doch für den weiteren Verlauf dieser Arbeit wertvoll waren. Diese Versuche mögen nur in aller Kürze mitgeteilt werden.

Es wurden hierfür Deckglaspräparate und Aufschwemmungen von Bakterien (*Aureus*, *Mycoides* und in 2 Fällen Hefe) benutzt; die Deckglaspräparate waren bei Zimmertemperatur angetrocknet worden; die Bakterien in den wässerigen oder alkoholischen Flüssigkeiten gut zu verteilen, bot keine Schwierigkeit. Um die Schwierigkeit des Verteilens in Äther, Ligroin und ähnlichen Lösungsmitteln zu beheben, wurde das Bakterienmaterial zuerst mit wenig Alkohol gut verrührt, und darauf das betreffende Lösungsmittel, wie Äther, Ligroin usw. hinzugegeben. An Untersuchungsflüssigkeiten wurden außer den üblichen organischen Lösungsmitteln Chloroform, Äther und Ligroin noch verschiedene Säuren (Salz-, Salpeter-, Schwefel-, Essig-, Milchsäure und Flußsäure) und die beiden bekannten Reagenzien Chloralhydratlösung (67prozent. in Wasser) und Schweizers Reagens benützt. Bei der Probeentnahme wurde von diesen Aufschwemmungen eine Platinöse voll auf Deckgläser verteilt, welche im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet wurde. Die HF-haltigen Proben brachte man auf Deckgläser, welche einen Tropfen Ammoniak enthielten, und trocknete sie in der gleichen Weise. Diese und ähnliche Präparate befreite man durch Abspülen mit Wasser vom anhaftenden Reagenz; bei Schweizers Reagenz wurde dem Spülwasser etwas Ammoniak hinzugefügt; bei den HF-Aufschwemmungen kamen Platintiegel zur Anwendung.

Aus den einführenden Versuchen ergab sich nun folgendes. Chloroform, Äther, Ligroin, 67prozentige wässrige Chloralhydratlösung und Schweizers Reagenz beeinflussen die Gramfestigkeit von *Aureus* und *Mycoides* bei einer Dauer von mehreren Tagen und einer Temperatur von 20 bis 25° nicht, selbst wenn man, wie es bei den Versuchen mit Äther, Chloroform und Ligroin geschah, diese auf 2 bis 3 Wochen ausdehnt; die gleiche Beobachtung macht man mit Schweizers Reagenz. Der Versuch mit diesem beschränkte sich bei *Mycoides* nur auf eine Dauer von 1½ Tagen. Nach Untersuchungen von R. Mauch sind in 60 bis 80prozentigen wässerigen Chloralhydratlösungen löslich: Alkaloide und deren Salze, Glykoside, Bitterstoffe, viele Harze, Gummiharze, sauerstoffhaltige ätherische Öle, viele organische Farbstoffe (auch Indigotin), Gerbsäuren, Zuckerarten, Dextrine, nach vorangegangener Quellung Stärke,

Eiweiß (Hühnereiweiß?), ferner Gelatine und Keratin, wenig löslich fette Öle und feste Fette, dagegen unlöslich Zellulose und Seidenstoffe. Daß Verbindungen wie Glykoside, Harze, Fette, Keratin, falls sie Bestandteile des Bakterienleibes sind und für den Ausfall der Gramreaktion maßgebend sind, von wässriger Chloralhydratlösung bei den oben angegebenen Versuchsbedingungen ausgezogen werden können, ist wohl anzunehmen. Auf die komplizierten Eiweißverbindungen wie Nuklein u. a. hat Mauch seine Versuche nicht ausgedehnt. Die von mir gemachten Beobachtungen sprechen nicht dafür, daß die komplizierter zusammengesetzten Nukleinverbindungen, wenn sie im Bakterienleibe enthalten sind, in konzentrierter wässriger Chloralhydratlösung löslich sind. Nicht bloß Chloralhydratlösung blieb ohne Einfluß auf die Gramfestigkeit von Aureus und Mycoides, sondern auch Schweizers Reagenz, das Lösungsmittel für Zellulose. Demnach wird Zellulose als solche für den Ausfall der Gramreaktion nicht in Betracht kommen. Ein 3 Minuten langes Erhitzen von Aureus mit Ligroin (Siedetemperatur 90 bis 100°) blieb ohne Einfluß auf den Ausfall der Gramreaktion. Anders jedoch verhielten sich Aureus, Mycoides (und Hefe) bei einigen Versuchen mit Säuren. Ohne Erfolg freilich waren die Versuche von Aureus und Mycoides mit Salpetersäure (Aureus), Flußsäure (Mycoides, 25 Prozent. Säure), Essigsäure und 10 Prozent. Milchsäure (Aureus). Die Einwirkungsdauer betrug 2 bis 3 Tage bei Zimmertemperatur (20 bis 25°), bei Salpetersäure von 25 Prozent nur 6 Stunden (Aureus). Keine Änderung konnte man bei einer eintägigen Einwirkung von Eisessig auf Aureus bemerken; kurzes Erhitzen von Aureus und Mycoides mit 6- bzw. 3prozentiger Essigsäure auf 90 bis 100° brachte keine Änderung hervor. Kamen dagegen Salzsäure (6 bis 9. Prozent) oder Schwefelsäure von 10 Prozent zur Anwendung, und wurden hierbei die Versuche auf mehrere Tage bei Zimmertemperatur von 20 bis 25° ausgedehnt, so trat eine deutliche Abnahme der Gramfestigkeit bei Aureus, Mycoides und Hefe ein: durch Salzsäure wurden die Bakterien nach 5 Tagen zum großen Teile oder auch ganz gramfrei; 10 Prozent Schwefelsäure wirkte langsamer.

Solche Versuche mit Säuren waren im beschränkten Umfang mit ähnlichen Erfolgen schon von anderen Forschern ausgeführt worden; so gibt z. B. Grimme (s. Einleitung) an, daß gramfeste Bakterien durch heiße Salzsäure nicht verändert würden, Nikitine dagegen fand, daß die Gramfestigkeit durch Säuren, Alkalien und Ammoniak herabgesetzt würde. Nach meinen Vorprüfungen mit Säuren des verschiedensten Dissoziationsgrades (Essigsäure → Salzsäure!) übten diese zum Teil einen schädigenden Einfluß auf die Gramfestigkeit aus; ebenfalls schien die Dauer der Einwirkung (vgl. das Verhalten der stark dissoziierten Salpetersäure!) und

die Höhe der Temperatur bei den Versuchen eine Rolle zu spielen. Alles dies machte es wünschenswert, die Wirkungsweise von Säuren des verschiedensten Dissoziationsgrades möglichst umfassend zu prüfen und anschließend an die H-Ionenwirkung die der OH-Ionen zu untersuchen. Diesen Untersuchungen sind nun die folgenden Kapitel mit ihrem umfangreichen experimentellen Materiale gewidmet. Die hierzu gehörigen Tabellen mußten wir auch im weiteren Verlaufe dieser Abhandlung der Raumersparnis wegen weglassen.

Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Kleinwesen.

I. Einwirkung von Säuren auf Aureus, Mycoides und Hefe unter verschiedenen Bedingungen.

Für diese Art von Versuchen war die Aufschwemmungsmethode die passendste. Von Säuren wurden folgende gewählt: Salz-, Salpeter-, Schwefel-, Flußsäure, Ameisen-, Essig-, Propion-, n-Butter- und i-Milchsäure; die Konzentration dieser Säuren war $\frac{n}{2}$ bis 6n und wurde durch Titration bestimmt, ausgenommen die der Milchsäure, wo der Gehalt durch Verdünnen des offiziellen 90prozent. Präparates mit destilliertem Wasser hergestellt wurde; der Anteil an Milchsäureanhydrid blieb hierbei unberücksichtigt. Die Flußsäure war Kahlbaumsches reines Präparat. Nach früheren Untersuchungen des Verfassers enthält diese zwar Spuren von Schwefelsäure und Kieselflußsäure; die geringen Verunreinigungen sind jedoch für die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse ohne den geringsten Belang. Die Aufschwemmungen mit Flußsäure wurden in Platintiegeln vorgenommen, welche durch gut passende Kork- oder Gummistopfen verschlossen wurden. Bei den Aufschwemmungen von Mycoides mit 2n-Flußsäure und -Ameisensäure verwendeten wir zwei Platintiegel und zwar aus dem Grunde, um die Versuchsanordnung möglichst gleichartig zu gestalten. Es mag noch erwähnt werden, daß die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben in den meisten Fällen entweder nach Neutralisierung mittels Jodlösung oder mit Wasser allein mehrmals zentrifugiert wurden. Alles übrige findet man in der folgenden Übersicht angegeben.

Aureus (Staphyloc. pyog. aureus).

1. Versuchreihe mit $\frac{n}{2}$ -Säuren bei 20 bis 25°

Bei dieser Säurekonzentration und bei Anwendung der Färbemethode ohne Tröpfeln (je 1 Minute ohne Tröpfeln) erleidet die Gramfestigkeit nach 5 Tagen keine Einbuße, nach etwa 34 Tagen macht sich ein Einfluß bemerkbar, aber nur bei den starken und mittelstarken Säuren, zu denen Salz-, Salpeter-, Schwefel- und Oxalsäure zu rechnen sind. Bei Ameisen-, Milch-, Essig-, Buttersäure und wahrscheinlich auch bei Propionsäure läßt sich keine Einwirkung erkennen. Bei Salz-, Salpeter-, Schwefel- und Oxalsäure treten Gradunterschiede in der Umwandlung des Aureus schon deutlich

hervor: die Umwandlung durch Salzsäure und durch Salpetersäure ist nach 34 Tagen weiter vorgeschritten als durch Schwefelsäure und durch Oxalsäure. Obwohl die Genauigkeit dieser Versuche nur eine angenäherte ist, so erkennt man, daß die Säuren sich nach ihrer elektroytischen Dissoziation einreihen; Salzsäure und Salpetersäure sind stärker dissoziiert als Schwefelsäure und Oxalsäure und diese letzteren wiederum stärker als Ameisensäure, Milchsäure bis herab zur schwächsten Säure der Normal-Buttersäure. Nach etwa 49tägiger Einwirkung von $\frac{1}{2}$ -Salzsäure bei 20 bis 25° ist Aureus gramfrei geworden.

2. Versuchsreihe mit 4n-Säuren bei etwa 20°.

(Färbemethode: je 1 Minute ohne Tröpfeln),

Die Wirkungsweise der 4n-Säuren Salz-, Schwefel- und Ameisensäure verhält sich den in der 1. Versuchsreihe angeführten Ergebnissen ganz entsprechend: die Säuren ordnen sich auch hier nach ihrem Dissoziationsgrade. Salzsäure wirkt am kräftigsten, schwächer bereits Schwefelsäure und ohne Einfluß ist Ameisensäure. In Anbetracht der größeren Konzentration dieser Säuren im Vergleich zu der bei der 1. Versuchsreihe mit $\frac{1}{2}$ facher Normalität geht die Umwandlung rascher vor sich; nach 3 Tagen schon sind bei der Aufschwemmung mit 4n-Salzsäure — scheinbar! — keine normal gefärbten Kokken mehr zu sehen, während eine 5tägige Einwirkung der $\frac{1}{2}$ -Salzsäure der Färbbarkeit nach Gram keinen Abbruch tut.

Bei der 2. Versuchsreihe traten experimentelle Schwierigkeiten auf, welche erst im Verlaufe dieser Arbeit überwunden wurden. Es zeigte sich nämlich, daß nach 6tägiger Einwirkung der 4n-Salzsäure auf Aureus keine Sedimentierung der schwach opalisierenden Flüssigkeit trotz Alkoholzusatzes und Zentrifugierens erfolgte. Die Flüssigkeit erschien fast klar und gab bei einer Prüfung mit Silbernitrat deutlich die Chlorreaktion. Um diese Schwierigkeiten zu beheben, wurde die Salzsäure bei einem neuen Versuche (Temperatur: 25°) durch verdünnte Sodalösung bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft, worauf unter Zusatz von destilliertem Wasser 2 bis 3mal zentrifugiert wurde. Der Erfolg war, daß Sedimentierung nach dem Zentrifugieren eintrat; die Kokken schienen gramfrei zu sein. Zur Kontrolle wurde von der gleichen, aber nicht vorbehandelten Untersuchungsfüssigkeit mit der Platinöse eine Probe auf das Deckglas gebracht, in Vakuum bei 25° verdunstet und ohne vorherige Wasserspülung nach Gram gefärbt. Der Erfolg war nun, daß die Kokken größtenteils normal gefärbt waren, eingestreut lagen undeutlich rot gefärbte Kokken. Der Betrag an veränderten und unveränderten Kokken ließ sich auch schätzungsweise nicht angeben. Ich glaube aber, daß die Umwandlung tatsächlich größer

war, als es das mikroskopische Bild erkennen ließ. Auf jeden Fall wird Aureus durch 4n-Salzsäure bei 25° nach 4 Tagen zu einem guten Teil gramfrei.

3. Versuchsreihe mit 2n-Säuren bei 36°: Salzsäure, Flußsäure.

(Färbemethode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln).

Bei der 3. Versuchsreihe wurden alle Bedingungen eingehalten, um die eben geschilderten experimentellen Schwierigkeiten nach Möglichkeit zu beheben. Zunächst ist die früher erwähnte Tröpfelmethode anzuführen, sie wirkt trotz kürzerer Einwirkungszeit energischer als die übliche Methode, den Alkohol 1 Minute auf dem Deckglase zu belassen. Außerdem wurden die entnommenen Proben mit Sodalösung gegen Lackmus als Indikator neutralisiert und bei 3000 bis 3500 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Die Flußsäureproben wurden in der gleichen Weise behandelt, nur mit dem Unterschiede, daß das Neutralisieren in einer Platinschale oder ebensogut in einem mit Wachsparaffin überzogenen Becherglase vorgenommen wurde (Deuben). Da das entstandene Natriumfluorid unter diesen Versuchsbedingungen das Glasmaterial des Zentrifugenröhrchens nicht angreift, so konnte das Zentrifugieren unbedenklich in den üblichen gläsernen Röhrchen geschehen.

Was die Ergebnisse der 3. Versuchsreihe mit Salzsäure und Flußsäure anlangt, so erkennt man auch hier, wo 2n-Säuren in Arbeit genommen wurden, daß die stärkere Salzsäure wesentlich schneller die Umwandlung des Aureus herbeiführt als die schwächere Flußsäure, deren Dissoziation von der Größenordnung der Phosphorsäure, Arsensäure und Monochloressigsäure (Ostwald, Deuben) ist: Phosphorsäure = 6·00, Flußsäure = 5·7, Monochloressigsäure = 4·7. Da die Versuche bei 36° vorgenommen wurden, geht die Umwandlung der Kokken durch die Salzsäure ziemlich rasch vor sich; sie ballen sich hierbei zum Teil zu formlosen Haufen zusammen. Von Wichtigkeit ist auch, daß die Flußsäure, welche an Stärke etwa in der Mitte zwischen Oxalsäure und Ameisensäure steht, nach 7 Tagen eine teilweise Umwandlung der Kokken bewirkt; nach 13tägiger Einwirkung sind sie erst gramfrei geworden. Mithin sind auch schwach dissoziierte Säuren befähigt, Gramfreiheit herbeizuführen, falls nur die Versuchstemperatur erhöht wird.

4. Versuchsreihe mit 2n-Milchsäure (18 Prozent) bei 36 und 23°.

Färbemethode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute 25 Tropfen tröpfeln; Proben nach Neutralisation mit Soda bei 3000 U zentrifugiert.

Die Einwirkung dieser 2n-Säure bei einer Temperatur von 36° ist recht gering; erst nach etwa 19 Tagen wird ein erheblicher Teil der Kokken

gramschwächer. Bei der Versuchstemperatur von 23° ist ein Einfluß selbst nach einer Dauer von 22 Tagen nicht zu bemerken. Vgl. hierzu die Versuche von Milchsäure mit Hefe und *Bac. bulgar.* (S. 253 u. 281)!

Mycoides.

1. Versuchsreihe mit $\frac{n}{2}$ -Säuren bei 18 bis 20°: Salzsäure, Essigsäure, n-Buttersäure.

Färbemethode: je 1 Min. ohne Tröpfeln.

Das Verhalten des *Mycoides* gleicht dem von *Aureus* bei $\frac{n}{2}$ -Säuren (s. 1. Versuchsreihe).

$\frac{n}{2}$ -Säuren (Salz-, Essig- und n-Buttersäure) lassen die Gramfestigkeit bei 18 bis 20° und einer Dauer von 9 Tagen unberührt; auch nach 45 Tagen ist eine merkliche Abnahme nur bei der Salzsäure zu beobachten, bei Essig- und Buttersäure ist sie unbedeutend; ein Toluolzusatz von 1 bis 2 Tropfen zur Buttersäure-Aufschwemmung ändert nichts an dem Befunde.

2. Versuchsreihe mit 4n-Säuren bei 18 bis 20°: Salzsäure, Schwefelsäure, Ameisensäure.

Färbemethode: wie bei 1.

Die stärker konzentrierten Säuren liefern das gleiche Bild. Daß $\frac{n}{2}$ -Salzsäure bei 20 bis 25° *Aureus* nach 49 Tagen (vgl. 1. Versuchsreihe bei *Aureus*) gramfrei macht, während die gleichkonzentrierte Säure bei 18 bis 20° *Mycoides* nach 45 Tagen (s. 1. Versuchsreihe bei *Mycoides*) nur unbedeutend beeinflußt, ist wohl auf den Temperaturunterschied bei den beiden Versuchsreihen zurückzuführen. Eingehendere Vergleichsversuche sind hierzu erforderlich.

3. Versuchsreihe.

(je 1 Min. und $\frac{1}{2}$ Min. tröpfeln).

- a) 3n- und 6n-Flußsäure bei 23 bis 24°.
- b) 2n-Flußsäure und -Ameisensäure bei 25 bis 27°.
- c) 6n-Flußsäure bei 36°.

Zur Technik dieser Versuche ist zu bemerken, daß die Proben, auch die der Ameisensäure, vor dem Zentrifugieren mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht wurden, mit Ausnahme des Versuches mit der 6n-Flußsäure bei 36°, wo die Probe ohne weitere Vorbehandlung auf dem Deckglase mit Ammoniak zusammengebracht und in der bekannten Weise weiter verarbeitet wurde. Eine Wirkung der 3n-Flußsäure bei 23 bis 24° auf *Mycoides* ist nach 4 Tagen nicht zu beobachten, die der 6n-Flußsäure ist in der gleichen Zeit nur schwach, wesentlich stärker wird sie erst nach

Verlauf von etwa 7 Tagen. Bei den Versuchen mit 2n-Flußsäure macht sich die Erhöhung der Temperatur von 23 bis 24° auf 25 bis 27° ziemlich deutlich bemerkbar. Trotzdem die Konzentration hier schwächer ist als bei den eben genannten Versuchen unter a, hat die geringe Temperaturerhöhung von 2 Grad eine um wenig stärkerere Umwandlung der Stäbchen nach einer Versuchszeit von 3 bzw. 4 Tagen herbeigeführt. Von Interesse ist das Verhalten der Ameisensäure gegenüber der 2n-Flußsäure bei den gleichen Versuchsbedingungen: die Ameisensäure wirkt schwächer. Dies entspricht ihrer Eigenschaft als der schwächer dissoziierten Säure. Der Versuch mit 6n-Flußsäure bei 36° besagt, daß bei Temperaturerhöhung auch eine schwach dissoziierte Säure Mycoides nach etwa 6 Tagen gramfrei macht.

Hefe.

(Färbemethode: je 1 Min. und $\frac{1}{2}$ Min. tröpfeln.)

1. Versuchsreihe mit 4n-Säuren bei 17 bis 18°: Salzsäure, Schwefelsäure, Ameisensäure.

Auch bei Hefe zeigte es sich, daß die Säuren hinsichtlich ihrer Wirkungsweise sich nach dem Dissoziationsgrade einordnen. Die Umwandlung der Hefe wurde annähernd quantitativ verfolgt, da sie sich verhältnismäßig gut zu solchen messenden Bestimmungen eignet, wie das aus dem folgenden Kapitel hervorgeht.

2. Versuchsreihe:

- a) zentrifugiertes Material mit 6n-Flußsäure bei 36°;
- b) Reinzuchthefe der Riebeck'schen Brauerei (sog. K-Hefe) mit 4n-Salzsäure bei etwa 17°.

Wie Aureus und Mycoides wurde auch Hefe durch die schwache Flußsäure bei erhöhter Temperatur gramfrei; nach etwa 6 Tagen trat dieser Punkt ein. Bemerkenswert ist hier noch, daß nicht wie bei späteren Versuchen mit Salzsäure eine Körnerfärbung zu beobachten war.

Da bei Aureus und Mycoides jedesmal frisch übergeimpftes Material benutzt wurde, von Hefe nur die käufliche Preßhefe, so impfte ich Riebeck'sche K-Hefe auf etwas feucht gehaltener Petrischale mit Agar bei etwa 20° über; nach 3 Tagen hatte sich genügend Hefe gebildet. Die Kontrollprobe, nach Gram gefärbt, wies nur einige wenige farblose Zellen auf, eine Beobachtung, welche nicht nur bei Hefe, sondern auch bei Mycoides bisweilen gemacht wurde. Der Versuch mit Reinzuchthefe beweist, daß auch diese in ihrem Verhalten gegen 4n-Salzsäure bei 17° der käuflichen, frischen Preßhefe glich.

3. Versuchsreihe mit i-Milchsäure.

(Färbemethode: je 1 Min. und $\frac{1}{2}$ Min. 25 Tr. tröpfeln.)2n-Säure bei $36\frac{1}{2}^{\circ}$ und $\frac{n}{1}$ -Säure bei 23 und $36\frac{1}{2}^{\circ}$.

Der Einfluß der 2n- und $\frac{n}{1}$ -Milchsäure auf den Ausfall der Gramreaktion war auffallend gering und verschwindend gering bei den Versuchen mit $\frac{n}{1}$ -Säure bei der Temperatur 23° ; bei diesen letzteren Versuchen ließ sich die Hefe noch nach einer Einwirkungszeit der Säure von 24 Tagen zum allergrößten Teile sehr gut nach Gram färben. Bei der erhöhten Temperatur von $36\frac{1}{2}^{\circ}$ vollzog sich die Umwandlung etwas schneller: durch die 2n-Säure wurden nach 12 Tagen 25 Prozent Zellen umgewandelt (gramfrei und Übergänge), nach 21 Tagen 30 Prozent, durch die $\frac{n}{1}$ -Säure nach 24 Tagen wurden etwa 40 Prozent veränderte gezählt. (Vgl. hierzu die Versuche mit *Bac. bulgaricus* mit Milchsäure S. 281).

Messende Versuche über die Einwirkung von Säuren auf Hefe:

a) $\frac{n}{2}$ -Säuren von verschiedenem Dissoziationsgrade;

b) 3 bis 4n-Salzsäure bei Anwendung verschieden großer Hefemengen.

(Färbemethode bei allen: je 1 Min. und $\frac{1}{2}$ Min. tröpfeln.)

a) Um die Umwandlung gramfester Hefe in gramfreie durch Säuren messend zu verfolgen, wurde im wesentlichen die gleiche Versuchsanordnung wie die im vorigen Kapitel beschriebene benutzt. Nach den früheren Versuchen schienen Temperaturen von 22 bis 23° und eine Konzentration der Säuren von $\frac{1}{2}$ -facher Normalität am geeignetsten zu sein. In den Versuchen wurde ein etwa linsengroßes Stück frischer Preßhefe mit etwa 4 ccm der betreffenden Säure in einem Reagenzglas kräftig angeschüttelt, dieses mit einem Korkstopfen gut verschlossen in einen Thermostaten gestellt, dessen Temperatur von 23 bis 25° bzw. 22 bis 24° schwankte. Jeden Tag wurde der Inhalt des Reagenzglases gut durchgeschüttelt, und zu bestimmten Zeiten mittels Pipette eine Probe entnommen, welche wir dreimal mit destilliertem Wasser zentrifugierten. Eine Durchschnittsprobe des Zentrifugats verteilten wir auf 2 Deckgläser möglichst gleichmäßig, trockneten ohne Anwendung von Wärme an und färbten unter Anwendung der Tröpfelmethode nach Gram. An 2 bis 3 verschiedenen Stellen des mikroskopischen Präparates ermittelten wir die Zahl der unveränderten und veränderten Hefezellen; der Durchschnitt aus 2 Deckglaspräparaten wurde als maßgebend angesehen. Von Säuren kamen in Betracht: Salz-, Schwefel-, Oxal- und Ameisensäure. Die Stärke dieser Säuren beträgt, wenn man die der Salzsäure nach Ostwald gleich 100 setzt, für:

Schwefelsäure	73—74
Oxalsäure	18
Ameisensäure	1.5

Die einzelnen Versuche unterscheiden sich in ihrer Anordnung darin, daß die käufliche Preßhefe das eine Mal (α -Versuche), ohne vorher erhitzt zu

werden, verwendet wurde, das andere Mal (β -Versuche), 'aufgeschwemmt in destilliertem Wasser, 5 Minuten im Wasserbade auf 97 bis 98° erhitzt und zentrifugiert wurde. In der 2. Versuchsreihe kam zum Unterschiede von der ersten überhaupt nur vorher zentrifugierte käufliche Preßhefe zur Anwendung.

b) Wichtig schien die Beantwortung der Frage, wie die Umwandlung bei stark voneinander abweichenden Hefemengen unter dem Einflusse von Salzsäure vor sich gehen würde. Die Mengenverhältnisse bei diesen Versuchen waren folgende. Von der frischen Hefe wurden bei den Parallelversuchen in dem einen Falle etwa 0.01 g, im anderen 0.1 g angewendet. Die benutzten Temperaturen waren 36°, 22 bis 24° und 8 bis 10°; diejenigen Hefeaufschwemmungen, welche bei 36° und bei 22 bis 24° gehalten wurden, schüttelten wir am Tage zweimal gut durch. Im übrigen schließt sich die Versuchsanordnung den oben und früher gemachten Angaben an. Die mikroskopische Durchmusterung der unter a) und b) erhaltenen Deckglaspräparate geschah bei elektrischem Lichte, diejenigen Zellen, welche eine deutlich erkennbare Änderung in der Gramfärbung aufwiesen, wurden als verändert angesehen.

Folgendes möchte ich der Besprechung der hierbei gewonnenen Ergebnisse vorausschicken. Die Untersuchungen fallen, wie ersichtlich, in den Bereich der chemischen Dynamik. Ich bin mir wohl bewußt, daß die Genauigkeit der mitgeteilten Bestimmungen nur eine angenäherte sein kann, da Fehlerquellen bei der geschilderten Versuchsanordnung und bei dem eigenartigen Versuchsmateriale unvermeidlich sind. Von Fehlerquellen kämen hierbei in Betracht: die ungenügende Konstanz der Versuchstemperatur (abgesehen von der bei 36°), eine Fehlerquelle, welche nicht so sehr ins Gewicht fallen dürfte, weil die einzelnen Hefeaufschwemmungen bei den entsprechenden Versuchen den gleichen Temperaturschwankungen ausgesetzt waren; erheblicher wird der Fehler sein, welcher durch die Unlöslichkeit der Hefe in Säure bedingt ist. Wir haben hier eine inhomogene Flüssigkeit; eine gleichmäßige Verteilung der Hefezellen in dieser Flüssigkeit ließe sich durch häufiges Schütteln des Reaktionsgefäßes oder noch besser durch eine Schüttelvorrichtung für künftige Untersuchungen erreichen. Eine weitere, doch weniger erhebliche Fehlerquelle liegt in der Schwierigkeit, die Zahl der veränderten Zellen in mikroskopischen Präparate sicher festzustellen.

a) $\frac{n}{2}$ -Säuren: Salzsäure, Schwefelsäure, Oxalsäure, Ameisensäure.

α = Versuche mit Hefe ohne Vorbehandlung, β = nach Vorbehandlung (erhitzt und zentrifugiert).

1. Versuchsreihe bei 23 bis 25°.
2. „ „ „ 22 „ 24°.

Es konnte hier mit Sicherheit nachgewiesen werden, daß eine Proportionalität in der Zahl der veränderten Hefezellen zu dem Dissoziationsgrade der angewandten Säuren besteht: je geringer der Dissoziationsgrad der Säure, desto geringer die Zahl der umgewandelten Zellen. Recht anschaulich zeigen dies die α -Versuche der 1. Reihe. Bei den β -Versuchen fällt es auf, daß die Umwandlung der Zellen in der ersten Zeit der Einwirkung der Säuren langsamer verläuft als bei den entsprechenden α -Proben: Schwefelsäure bewirkt nach einem Verlaufe von 7 Tagen noch keine Veränderung, während nicht erhitzte Hefe nach 6 Tagen bereits 30 Prozent veränderte Zellen aufweist; das gleiche Verhalten zeigt Oxalsäure, nur ist bei ihr, als der schwächeren Säure, die Reaktion verlangsamt: erhitzte Hefe zeigt nach 20 Tagen keine Andeutung von Umwandlung; nicht vorbehandelte ist schon nach 14 Tagen um 10 Prozent umgewandelt. Bei Ameisensäure sind Unterschiede nicht erkennbar, da der Prozeß bei der obwaltenden Temperatur zu langsam vor sich geht; immerhin zeigten die Versuche der α - und β -Reihe eine willkommene Übereinstimmung in den Werten. Hinsichtlich des Verhaltens der Salz-, Schwefel- und Oxalsäure bei der α - und β -Reihe ist unverkennbar, daß der Beginn der Umwandlung bei dem nicht vorbehandelten Hefenmaterial schneller einsetzt als beim vorbehandelten. Daß nicht nur die Erhitzung der Hefe, sondern auch die der Erhitzung vorausgehende Operation des Zentrifugierens des Hefematerials (vgl. die 2. Versuchsreihe) einen hemmenden Einfluß auf die Umwandlung ausüben, läßt die 2. Versuchsreihe erkennen. Wie groß die verzögernde Wirkung der um etwa 1° niedrigeren Reaktionstemperatur von 22 bis 24° anzusetzen ist, ist unsicher, dürfte aber am Gesamtbilde nichts ändern. Auffallend ist noch, daß die nicht erhitzte Hefeprobe der 2. Versuchsreihe (α) nach 13 Tagen einer teilweisen Auflösung (kolloidalen) der Zellen durch Salzsäure entgegengeht; es müssen wohl in der käuflichen Preßhefe noch Stoffe enthalten sein, welche diese Auflösungserscheinung hintanhalten, jedoch durch Zentrifugieren mit destilliertem Wasser entfernt werden. Der Grund dafür, daß vorher erhitztes Material im Anfange der Säurewirkung langsamer umgewandelt wird als nicht erhitztes, ist vielleicht darin zu suchen, daß der Zellenleib (oder die Zellinhaltstoffe?) durch die kurz andauernde Erhitzung auf etwa 97° weniger durchlässig für Säuren geworden ist; ob durch eine Art von Koagulation, wie etwa nach Ansicht von Kruse und seinen Mitarbeitern, oder durch andere Prozesse, läßt sich nach vorliegendem Materiale noch nicht entscheiden. Bemerkenswert ist, daß solches erhitztes Material, wie die 1. Versuchsreihe lehrt, nach einer bestimmten Zeit der Säureeinwirkung eine Beschleunigung der

Umwandlung im Vergleich zur nicht erhitzten Probe erfährt: bei Schwefelsäure und Oxalsäure, bei denen man diesen Vorgang gut verfolgen kann, tritt die Beschleunigung nach etwa 20 bzw. 40 Tagen ein.

b) 3n-Salzsäure bei Temperaturen von 36°, 22 bis 24° und 8 bis 10° mit Hefemengen von 0·01 g und 0·1 g bei einer Säuremenge von 3 bis 4 cem für jeden Versuch.

Diese Versuche zeigten deutlich und einwandsfrei, daß die Geschwindigkeit der Umwandlung der gramfesten Hefe in gramfreie eine Funktion der Temperatur ist. Das andere Ziel, durch Änderung der Hefemengen die Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes bei diesem ohne Zweifel chemischen Prozesse zu prüfen, hat sich, wie es scheint, aus zwei Gründen nicht verwirklichen lassen. Zwar zeigen die Versuche mit den Hefemengen von 0·01 und 0·1 g ziemlich deutliche Unterschiede in dem Verhalten des Hefematerials; scheinbar tritt bei größeren Hefemengen eine Verlangsamung der Umwandlung ein; doch zwei Versuchsfehler können hieran Schuld haben: 1. bei größeren Hefemengen bildet sich ein dickerer Bodensatz, welcher dem Angriffe durch die Salzsäure weniger ausgiebig ausgesetzt ist als bei ganz geringen Hefemengen, wo der Bodensatz eine bessere und ungehindertere Angriffsfläche der Säure darbietet; 2. diese Fehlerquelle könnte auf einer Konzentrationsänderung beruhen, welche die benutzte Säure bei größeren Mengen Hefe durch deren höheren Wassergehalt erleidet. Gelegentlich eines anderen, gleichartigen Versuches nämlich wurde nach 9tägiger Einwirkung die Salzsäure (4n) von der gut abgesetzten Hefe ziemlich klar abpipettiert; die Titration mit 2n-KOH und Phenolphthalein als Indikator ergab eine schwache Abnahme des Titers: aus der 4n-Salzsäure war eine 3·97 n geworden. Die geringe Konzentrationsverminderung wird kaum zur Erklärung des bei den größeren Hefemengen erhaltenen Unterschiedes herangezogen werden können; die Unterschiede sind wohl mehr auf die unzuweckmäßige und verschiedene Verteilung des Bodenkörpers bei den Versuchen zurückzuführen. Der Titrationsversuch zeigt uns noch, daß es sehr wohl möglich und vielleicht auch praktisch sein dürfte, den Wassergehalt der Preßhefe auf diesem Wege zu bestimmen; man hätte nur statt der Salzsäure n-Schwefelsäure oder eine etwas schwächer dissoziierte organische Säure zu nehmen.

Vielleicht dürfte es zweckmäßig sein, bei solchen messenden Bestimmungen Dauerhefe von Albert-Buchner-Rapp zu verwenden, welche nach den Versuchen von R. und W. Albert gut gramfest ist; auf diese Arbeit wurde ich erst gegen Schluß vorliegender Arbeit bei der Darstellung des Buchner-schen Hefepreßsaftes aufmerksam.

II. Einwirkung von Salzsäure auf Diphtherie-, Pseudodiphtherie-, Subtilis-, Milzbrand- und Actinomycesbazillen.

Um festzustellen, ob außer Aureus, Mycoides und Hefe auch andere gramfeste Bakterien durch Säuren ihre Gramfestigkeit verlieren, wurden Diphtherie-, Pseudodiphtherie-, Subtilis-, Milzbrand- und Actinomycesbazillen auf ihr Verhalten gegen Salzsäure (2n und $\frac{1}{1}$), die nach den bisherigen Beobachtungen am stärksten wirkende Säure, geprüft.

Die Versuchsanordnung schließt sich der auf S. 248 geschilderten an, nur wenig ist dem zuzufügen. In den meisten Fällen wurde das Bakterienmaterial auf Agar übergeimpft, nur Diphtherie auf Löfflers Serum und Pseudodiphtherie auf Blutserum. Da Actinomyces ein schwaches Wachstum zeigt, mußten 10 Tage alte Kulturen benutzt werden; die Gramfärbbarkeit leidet zwar darunter; doch genügte das Material in seiner Beschaffenheit für diesen Zweck. Die Milzbrandkulturen (bezeichnet mit Nr. I, II und III) entstammten der Sammlung des Hygienischen Instituts, Nr. I und II waren ältere Kulturen, von Nr. III wurde durch einen Versuch die Virulenz festgestellt. Schließlich wäre noch zu bemerken, daß zu den Aufschwemmungen in Salzsäure nicht zentrifugiertes Material genommen wurde. — Die hierzu gehörige Tabelle ist weggelassen worden.

Die Ergebnisse lassen sich kurz dahin zusammenfassen, daß auch Diphtherie-, Pseudodiphtherie-, Subtilis-, Milzbrand- und Actinomycesbazillen durch 2n- bis $\frac{1}{1}$ -Salzsäure bei Temperaturen von 25 und 36° gramfrei werden. Der Verlauf dieser Umwandlung ist der gleiche wie bei Aureus, Mycoides und Hefe. Im einzelnen möge folgendes hervorgehoben werden. Eigenartig ist es, daß bei manchen Diphtheriebazillen nur Teile des Zelleibes ihre Gramfarbe einbüßen, wobei an Stelle derselben die Fuchsinfärbung einsetzt. Bei den drei Milzbrandstämmen lassen die Kontrollproben bereits Unterschiede im Färbungsvermögen erkennen. Obwohl die Stämme zweimal auf Agar übergeimpft waren, zeigen sie eine etwas verschieden starke Färbbarkeit, und zwar nimmt diese, wie es scheint, von Nr. I bis III zu; Nr. III, der virulente Stamm, ist am gleichmäßigsten nach Gram gefärbt, ein wenig schwächer Nr. II. Auf jeden Fall sind sie besser gramfest als Nr. I. In dem Verhalten von Nr. I und II gegen 2n-Salzsäure bei 25° macht sich gleichfalls ein Unterschied bemerkbar: unter sonst gleichen Versuchsbedingungen (also bei gleicher Säurekonzentration = 2n und bei gleicher Temperatur = 25°) ist der Stamm Nr. I nach 4 Tagen durch Salzsäure zum größten Teil gramfrei geworden, während bei Nr. II die Umwandlung nur bis etwa zur Hälfte vorgeschritten ist. Da die Aufschwemmung von Nr. III einer höheren Temperatur (36°) ausgesetzt war, so läßt die Verschiedenheit in

der Temperatur keinen Vergleich mit Nr. I und II in dem Verhalten gegen Salzsäure zu. Hervorzuheben ist noch, daß bei Stamm Nr. II nach 7tägiger Einwirkung der Salzsäure Differenzierungen im Innern der roten Fäden sichtbar wurden; sie machten sich durch Unterschiede in der Farbstärke bemerkbar.

Auch bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß nach einer gewissen Einwirkungszeit der Salzsäure ein großer Teil der Stäbchen und Fäden einer (wahrscheinlich kolloidalen) Auflösung entgegengehen; die Stäbchen und Fäden ballen sich hierbei nach Verlust ihrer Form zu mehr oder minder dichten gramfreien Häufchen zusammen.

Aus allem ergibt sich, daß Säuren bei geeigneter Stärke und Temperatur gramfeste Bakterien in gramfreie umwandeln, und daß die H-Ionen es sind, welchen diese Umwandlung zugeschrieben werden muß. Ob die Salzsäure in der Stärke der Umwandlung eine Ausnahmestellung gegenüber den anderen Säuren einnimmt, mag unerörtert bleiben. Nach allen Beobachtungen drängte sich mir die Vermutung auf, daß diesem Vorgange ein der Hydrolyse oder Verseifung von Estern, Anhydriden oder ähnlichen Verbindungen analoger Prozeß zugrunde liegen möchte. Darum erschien es angebracht, auch die OH-Ionenwirkung gegenüber den Bakterien zu prüfen.

III. Einwirkung von Alkalien auf *Aureus*, *Mycoides* und Hefe.

Um die OH-Ionenwirkung auf die Färbbarkeit dieser Bakterien nach Gram zu prüfen, wurden Kalilauge, Kalikarbonat, Natriumkarbonat und in einem Falle Ammoniak, alle in wässriger Lösung, für die Untersuchungen benutzt. Von den genannten Alkalien ist nur Kali eine starke Base, während die Alkalikarbonate und Ammoniak wesentlich geringere Mengen OH-Ionen besitzen. Das Bakterienmaterial kam wiederum in Form von Aufschwemmungen in Reagenzgläsern (und immer aus Jenenser Glase) zur Verwendung, nur Ammoniak wurde in einer kleinen, gutschließenden Glasstöpselflasche untersucht. Die Versuchsanordnung ist im allgemeinen die gleiche wie früher. Da die hierher gehörige Tabelle weggelassen worden ist, so sind zum besseren Verständnis des Folgenden einige wichtige Punkte der Versuchsanordnung mitzuteilen.

Färbemethode war: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute Alkohol tröpfeln.

Aureus

- + 0.1 n-Kalilauge (0.6 Proz.) bei 17°,
- + 0.18 n-Kalilauge (1 Proz.) bei 36°,
- + $\frac{1}{1}$ n-Kaliumkarbonat (6.9 Proz.) bei 17 und 25°,
- + $\frac{1}{1}$ n-Natriumkarbonat (10.6 Proz.) bei 17 und 25°,
- + 0.1 n-Natriumkarbonat (1.1 Proz.) bei 17 und 25°,
- + 5.9 n-Ammoniak (10 Proz.) bei 36°.

Mycoides

- + 0.04 n-Kalilauge (0.2 Proz.) bei 36°,
- + 0.1 n-Kalilauge (0.6 Proz.) bei 17°,
- + 0.18 n-Kalilauge (1 Proz.) bei 36°,
- + $\frac{1}{4}$ n-Kaliumkarbonat (6.9 Proz.) bei 17°.

Hefe

- + $\frac{1}{4}$ n-Kalilauge (1.4 Proz.) bei 17°,
- + 0.5 n-Kalilauge (2.8 Proz.) bei 17°,
- + $\frac{1}{4}$ n-Kaliumkarbonat (6.9 Proz.) bei 17 und 25°,
- + $\frac{1}{4}$ n-Natriumkarbonat (10.6 Proz.) bei 17 und 25°.

Das Ergebnis ist, daß auch Alkalien unter geeigneten Temperatur- und Konzentrationsbedingungen imstande sind, Aureus, Mycoides und Hefe gramfrei zu machen; die Konzentration der Lauge (KOH) darf, wie es scheint, unter ein gewisses Mindestmaß nicht heruntergehen, wenn man den Versuch von Mycoides mit 0.2prozentiger Kalilauge in Betracht zieht, wo Mycoides bei einer Versuchsdauer von 8 Tagen trotz der auf 36° erhöhten Temperatur nur recht wenig verändert wurde. Noch weniger beeinflußt wurde Aureus durch 0.6prozentige Lauge bei Zimmertemperatur und einer Dauer von 19 Tagen. Es ist wahrscheinlich, daß die Stärke der Konzentration, bei welcher Kalilauge noch einzuwirken vermag, ein wenig verschieden bei Aureus, Mycoides und Hefe sein wird, desgleichen die Höhe der angewandten Temperatur. Nach den Ausführungen auf S. 304 über die chemische Zusammensetzung der für die Gramfärbung maßgebenden Verbindungen ist anzunehmen, daß die Konzentration der Lauge im Verlaufe der Reaktion durch Bildung von Zersetzungsprodukten der Zellsubstanz geringer wird; ein Teil der KOH wird gebunden, wodurch die OH-Ionenkonzentration mehr oder weniger stark herabgemindert wird. Ein ähnliches Verhalten beobachten wir ja auch bei der Verseifung von Estern durch Lauge, wo die abgespaltene Säure die Lauge absättigt und sie so unwirksam macht.

Die Alkalikarbonate, wesentlich weniger in OH-Ionen gespalten als die Laugen, beeinflussen Aureus und Hefe unter den gleichen Versuchsbedingungen in verschiedener Weise. Während Aureus durch 1n-Soda- und -Pottaschelösung von 25° nach 37 bzw. 97 Tagen in seiner Gramfestigkeit nicht leidet, wird Hefe bei gleicher Behandlung nach 44 bis 45 Tagen fast völlig gramfrei. Erst eine 108tägige Einwirkung von $\frac{1}{4}$ -Sodalösung bei 25° scheint Aureus in seinem Gramverhalten etwas zu beeinflussen.

Der Gedanke liegt nahe anzunehmen, daß diese unterschiedliche Einwirkung auf einer verschieden großen Durchlässigkeit der Membran der Bakterien (oder auch ihres Zellinhaltes) beruhe. Demnach müßte die

Membran der Hefe durchlässiger sein als die von Aureus; dies ist wenig wahrscheinlich, da Aureus bei einer 49-, ja 97tägigen Einwirkung der $\frac{n}{1}$ -Pottaschelösung von 25° in seiner Gramfärbbarkeit nicht beeinflusst wurde. Daß es Inhaltstoffe der Bakterien sind, welche für die Erklärung des verschiedenartigen Einflusses der Alkalien und Alkalikarbonate herangezogen werden müssen, werden die weiteren Untersuchungen zeigen.

Schließlich ist die Wirkung des 5·9n-Ammoniaks¹ gegen Aureus bei 36° noch zu erörtern; sie ist trotz der ziemlich hohen Konzentration an $\text{NH}_3(\text{NH}_4\text{OH})$ schwächer als die der 0·18n-Kalilauge (1prozentige) bei 36°. Der Unterschied läßt sich durch den verschieden großen Gehalt an OH-Ionen erklären; wie weit freilich sekundäre Einflüsse durch Ammoniak, eine im Vergleiche zu KOH labilere Verbindung, mitspielen, möge dahingestellt bleiben.

IV. Einwirkung von Kalilauge auf Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand und Actinomyces.

Diese Versuche schließen sich in ihrer Anordnung den unter I. mitgeteilten an und sind zu dem Zwecke unternommen worden, die Wirkung von Kalilauge auch auf andere gramfeste Bakterien zu prüfen; eine so eingehende Untersuchung wie beim Abschnitte I lag nicht in unserer Absicht.

Das Bakterienmaterial wurde für diese Versuche vorher nicht zentrifugiert; die Färbemethode war: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute Alkohol tröpfeln; nur bei Actinomyces wurde der Alkohol $\frac{1}{2}$ Minute, ohne zu tröpfeln, auf dem Deckglas belassen (= je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln). Alle Proben säuerten wir bei der Entnahme schwach mit verdünnter Salzsäure an und zentrifugierten dann. An Stelle der hierher gehörigen Tabelle sei folgendes von der Versuchsanordnung mitgeteilt:

Diphtherie

- + 0·05 n-Kalilauge (0·25 Proz.) bei 20—25°,
- + 0·18 n-Kalilauge (1 Proz.) bei 36°.

Pseudo-Diphtherie

- + 0·18 n-Kalilauge (1 Proz.) bei 36°.

Subtilis

- + 0·04 n-Kalilauge (0·2 Proz.) bei 25°.

Milzbrand (Kult. Nr. II)

- + 0·04 n-Kalilauge (0·2 Proz.) bei 25°.

Actinomyces

- + 0·18 n-Kalilauge (1 Proz.) bei 36 und 0°.

¹ Ein anderer Versuch mit Ammoniak wurde unter Benutzung einer mit Korkstopfen verschlossenen Glasflasche an Stelle eines Glasstopfens ausgeführt und zwar mit dem gleichen Erfolge.

Die Versuche zeigen, daß 0·2- bis 1prozentige Kalilauge bei Temperaturen von etwa 25 und 36° die Bazillen von Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis und Milzbrand ziemlich unverändert läßt; bei Milzbrand ist selbst nach 19 Tagen und bei einer Temperatur von etwa 25° keine Wirkung durch 0·2prozentige KOH zu erkennen, nur Actinomyces, welcher freilich von Haus aus schon eine geringere Gramfestigkeit als die anderen Bakterien besaß (vgl. hierzu die Angaben auf S. 257), wurde durch 1prozentige Lauge bei 36° fast vollständig gramfrei. Die zum Vergleiche dienende Gegenprobe in destilliertem Wasser bei 0° zeigt klar, daß die Umwandlung des Aktinomyces der Wirkung des KOH im Verein mit der Temperatur von 36° zugeschrieben werden muß. Auffällig ist, daß Diphtherie und Pseudodiphtherie nach einer 12- bzw. 8tägigen Behandlung durch 1prozentige Kalilauge bei 36° kaum beeinflusst werden.¹ Wahrscheinlich werden sich bei einer eingehenderen Prüfung noch manche neue Beobachtungen ergeben. Vor allem wäre zu untersuchen, ob Erhöhung der Laugenkonzentration eine Umwandlung der Diphtherie-, Pseudodiphtherie, Subtilis- und Milzbrandbazillen in gramfreie herbeizuführen imstande ist (vgl. hierzu die Ausführungen auf S. 259).

Kurze Zusammenfassung der letzten Abschnitte.

Aus ihnen läßt sich folgendes ableiten. Da die OH-Ionen die gleiche Wirkung auf Hefe, Mycoides, Aureus und Actinomyces ausüben wie die H-Ionen, so erhielt die Annahme, daß esterartige oder diesen ähnlich zusammengesetzte Verbindungen an der Umwandlung der gramfesten Bakterien in gramfreie beteiligt sein müssen, eine weitere Stütze.

Nach den in den letzten Abschnitten mitgeteilten Versuchen schien es von Interesse zu sein, auch auf gramfreie Bakterien diese und andere Reagenzien einwirken zu lassen. In Rücksicht auf später (vgl. S. 291) mitzuteilende Versuche wurde der Colibacillus gewählt, welcher bekanntlich hin und wieder eine schwach ausgeprägte Gramfestigkeit zeigt; in einem Falle wurde noch gramfreie Hefe herangezogen.

¹ Es mag darauf hingewiesen werden, daß nach neueren Untersuchungen (u. a. Langer, *Chem. Zentralbl.* 1916. Bd. II. S. 192) es noch ungewiß ist, ob sich Diphtherie und Pseudodiphtherie durch ihr Verhalten bei der Gramfärbung unterscheiden lassen.

Verhalten gramfreier Kleinwesen.

I. Einwirkung von Salzsäure, Kalilauge und Alkohol auf Coli.

Die Versuchsanordnung ist im allgemeinen die schon beschriebene. Folgende Angaben sind an Stelle der weggelassenen Tabelle zu machen. Benutzt wurde zentrifugiertes Bakterienmaterial; Färbemethode: a) je 1 Minute und $\frac{3}{4}$ Minute ohne Tröpfeln; b) je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute Tröpfeln und c) je 1 Minute und 1 Minute ohne Tröpfeln. Das Ausgangsmaterial der einen Kultur war nach a) teils ziemlich gut gramfest, teils blaurot, teils rot, nach b) durchwegs rot; das Material zwei weiterer Kulturen verhielt sich nach Färbemethode c) folgendermaßen: 2. Ausgangsmaterial = zum größeren Teile rot und bläulichrot, zum kleineren Teile ziemlich gramfest; 3. Ausgangsmaterial = blaßrot, blaurot, rotblau und nur wenig gramfest.

Das zentrifugierte Bakterienmaterial wurde bei 36° und auch bei 25° mit 2n-, $\frac{n}{2}$ -Salzsäure, mit 0.09n-, 0.04n-, 0.02n-Kalilauge und mit 97prozentigem Alkohol bei 20 bis 25° angesetzt; die Dauer der Einwirkung wurde auf 3 Tage bis 3 Wochen ausgedehnt.

Die Versuche machen es wahrscheinlich, daß die Neigung des Coli-bacillus, sich zu einem Prozentsatze mehr oder weniger gramfest färben zu lassen, durch die Einwirkung von Salzsäure, Kalilauge bei einer Dauer von 3 bis 8 Tagen und von Alkohol (Dauer 3 Wochen) fast ganz zum Verschwinden gebracht werden kann. Es ist zu vermuten, daß die für die Gramfestigkeit des Coli maßgebenden Inhaltsstoffe durch Säure und durch Alkali chemisch verändert werden und zwar in ähnlicher Weise, wie es bei den gramfesten Bakterien geschieht. Hervorzuheben ist auch, daß in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kruse und seinen Mitarbeitern Coli durch 0.5prozentige Kalilauge (= 0.09n) bei 36° nach 12 Stunden fast völlig aufgelöst wurde.

II. Zur Einwirkung von Tanninlösungen auf gramfreie Hefe und Coli.

Wie schon erwähnt, hat Nikitine u. a. gefunden, daß Bakterien, welche durch Säuren oder Alkalien ihre Gramfestigkeit verloren hatten, bei einer einstündigen Behandlung derselben mit Löfflers Beize (also einer Fe-haltigen Tanninlösung) wieder gramfest würden. Nikitines Untersuchungen sind in den genannten Jahresberichten nur in aller Kürze wiedergegeben.

Zur Nachprüfung der Nikitineschen Versuche mit Löfflers Beize wurden Colibazillen und gramfreie Hefe benutzt; die Hefe war durch mehrtägige Einwirkung von 4n-Salzsäure bei 36° größtenteils gramfrei gemacht, worauf sie zur Entfernung der Salzsäure dreimal mit destilliertem Wasser zentrifugiert wurde. Die Colikultur wurde vor dem Versuche einmal mit destilliertem Wasser zentrifugiert. Zum Teil ließen wir Deckglasproben

eine festgesetzte Zeit in Löfflers Beize oder gesättigter Tanninlösung bei 36° vollständig eintauchen, zum Teil mischten wir das Bakterienmaterial selbst (Colibazillen) mit der gesättigten Tanninlösung und setzten diese Mischung eine gewisse Zeit der Temperatur 36° aus, worauf dreimal mit destilliertem Wasser zentrifugiert wurde; das Sediment wurde dann auf Deckgläser verteilt und wie die anderen Deckglasproben nach Gram gefärbt. An Einzelheiten bei der Versuchsanordnung mag noch folgendes erwähnt werden

Hefe (nahezu gramfrei). Die Einwirkungszeit von Löfflers Reagens wurde in dem einen Falle auf 3 Stunden, im anderen auf 4 Stunden ausgedehnt, jedesmal bei einer Temperatur von 36°.

Coli (zentrifugiert). Die Einwirkung von Löfflers Beize dauerte 5½ Stunden, die der gesättigten wässerigen Tanninlösung 8 Stunden, jedesmal bei 36°.

Färbemethode bei beiden Bakterienarten war: je 1 Minute und ½ Minute tröpfeln.

Wie aus den Versuchen hervorgeht, wurden die genannten Bakterien durch Tanninlösungen bei der geschilderten Anordnung nicht gramfest. Am maßgebendsten scheint mir der Versuch zu sein, wo Colibazillen direkt mit der Tanninlösung vermischt waren und mit derselben allseitig in Berührung kamen, was wohl bei einer Behandlung von Deckglasproben mit Tanninlösung nicht der Fall sein dürfte. Ungewiß bleibt es noch, ob dem Tannin eine positive Gramfärbbarkeit zukommt. Bei der üblichen Methode der Gramfärbung scheint das Tannin fast ganz vom Deckglase herausgelöst zu werden.

Nikitines Angaben über die Umwandlung gramfrei gewordener Bakterien in gramfeste durch Löfflers Beize treffen, soweit Coli und gramfreie Hefe in Frage kommen, demnach nicht zu.

Wenn uns die im vorstehenden niedergelegten Ergebnisse einen Einblick in das Wesen der Gramreaktion gebracht haben, so war es doch noch erforderlich, andere Reagenzien auf gramfeste Bakterien einwirken zu lassen. Besonders organische Lösungsmittel, wie Alkohol, Azeton, Benzol und ähnliche, haben in Hinblick auf ihr Lösungsvermögen von „Lipoiden“ in Bakterienleibern und weiterhin auch durch die Verwendung dieser Lösungsmittel in der Bakteriologie und verwandten Zweigen eine Bedeutung erlangt, welche eine umfassende und gründliche Durchforschung dieser Fragen verlangte; es war zunächst zu ermitteln, ob durch andere Reagenzien und Lösungsmittel außer Säuren und Alkalien die Gramfestigkeit von Bakterien beeinflusst wird, und welcher Art die Substanz ist, welche die Gramfestigkeit bedingt. Im Anschlusse hieran gab es dann einige andere Fragen zu erledigen, um unserem gesteckten Ziele näherzukommen.

I. Über die Einwirkung von organischen Lösungsmitteln, Chloralhydratlösungen und Wasser auf Hefe, Mycoides und Aureus bei verschiedenen Temperaturen.

Um den Einfluß von organischen Lösungsmitteln usw. auf Bakterien zu ermitteln, wurden diese 1. in Form von Aufschwemmungen, 2. von Deckglaspräparaten untersucht, welche, wie auf S. 246 erwähnt, hergestellt waren. Bei Aufschwemmungen wurden in vielen Fällen das Lösungsmittel wie Essigester, Chloroform, Benzin, Toluol nicht unverdünnt hinzugegeben, sondern wir schüttelten das Bakterienmaterial zuerst mit etwas Alkohol an und fügten dann das betreffende Lösungsmittel zu. Hierdurch sollte nach Möglichkeit die Bildung von Bakterienklümpchen vermieden werden. In manchen Fällen wurde eine Verdünnung mit Alkohol nicht vorgenommen, um die Wirkung des unverdünnten Lösungsmittels besser hervortreten zu lassen. Diejenigen Versuche, bei denen man die Erhitzung auf 65° und höher gehen ließ, wurden in sogen. Azetylierungskölbchen¹ vorgenommen. Diese eiförmigen Glaskölbchen mit eingeschliffenem Steigrohr eignen sich — besonders in verkleinertem Maßstabe — recht gut für diese Art von Versuchen. Wurde das Bakterienmaterial in Form von Aufschwemmung hierbei benutzt, so blieb nach dem Erhitzen fast regelmäßig ein Teil der Bakterienmasse an der Glaswandung des sich verjüngenden Endes des Eikölbchens fest haften, während der andere Teil in der Flüssigkeit aufgeschwimmt blieb. Deshalb sind die Bezeichnungen im folgenden „Satz, Rand“ so zu verstehen, daß dasjenige Bakterienmaterial, welches aufgeschwimmt blieb, kurz als „Satz“, das, was an den seitlichen Gefäßwandungen haftete, kurz als „Rand“ benannt wurde. Von den Deckglasproben wurde immer nur eine in jedem Eikölbchen erhitzt.

Betreffs der Herstellung der Deckglaspräparate ist dem früher Gesagten nichts hinzuzufügen. Nach der Behandlung mit dem Lösungsmittel wurden die Reste desselben, falls sie flüchtig waren, im Vakuumexsikkator über CaCl_2 entfernt, Anilin dagegen durch 2 prozentige Salzsäure und darauffolgende Wasserspülung und Tetrachloräthylen durch vorsichtige Wasserspülung.²

Die Aufschwemmungen wurden entweder einmal zentrifugiert oder es wurde eine Probe ohne weiteres auf ein Deckglas gebracht, angetrocknet und je nach Beschaffenheit des angewandten Lösungsmittels, wie oben angegeben, behandelt; mit dem Zentrifugat wurde in der gleichen Weise verfahren. Die Aufschwemmungen in Chloralhydratlösung wurden vor der Herstellung von Deckglaspräparaten jedesmal erst mit Alkohol und darauf mit Wasser zentrifugiert. Die Glasgefäße der bei 36° angesetzten Proben waren statt mit Kork mit eingeriebenem Glasstopfen versehen, damit nicht Spuren von Extraktivstoffen der Korksubstanz die Reaktionsflüssigkeit verunreinigten. Von den Chloralhydratlösungen kamen nur frisch dargestellte zur Anwendung; Anilin wurde vor dem Gebrauche frisch destilliert, des-

¹ Vgl. z. B. die Figur in Gildemeister-Hofmann, *Ätherische Öle*. 1910. Bd. I. S. 594.

² Für diese Versuche wurde nur Luftbad benutzt, nie direkte Feuerung.

gleichen Tetrachloräthylen (Kahlbaumsches Präparat) durch fraktionierte Destillation unter den hier gegebenen Vorsichtsmaßregeln: Siedepunkt 121°.

An Stelle der fortgelassenen, sehr umfangreichen Tabelle mag folgendes hieraus mitgeteilt werden. An Lösungsmitteln kamen zur Anwendung: 67prozentige wässerige und wässrig-alkoholische Chloralhydratlösung, Alkohol und Azeton in verschiedenen Stärken, Essigester, Chloroform, Benzin (Siedetemp. 90 bis 110°), Toluol, Anilin und Wasser nur bei der Temperatur von 97 bis 98° (d. i. Temperatur des Gefäßinhaltes in siedendem Wasserbade). Die Deckglasproben wurden vor dem Färben, wie schon angegeben, nicht fixiert, nur in einigen besonders vermerkten Fällen wurde das Deckglas durch die kleine oder auch durch die volle Bunsenflamme vorsichtig fixiert. Lösungsmittel wie Alkohol, Azeton, Essigester, Chloroform wurden bei mehrstündiger Erhitzung in manchen Fällen erneuert. Die Färbemethode war überall: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln. Die bei den im folgenden kurz wiedergegebenen Versuchen angewandte Temperatur wechselte je nach Bedarf von Zimmertemperatur (etwa 17°) bis 90° (bei Benzin), 97° (bei Wasser) 70 bis 98° (bei Toluol) und in einem Falle bis 119° (bei Tetrachloräthylen).

1. Hefe (in Form von Aufschwemmungen).

67prozentige wässerige Chloralhydratlösung ruft keine Veränderung weder bei Zimmer- (Dauer 6 Tage) noch bei Brutschranktemperatur (Dauer 12 Stunden) hervor; daß nach der Chloralhydratbehandlung sich eine Probe beim Erhitzen mit Alkohol auf 85° gramfrei verhält, ist einzig und allein auf die HCl-Wirkung zurückzuführen. Übrigens haftet bei längerer Einwirkung die Salzsäure der Hefezelle bzw. deren Eiweißverbindungen ziemlich fest an.

Alkohol sowohl wie Azeton (in 60prozent. Lösungen) wirken bei einer Dauer von 23 Tagen und einer Temperatur von 25° nicht ein. 60prozent. und stärkerer Alkohol hydrolysiert oder spaltet beim Erhitzen der Hefe auf 85 bis 95° die für die Gramfärbung in Betracht kommende Eiweißverbindung erst dann, wenn die Zellmembran durchlässiger geworden ist. Aus diesen Versuchen geht auch hervor, daß die Membran heißem Alkohol großen Widerstand entgegensetzt; wässriger Alkohol scheint wirksamer zu sein als 99prozentiger. Azeton (etwa 100 Prozent) ist schwächer, als Alkohol unter gleichen Bedingungen, freilich der niedrigere Siedepunkt des Azetons (65°) wird hierbei auch von Belang sein. Ähnlich verhält sich heißer Essigester (75°), am kräftigsten wirkt aber Wasser von 96 bis 97°; auch hier wird die Höhe der Temperatur mit eine Rolle bei der Zersetzung der Zellsubstanz spielen. — Einen deutlichen Unterschied zeigen Chloroform, Benzin, Toluol bei höherer Temperatur (65 bis 90°); der Einfluß dieser heißen Lösungsmittel auf die Hefezelle ist nur ein geringer, vielleicht ist er nur auf Rechnung des zur Verteilung des Bakterienmaterials beigegebenen Alkohols zu setzen.

Die obigen Versuche mit Alkohol, Azeton, Essigester und Wasser bei den Temperaturen von 65 bis 97° machen die Annahme wahrscheinlich, daß die OH-Gruppe oder eine dieser analog zusammengesetzte Atomgruppe im Molekül dieser Lösungsmittel die Veränderung der Zellensubstanz bedingen. Beim Azeton könnte man annehmen, daß sich die Ketogruppe bis zu einem gewissen Prozentsatze in die Enolform umlagert: $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3 \rightleftharpoons \text{CH}_2=\text{C(OH)-CH}_3$. Beim Essigester ist keine freie OH-Gruppe im Molekül vorhanden, das H-Atom ist hier durch das Säureradikal CH_3CO^- ersetzt; dieser substituierten Hydroxylgruppe wäre die erwähnte Wirkung zuzuschreiben. Eine Stütze findet diese Annahme in dem Verhalten von Chloroform, Benzin, Toluol; es sind das Lösungsmittel, die keine Hydroxylgruppe oder analog zusammengesetzte Atomgruppe enthalten. Diese Beobachtung erinnert an eine nicht sehr bekannte Tatsache, daß bestimmte Klassen von chemischen Verbindungen (z. B. Nitrate) sich nur in solchen Lösungsmitteln bequem lösen, welche im Molekül eine OH-Gruppe besitzen oder wo der Wasserstoff der Hydroxylgruppe durch ein Säure- oder Alkoholradikal ersetzt ist. So z. B. löst sich das Uranyl nitrat $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ 6aq. in Wasser, Methyl-, Äthyl-, Amylalkohol, Glycerin, Äther, Essigester, Amylenhydrat, Amylnitrit, Amylazetat, Phenol und Azeton mehr oder weniger reichlich, unlöslich dagegen ist es in Benzin, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Toluol, Terpentinöl (Deuben).

Deckglaspräparate.

Die Versuche bei höherer Temperatur mit Alkohol, Azeton, Essigester und Benzol haben nach einer anderen Richtung als die eben besprochenen Versuche eine Bedeutung. Es wurden nämlich Deckglaspräparate benutzt, welche entweder unfixiert (d. h. getrocknet im Vakuumexsikkator) oder in der üblichen Weise fixiert waren (durch dreimaliges kurzes Durchziehen des Gläschens durch die Bunsenflamme). Deutlich zeigt sich hier der Einfluß der Fixierungsmethode auf den Ausfall der Gramreaktion, besonders tritt dies beim Alkohol zutage. Ohne Zweifel wird man bei der Ausführung dieser Reaktion die einwandfreiesten und sichersten Ergebnisse erhalten, wenn man ein Erwärmen der luftgetrockneten Deckglaspräparate unterläßt. Nach meinen Beobachtungen trifft dies nicht nur für Hefe zu, sondern auch für *Aureus* und *Mycoides*. — Die Versuche mit Toluol und Anilin zeigen folgendes. Toluol gehört chemisch zu den sog. indifferenten Lösungsmitteln, Anilin der Amingruppe wegen zu den differenten. Die Toluolprobe wurde auf 99° erhitzt; es ergab sich hierbei, daß, obwohl das Präparat ohne Anwendung von Wärme, nur durch Aufbewahrung im Vakuumexsikkator fixiert worden war, ein großer Teil der Hefezellen die Gramfestigkeit ver-

loren hat. Es ist dies wohl nur auf die Höhe der Erhitzung zurückzuführen. Daß Anilin bei einer Temperatur von 80° verändernd auf die Hefezelle wirkt, schreibe ich dem basischen Charakter der NH_2 -Gruppe zu. — Die Versuche bei Brutschranktemperatur (36°) mit Azeton, Chloroform und Toluol sind mit Rücksicht auf die Reichertschen unternommen worden. Im Gegensatz zu den Reichertschen Ergebnissen tritt eine Änderung in der Gramfärbung bei trocknen Deckglaspräparaten, wie sie durch Stehen im Vakuumexsikkator erhalten werden, nicht ein. Eingehend wird die Reichertsche Arbeit im nächsten Kapitel besprochen werden.

2. Mycoides (in Form von Aufschwemmungen).

Durch 67prozent. wässrige Chloralhydratlösung bei Zimmertemperatur wird der Bacillus nur wenig in der Gramfärbung beeinflusst; bei 10tägiger und längerer Behandlung mit diesem mikroskopisch wichtigen Lösungsmittel bleibt im allgemeinen wohl die Gramfarbe bestehen, jedoch in der Form der Stäbchen tritt eine auffallende Änderung ein: die Stäbchen sind perlschnurartig angeordnet. Es hat den Anschein, als ob aus dem Bakterienleibe Zellsubstanz zonenartig herausgelöst sei. Daß eine Herauslösung von Bakteriensubstanz durch Chloralhydrat stattfinden kann, wird durch die interessanten, schon angeführten Versuche von Mauch wahrscheinlich gemacht; er fand, daß 60- und stärkerprozentige Chloralhydratlösungen im Wasser und in Alkohol ein gutes Lösungsmittel für viele organische Verbindungen sind, wie Glykoside, Alkaloide, Bitterstoffe, die meisten Harze, Zuckerarten, Dextrine, Gummiarten, Gelatine, Keratin, Stärke, Eiweißarten, weniger löslich sind die flüssigen und festen Fette. — Für die Versuche bei höherer Temperatur wurden nur Alkohol, Azeton, Essigester und Wasser benutzt. Die Wirkung dieser Lösungsmittel ist im allgemeinen die gleiche wie die bei der Hefe beobachtete. Alkohol und Azeton, besonders in wässriger Verdünnung, verändern den Mycoides schneller als Hefe unter ähnlichen Bedingungen. Länger als 1 Stunde andauerndes Erhitzen des Mycoides mit Wasser von 97° beeinträchtigt seine Gramfestigkeit.

Deckglaspräparate.

Für die Versuche bei Temperaturen von 75 bis 98° fanden Alkohol, Essigester, Benzol, Toluol, Anilin und Tetrachloräthylen Verwendung. Sieht man hierbei von den chemisch differenten Lösungsmitteln Anilin und Tetrachloräthylen ab, so ist bei den nicht fixierten Proben kein Unterschied in der Wirkung der einzelnen Lösungsmittel erkennbar, viel deutlicher tritt die Art des Fixierens der Deckglaspräparate in den Vordergrund.

Wie bei der Hefe, so zeigt es sich auch hier, daß ein Trocknen der Gläschen im Vakuumexsikkator die sichersten Ergebnisse liefert. Bei der auf 98° erhitzten, nicht fixierten Toluolprobe ist ein Einfluß der hohen Erhitzung bemerkbar, wenn auch nicht in demselben Grade, wie es das Toluol-Hefepreparat zeigt. Im Anilin und Tetrachloräthylen haben wir 2 entgegengesetzte Vertreter von Lösungsmitteln: Anilin ist schwach basischer Natur, Tetrachloräthylen dadurch ausgezeichnet, bei Spuren von Feuchtigkeit Salzsäure abzuspalten. Die glatte Wirkung dieses letzteren Lösungsmittels bei *Mycoides* ist einzig und allein auf die abgespaltene Salzsäure zurückzuführen; eine etwas geringere Umwandlung der Stäbchen beobachten wir beim Anilinpräparate. — Die Versuche bei Brutschranktemperatur wurden mit Deckglaspräparaten ausgeführt, welche durch eine kleine Bunsenflamme vorsichtig fixiert worden waren. Bis auf die Tetrachloräthylen- und Anilinprobe war eine wesentliche Änderung in der Gramfärbung nicht festzustellen. Tetrachloräthylen wirkte durch Abspaltung von Salzsäure, während Anilin (bei 36°) eine geringere Umwandlung der Stäbchen hervorrief als bei höherer Temperatur. Die Azetonversuche lehren uns, daß der Korksubstanz durch Azetondämpfe Stoffe entzogen werden können, welche den Ausfall der Gramreaktion stark beeinflussen.

3. Aureus (in Form von Aufschwemmungen).

Die Versuche lehren, daß Alkohol und Azeton bei den Temperaturen 17 bis 25° und einer Dauer von 2 bis 3 Wochen Aureus mehr oder weniger gramfrei machen, dagegen nicht 67prozent. alkoholische Chloralhydratlösung und das Gemisch von Chloroform mit verdünntem Alkohol; es hat den Anschein, als ob Aureuskulturen gegen Alkohol und Azeton manchmal widerstandsfähiger sind, manchmal weniger durch diese Lösungsmittel beeinflusst werden, eine ähnliche Beobachtung hat auch Patzschke gemacht. Bei erhöhter Temperatur, 65 bis 85°, wirken Alkohol und Azeton naturgemäß noch schneller; der Einfluß des Wassergehaltes des Alkohols macht sich wie bei den analogen Versuchen mit *Mycoides* auch hier bemerkbar: 60prozent. Alkohol wirkt energischer als 96prozent. Auffallend widerstandskräftig ist Aureus gegen Wasser von 98°, 1½stündiges Erhitzen ändert nichts an dem normalen Ausfall der Gramreaktion, während Hefe und *Mycoides* bei gleicher Behandlungsweise in ihrer Gramfestigkeit geschädigt werden.

Deckglasproben.

Von Lösungsmitteln für die Versuche bei Temperaturen von 65° und höher wurden benutzt: Alkohol, Essigester, Chloroform, Tetrachloräthylen,

Benzol, Toluol und Anilin. Alle, mit Ausnahme von Alkohol und Toluol, beeinflussen chemisch die Zellstoffe unter den angegebenen Bedingungen nicht. Alkohol wirkt bei einer Versuchsdauer von mindestens 4 Stunden ein, in geringerem Maße Toluol von 98°; übrigens wurden Hefezellen, wie schon erwähnt, durch so hoch erhitztes Toluol stärker angegriffen. Nach allem verhält sich *Aureus* etwas widerstandsfähiger als Hefe und *Mycoides* bei gleicher Versuchsanordnung. — Azeton, Essigester, Chloroform, Toluol, Anilin und Tetrachloräthylen bei Brutschranktemperatur (36°) beeinflussen mit Ausnahme von Tetrachloräthylen die Gramfestigkeit der Kokken nicht im geringsten. Daß diese durch Tetrachloräthylen gramfrei werden, ist auf die Abspaltung von HCl bei der 4tägigen Einwirkung zurückzuführen; durch den Glasstöpselverschluß wird die sich abspaltende Salzsäure in dem benutzten Glasgefäße zum größeren Teile zurückgehalten und wirkt so auf die für die Gramfärbung maßgebenden Inhaltsstoffe der Kokken allmählich ein, jedoch langsamer, als es bei *Mycoides* der Fall ist.¹

II. Zur Reichertschen Arbeit „Beiträge zur Gramfärbung“.

Die im vorigen Abschnitte mit Hefe, *Mycoides* und *Aureus* angestellten Versuche bei 36° wurden, wie schon erwähnt, in Hinblick auf die Reichertschen Untersuchungen vorgenommen; seine Versuchsanordnung bestand darin, daß er das Bakterienmaterial. (Milzbrand- und Diphtheriebazillen) mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung scharf zentrifugierte und das Zentrifugat feucht mit organischen Lösungsmitteln (Xylol, Benzin, Benzol, Azeton, Tetrachloräthylen, Anilin u. an) in Spitzgläsern, mit Gummistopfen verschlossen, 4 (bis 10) Tage bei 36° stehen ließ. Bei der Ausführung der Gramreaktion nahm er an Stelle von Alkohol ein Gemisch von Azeton und Alkohol, zum Nachfärben ebenfalls Fuchsinlösung. Die Reichertschen Tabellen über die Wirkung genannter Lösungsmittel auf Milzbrand- und Diphtheriebazillen zeigen, daß diese Bakterien durch 4-tägige Behandlung bei 37° mit Azeton, Anilin, Benzin, Benzol, Xylol und Tetrachloräthylen mehr oder weniger gramfrei wurden; Staphylokokken, mit Xylol, Anilin, Benzin, Tetrachloräthylen 4 Tage bei 37° behandelt, verloren gleichfalls ihre Gramfestigkeit. Den Tuberkelbacillus gramfrei zu machen, gelang Reichert nur mittels Tetrachloräthylens bei 10-tägiger Bebrütung; Xylol, Benzin, Benzol und Anilin ließen diesen *Bacillus* unverändert — in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Aronson.

Die Reichertschen Schlußfolgerungen mögen kurz zusammengestellt werden.

Der Verlust der Gramfestigkeit beruht nach ihm auf der Extraktion von Lipoiden durch organische Lösungsmittel. Die für die Gramfärbung

¹ An dieser Stelle möge darauf hingewiesen werden, daß Tetrachloräthylen für derartige Versuche das ungünstigste Lösungsmittel ist.

in Betracht kommende Substanz, meint Reichert, sei ein bei verschiedenen Pilzarten wechselndes Gemisch von Lipoiden; die Gramfarbe sei als eine Bindung von Amidophenylmethanen an Lipoiden gewisser Bakterien unter Vermittlung des Jods zu betrachten, die Bindung des Jods mit Amidophenylmethan und Lipoid sei so fest, daß sie durch Säure oder Alkohol nicht gelöst werde, ganz im Gegensatz zu der Auffassung von Unna, der annimmt, daß Jod hierbei keine Verbindung mit dem Substrat eingeht. Reichert ist der Ansicht, daß es ihm gelungen sei, rein färberisch eine Reihe von Tatsachen aufzufinden, welche einerseits die physikalischen Erklärungen, besonders die Eisenbergs¹, unhaltbar, andererseits eine chemische Bindung des Farbstoffes als höchst wahrscheinlich machen.

Reichert benutzte, wie ersichtlich, für seine Untersuchungen wasserhaltiges (feuchtes) Bakterienmaterial bei einer Temperatur von 37°. Das anhaftende Wasser wird hierbei von den angewandten Lösungsmitteln Xylol, Benzol, Benzin, Anilin nicht oder nur spurenweise gelöst, ausgenommen Azeton und Tetrachloräthylen. Azeton wird zu einer schwach wasser- und kochsalzhaltigen Flüssigkeit, während Tetrachloräthylen CCl_2 \parallel CCl_2

mit dem vorhandenen Wasser Salzsäure in geringen Mengen bildet und so als HCl-haltiges Tetrachloräthylen zu betrachten ist. Sieht man zunächst von den beiden Fällen mit Azeton und Tetrachloräthylen ab, so ist bezüglich der Reichertschen Versuchsanordnung darauf hinzuweisen, daß derartige Versuche mit feuchtem Bakterienmaterial nach den Erfahrungen von W. Kruse Veranlassung zu autolytischen Prozessen geben, welche Gramfreiheit vortäuschen können. Die in dieser Arbeit mitgeteilten Ergebnisse sprechen zugunsten dieser Vermutung. Eine Extraktion (ein Herauslösen) von Lipoiden oder ähnlichen Verbindungen aus der Bakterienzelle durch organische Lösungsmittel findet nicht statt, sondern die für die Gramfestigkeit in Betracht kommenden Verbindungen werden chemisch gespalten; daß hierbei lipoidartige Verbindungen frei werden, ist nicht unwahrscheinlich. Diese Spaltung kann sowohl durch Säuren und Alkali als auch durch Lösungsmittel erfolgen, welche eine Hydroxylgruppe oder analog zusammengesetzte Atomgruppe besitzen. Die von Reichert durch Azeton herbeigeführte Umwandlung des Milzbrand- und Diphtheriebacillus bedarf einer Nachprüfung. Daß HCl-haltiges Tetrachloräthylen gramfeste Bakterien in gramfreie umwandeln kann, ist nach allem bisher Gesagten erklärlich.

Die Ergebnisse, welche Reichert bei der Behandlung von feuchtem Bakterienmaterial mit organischen Lösungsmitteln bei 37° erhalten hatte,

¹ Nach E. beruht die Gramfestigkeit auf der größeren Dichtigkeit des „Ektoplasmas“, welches die großen Jodfarbstoffmoleküle zurückhalten soll.

gaben die Veranlassung, das Verhalten gramfester Bakterien bei der Selbstverdauung und einigen anderen Vorgängen zu prüfen, unter besonderer Berücksichtigung des Ausfalles der Gramreaktion hierbei.

Über Verdauungserscheinungen gramfester Kleinwesen.

1. Aureus, Mycoides und Hefe.

Wie in der Einleitung bereits angedeutet, stellte W. Kruse anfänglich allein, dann in Gemeinschaft mit Bürgers, Schermann und Schreiber vergleichende Untersuchungen über die morphologischen Verhältnisse bei der Selbstverdauung bestimmter Bakterien an; sie setzten gleichstark trübe Aufschwemmungen frischer Agarkulturen in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von wenig Chloroform oder Toluol der Brutschranktemperatur von 37° aus. Sie beobachteten, daß nach 24 bis 48 Stunden Staphylokokken und Megatherium (gramfeste Bakterien) makro- und mikroskopisch keine Veränderung in Form von Färbbarkeit zeigten; umgekehrt klärten sich die Aufschwemmungen von Pseudodysenterie, Typhus-, Paratyphus- und Pneumoniebazillen mehr oder weniger auf, die Bazillen färbten sich schlechter. Die Aufhellung führte bisweilen bis zur völligen Lösung der Bakterien. Wurden sie jedoch vorher auf 60 bis 100° erhitzt oder bei niedriger Temperatur gehalten, so konnten Aufklärungserscheinungen gar nicht oder nur in geringen Grade nachgewiesen werden. Als wichtigste Ursache für diese Erscheinungen nimmt Kruse eine Zerstörung oder Schädigung der Enzyme der Selbstverdauung durch die hohe Temperatur an. Bürgers, Schermann und Schreiber setzten Kruses Untersuchungen fort; sie ließen auf eine große Anzahl Bakterien Lösungen von Kochsalz, Trypsin, Pepsinsalzsäure, ferner Kalilauge und Salzsäure bei 37° unter Zusatz von wenig Chloroform einwirken. Die Versuche mit physiologischer Kochsalzlösung ergaben eine mehr oder minder starke Aufhellung der Aufschwemmungen bei der größeren Anzahl der untersuchten Bakterien (auch des gramfesten Milzbrandbacillus) mit Ausnahme der gramfesten Staphylokokken, Streptokokken, Schimmelpilze, Hefe und von Megatherium. Erhitzt zeigten die Bakterien keinerlei Auflösungserscheinungen, nur Meningokokken und Milzbrandbazillen lösten sich trotz vorhergegangener Erhitzung des Materials auf 60 bzw. 60 bis 80° etwas auf. Bei der Trypsinverdauung wurden die gramfreien Bakterien mehr oder weniger stark gelöst, dagegen nicht die gramfesten, ausgenommen Pneumokokken, Milzbrand und Actinomyces. Oftmals ist die Verdauung schwächer bei den auf 60° erhitzten gramfreien Bakterien als bei den auf 100°. Hinsichtlich der Erklärung dieser auffallenden Erscheinung schließen sich Bürgers, Schermann und Schreiber der Auffassung Kruses an, daß „die Erhitzung auf 60° das Protoplasma der Bakterien (durch Gerinnung?) in einen schwerlöslichen Zustand versetzt, während stärkere Erhitzung denselben wieder beseitigt.“

Von Pepsin-Salzsäure (Pepsin und Salzsäure in je 1 Prozent. Lösung) wurden die Bakterien gar nicht oder nur ganz wenig angegriffen; auch hier machten sich wieder Unterschiede zwischen gramfesten und gramfreien Bak-

terien bemerkbar. Die Auflösungserscheinungen bei Gegenwart von Salzsäure allein und von Kalilauge waren folgende. 1 Prozent Salzsäure übt keinen oder nur ganz geringen Einfluß auf die Bakterien aus, 10 Prozent einen wesentlich größeren bei *Staphylococcus alb.* und *aur.*, *Penicillium glaucum* und *Actinomyces*, bei anderen wieder weniger. Der Erfolg war bei Anwendung von 25 Prozent Salzsäure nicht größer; gramfeste und gramfreie Bakterien zeigten hier kein unterschiedliches Verhalten. Anders verhielt es sich mit der Einwirkung von 1 bis 10 Prozent Kalilauge. In 10 Prozent Lauge lösten sich alle Bakterien mehr oder weniger völlig auf; dagegen zeigten die gramfesten und -freien Bakterien gegen 1 Prozent Kalilauge ein verschiedenes Verhalten: die gramfreien, vorher nicht erhitzt, wurden gelöst, die gramfesten wenig oder gar nicht. Wichtig ist das Verhalten der gramfreien Bakterien, wenn sie vorher auf 60 bis 100° oder nicht erhitzt waren: am schwächsten war die Auflösung der auf 100° vorher erhitzten Organismen, etwas stärker bei den auf 60° und am stärksten bei den nicht erhitzten. Bürgers, Schermann und Schreiber werfen hierbei die Frage auf, ob nicht diese Lösungserscheinungen bei 1 Prozent Kalilauge auf die Wirkung von Fermenten zurückzuführen sei. Eine Entscheidung dieser Frage wird nicht gegeben.

An diese Versuche reihen sich die von Jobling und Petersen, welche mehrere Bakterienarten u. a. auf ihre Verdauung mittels Trypsins prüften; sie fanden, daß der Gehalt an „ungesättigten“ Lipoiden (das sind Lipide, welche einen mehr oder weniger hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweisen) dem Widerstande der Bakterien bei der tryptischen Verdauung proportional sei. Folgende Tabelle geben Jobling und Petersen zur Veranschaulichung des Gesagten:

	Lipoidgehalt	Jodzahl	Verdauung
	Proz.	Proz.	Proz.
Diphtheriebazillen	7	80	18
Staphylokokken	8	60	23
Typhusbazillen	8	30	24
Typhusbazillen, extrahiert	—	—	56
Colibazillen	4	40	40
Tuberkelbazillen, extrahiert ¹	7	20	40

Die von mir mit gramfesten Bakterien angestellten Versuche waren im wesentlichen so angeordnet, wie die von Bürgers; es wurden Aufschwemmungen von frischen Agarkulturen in physiologischer Kochsalzlösung oder in destilliertem Wasser hergestellt, und von diesen Aufschwemmungen wurde je 1 ccm mit 1 ccm folgender wässriger Flüssigkeiten vermischt: destilliertem Wasser, physiologischer Kochsalz-, Trypsin-, Pepsin-Salzsäure-Traubenzuckerlösung², Salzsäure und Kalilauge (je nach Bedarf Toluolzusatz). Die gleichmäßig stark getrubten Bakterienaufschwemmungen kamen in gut gereinigte, nicht

¹ Nacheinander mit Äther, Chloroform und Alkohol ausgesogen.

² Bei den Versuchen mit dieser Lösung fand ein Zusatz von 2 Tropfen Toluol statt.

sterilisierte Reagenzgläser, welche, durch Korkstopfen verschlossen, der Temperatur von 36°, in einigen Fällen bei 25° und bei Zimmertemperatur angesetzt wurden; Kontrollproben wurden bei 8° bzw. 0° gehalten. Die Trypsinlösung (unter Zusatz von wenig Soda hergestellt) war 1 Prozent, Pepsin wurde je 2 Prozent in 2 Prozent. Salzsäure gelöst, Traubenzucker ebenfalls zu 2 Prozent. Der Gehalt an diesen gelösten Stoffen war bei den Versuchen selbst durch die vorgenommene Verdünnung auf die Hälfte herabgesetzt. Die Bakterienaufschwemmungen wurden nicht nur auf ihre Trübungsverhältnisse untersucht, sondern auch auf die Gramfärbung der abgeschiedenen Bakterien; außerdem prüften wir in einigen Fällen, wie sich Schrägagarkulturen, die bei Zimmertemperatur oder bei 36° mit oder ohne Zusatz von Toluol einige Tage aufbewahrt wurden, in ihrem Gramverhalten änderten. Von Bakterien wurden eingehender Aureus, Mycoides und Hefe untersucht, weniger eingehend Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand (Kultur Nr. II, s. S. 257) und Actinomyces. Mit der Färbemethode wurde oftmals gewechselt, besonders bei Aureus, Mycoides und Hefe, wo neben der Tröpfelmethode (je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln und in 2 Fällen bei Aureus und Hefe, die je 1 Minute und 2 Minuten tröpfeln) vergleichsweise die sonst übliche (je 1 Minute ohne Tröpfeln) angewendet wurde; bei Diphtherie, Pseudodiphtherie und Milzbrand wurde nach Methode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln verfahren, bei Actinomyces nach Methode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln und bei Subtilis nach der üblichen (je 1 Minute ohne Tröpfeln).

Im folgenden wird an Stelle der weggelassenen Tabellen eine Übersicht über die Ergebnisse obiger Versuche gegeben.

Aureus.

Vor allen gramfesten Bakterien zeigt Aureus die Eigentümlichkeit, unter den oben angegebenen Bedingungen nach Verlauf von mehreren Tagen teilweise oder sogar ganz in kolloidale Lösung zu gehen; Alkoholzusatz und darauf folgendes anhaltendes Zentrifugieren der opalisierenden Flüssigkeit hatte nur geringeren oder gar keinen Erfolg. Es zeigte sich hier, wie schon früher (s. S. 249), daß die mit physiologischer Kochsalz- und Pepsin-Salzsäurelösung erzielten Ergebnisse ein unklares, ja falsches Bild lieferten. Der einzige Weg, welcher in diesen Fällen zum Ziele führte, war, daß man bei der Entnahme der Proben dieselben ohne weitere Vorbehandlung sofort auf das Deckglas brachte und nach dem Trocknen an der Luft das Präparat mit etwas Wasser abspülte und dann erst färbte. Für die Versuche mit Kochsalz, Pepsin-Salzsäure und auch mit Salzsäure allein scheint diese Wasserspülung erforderlich zu sein; auch bei anderer Gelegenheit (s. S. 293) zeigte es sich, daß die Sicherheit der Gramfärbung mehr oder weniger leidet, wenn geringe Mengen von NaCl oder HCl dem Deckglaspräparate noch anhaften. — Die Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung, Trypsin

und Pepsin-Salzsäure bei 36° läßt sich dahin zusammenfassen, daß Aureus nach 2 Tagen durch NaCl zum großen Teil in seiner Gramfestigkeit geschädigt wird; nach 4 Tagen wird der größte Teil der Kokken fast ganz gramfrei; nach 8 bis 13 Tagen sind sie ganz gramfrei. Der Einfluß durch Pepsin-Salzsäure ist schwächer und langsamer; noch nach 13 Tagen war der größere Teil der Kokken normal, ein kleinerer Teil abgeblaßt, jedoch ohne die Gegenfärbung von Rot oder Rosa zu zeigen. Es trat nur ein stärkeres Abblässen der Blaufärbung ein. Durch Trypsin wurde Aureus, selbst nach Verlauf von 13 Tagen, in seiner Gramfestigkeit so gut wie gar nicht geschädigt.

Die Auflösungserscheinungen von Aureus durch 3n- und 4n-Salzsäure bei 25° waren nach 2 bis 3 Tagen stärker als bei den Vergleichsproben im Wasser bei 8°; dies gibt sich auch in dem Ausfalle der Färbung kund. Die HCl-Probe war fast völlig gramfrei, die Wasserprobe von 8° gut gramfest.

Nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit dürfte es vielleicht auffallen, daß Pepsin-Salzsäure bei einer Temperatur von 36° nur einen so geringen Einfluß auf das Gramverhalten des Aureus ausübt, während doch sonst die Salzsäure bei 36° sich als ein vorzügliches Mittel erwiesen hat, Bakterien gramfrei zu machen. Aus den Versuchen anderer Forscher (wie Hamburger, Stern, Gregersen) ist zu folgern, daß die elektrolytische Dissoziation der Salzsäure durch den Gehalt an Pepsin so weit herabgesetzt wird, daß die H-Ionen nicht in Wirksamkeit treten können. — Bezüglich der Schrägagarkultur ist zu sagen, daß Aureus bei einer 4tägigen Aufbewahrung von 17° in seiner Gramfestigkeit merklich geschädigt wird und nach 11 Tagen fast gramfrei geworden ist, eine Beobachtung, die schon früher von Bakteriologen an alten Kulturen gemacht worden ist.

Mycoides.

Sein Verhalten gegen Kochsalz, Trypsin und Pepsin-Salzsäure bei 36° gleicht dem von Aureus. Nur von physiologischer Kochsalzlösung wird Mycoides in seiner Gramfestigkeit erheblich beeinflusst: nach 4 Tagen ist etwa die Hälfte der Stäbchen gramfrei (Rosafärbung) geworden. Ob bei längerer Dauer der Einwirkung von Kochsalz eine Zunahme der Umwandlung stattfindet, konnte mit Sicherheit noch nicht festgestellt werden. Trypsin und Pepsin-Salzsäure sind bei einer Dauer von 4 Tagen ohne nennenswerten Einfluß; nach 13 Tagen wirkte aber auch Pepsin-Salzsäure schädigend auf die Gramfestigkeit ein: die kleinere Hälfte bestand aus rosa gefärbten und farblosen Stäbchen. — Die Löslichkeit von Mycoides ist in Kalilauge (1 Prozent = 0.18n) bei 36° größer als in der stärker konzentrierten Salzsäure (4n und 2n), wie schon Bürgers, Schermann

und Schreiber fanden. Mit 1prozent. Kalilauge tritt, wenn man wenig Bakterienmaterial nimmt, nach 1 Tage sogar eine völlige Lösung ein; sie ist als eine kolloidale Lösung anzusehen, da nach Ansäuerung derselben mit verdünnter Salzsäure die Stäbchen mittels Zentrifugierens abgeschieden werden konnten, und hierbei die Stäbchen ihre charakteristische Form zeigten. Im Gegensatz dazu steht das Verhalten der Stäbchen gegen Salzsäure (2n und 4n) bei 36°; sie verlieren nach 5 bis 6 Tagen ihre Gestalt und ballen sich zu formlosen, gramfreien Häufchen zusammen.¹ Die Gramfärbung des Mycoides wird auch durch 1prozent. KOH bei 36° nach dieser Zeit (6 Tage) gleichfalls stark herabgedrückt: nur ein kleiner Teil der Stäbchen ist noch normal geblieben, der größere Teil ist farbschwächer oder rosa gefärbt; bemerkenswert ist, daß hierbei oftmals ein teilweises Herauslösen der Gramfarbe zu farblosen Stellen einsetzt.

Bezüglich der Schrägagarkulturen bei längerer Aufbewahrung lassen sich ähnliche Übergänge der Stäbchen bis zur Gramfreiheit wie beim Aureus beobachten. Die Umwandlung bei 17° vollzieht sich langsamer als beim Aureus; ob das jedoch immer zutrifft, wäre noch zu untersuchen. Daß bei höherer Temperatur, bei 36°, dieser Vorgang schneller verläuft, nimmt nach allem bisher Gesagten nicht wunder. Aufgelöste Stäbchen oder in Auflösung begriffene sind immer mehr oder weniger gramfrei. In der Versuchsreihe, wo Agarkulturen 6 Tage bei 36° gehalten wurden, macht sich der Zusatz von Toluol zur Kultur in der Weise geltend, daß die Gramfarbe nur stellenweise im Innern der Stäbchen erhalten bleibt, dafür tritt teils Entfärbung, teils Rotfärbung ein.

Hefe.

Die Verdauungsversuche mit Kochsalz, Trypsin, Pepsin, destilliertem Wasser, Traubenzucker (bei 36°) lassen eine größere Widerstandskraft der Hefe im Vergleiche zu Aureus und Mycoides erkennen, wenn man den Ausfall der Gramreaktion als Maßstab anlegt. Pepsin-Salzsäure und dest. Wasser (bei 36°) scheinen bei einer Einwirkungsdauer von etwa 13 bzw. 8 Tagen ein wenig mehr einzuwirken als die anderen Flüssigkeiten; es mußte auffallen, daß 1prozentiger Traubenzucker bei 36° ohne erheblichen Einfluß auf die Färbbarkeit der Hefezellen nach Gram war, während R. und W. Albert durch Versuche festgestellt haben, daß sogenannte Dauerhefe (Näheres s. S. 309), welche sich durchaus gramfest verhält, durch 20prozentige Rohrzuckerlösung bei Zimmertemperatur schon nach

¹Bei der Entnahme der Proben wurde die Salzsäure mit etwas NaOH abgestumpft, und die Flüssigkeit, noch sauer reagierend, zentrifugiert.

wenigen Stunden zu einem gewissen Prozentsatze in ihrer Gramfestigkeit geschädigt und nach Verlauf von 3 Tagen bereits fast völlig gramfrei wurde; die Membran war schlecht färbbar (mit Safranin), die kernartigen Gebilde färbten sich gut rot. Ebenso wie gegen Rohrzucker verhält sich Dauerhefe nach Albert in einer Aufschwemmung mit destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 40 bis 45°; kleine Zusätze (Tropfen) Toluol, Thymol, Chloroform änderten nichts an dem Bilde; dagegen wirkten Formaldehyd, Sublimat in der Weise, daß der geschilderte Farbübergang von Schwarzblau zu Bläßrot bei den Hefezellen ausblieb. R. u. W. Albert führen das Eintreten dieser Farberscheinungen auf proteolytische Enzyme (das Endotrypsin von Hahn und Geret) in der Dauerhefe zurück; sie nehmen an, daß bei den genannten Vorgängen mit Rohrzucker bzw. mit Wasser von 40 bis 45° Eiweißkörper teils als solche, teils nach stattgefundener Hydrolyse durch die Hefenmembran diffundieren. Die Gramfestigkeit der Dauerhefe vor der Behandlung rühre von einem Gehalte an gramfärbbaren Eiweißstoffen her.

Zur Nachprüfung der Albertschen Versuche wurde Dauerhefe in kleinen Mengen (etwa 5 g) aus frischer Bäckereipreßhefe nach den Angaben von Albert, Buchner und Rapp mittels Azetons hergestellt. Die von mir gewonnene Dauerhefe zeigte bei 23 bis 25° und bei einem geringen Zusatze von Toluol Gärtätigkeit, welche ich bei entsprechender Versuchsanordnung durch Barytlösung nachwies. Eine Nickelspatelspitze von der Dauerhefe wurde mit etwa 5 ccm 20 prozent. Traubenzuckerlösung unter Zusatz von 3 Tropfen Toluol bei 23 bis 25° in einem Reagenzglas zusammengebracht, welches durch einen mit offener Glaskapillare versehenen Korken verschlossen wurde. Eine sofortige Probe dieser so zubereiteten Mischung ergab folgendes mikroskopische Bild¹: Färbung normal = gramfest, etwa 5 bis 10 Prozent rote und in Auflösung begriffene Zellen, außerdem, wie schon öfters in diesen Kriegsjahren (2. und besonders 3. Jahre) beobachtet, gramfeste kurze Stäbchen überall eingestreut. Diese Hefeaufschwemmung, welche jeden Tag einmal gut und ausgiebig durchgeschüttelt wurde, blieb 5 Tage bei 23 bis 25° stehen. Ein Durchschütteln des Hefematerials ist bei der Entnahme der Probe angebracht, um ein gleichmäßiges und zuverlässiges Durchschnittsmuster für die Gramfärbung zu erhalten. Weder nach 1 Tage noch nach 5 Tagen war es möglich, eine merkliche Abnahme der Gramfestigkeit der Dauerhefe festzustellen; es hat den Anschein, als ob Zellen, welche von vornherein mehr oder weniger gramfrei waren, bei der Behandlung mit der Traubenzuckerlösung der Auflösung allmählich anheimfallen.

¹ Die Proben bei diesen Versuchen wurden ohne weitere Vorbehandlung auf das Deckglas gebracht und an der Luft angetrocknet; diese Behandlung änderte nichts an dem färberischen Erfolge.

Die Färbungsversuche bewiesen, daß die Dauerhefe sowohl nach 1tägiger als auch nach 5tägiger Einwirkung von Traubenzucker bei 23 bis 25° so gut wie ganz gramfest bleibt; das gleiche Ergebnis erhält man bei Anwendung einer 20prozentigen Rohrzuckerlösung unter Zusatz von 2 Tropfen Toluol bei etwa 22°; hier traten sichtbare Übergänge zur Gramfreiheit erst nach 6 Tagen ein. R. und W. Albert sind, wie erwähnt, bei diesen Gärversuchen zu einem entgegengesetzten Ergebnisse gelangt. Die Albertsche Beobachtung steht mit der bekannten Tatsache in Widerspruch, daß das Material für untergärrige Hefe allgemein durch einen Gärprozeß zuckerhaltiger und zuckerliefernder Substanzen gewonnen wird und in frischer Beschaffenheit sich durchaus gramfest verhält.

Was die Trübungsverhältnisse bei den Aufschwemmungen mit Kochsalz, Trypsin und Pepsin-Salzsäure bei 36° noch anlangt, so ist zu erwähnen, daß die Kochsalzaufschwemmung nach 6 und 13 Tagen am hellsten war, Zellen noch ziemlich gut gramfest; desgleichen war (in einer anderen Versuchsreihe bei 36°) die Mischung mit 1prozentigem Traubenzucker heller als die mit destilliertem Wasser allein angesetzte.

Die Versuche mit Diphtheriebazillen bis zu denen mit *Actinomyces* bestätigen wiederum die Beobachtung von Bürgers über das Verhalten gramfester Bakterien gegen Salzsäure und Kalilauge. Auch hier tritt mitunter die Erscheinung auf, daß 0·18n-KOH eine größere lösende Kraft entfaltet als n/1-HCl, so bei Pseudodiphtherie und *Actinomyces*. Dies trifft aber nur zu bei einer Einwirkungsdauer von 3 Tagen bei Pseudodiphtherie und von 24 Stunden bei *Actinomyces*. Nach Verlauf von 4 Tagen sind die HCl- und KOH-Proben von Pseudodiphtherie wieder gleich stark trübe, desgleichen bei *Actinomyces* nach 5 Tagen. Hier dürften gewisse Löslichkeitsverhältnisse eine Rolle spielen.

Im einzelnen ist noch folgendes hervorzuheben.

Während n/1-Salzsäure bei 36° die Diphtheriebazillen nach ungefähr 7 Tagen gramfrei macht, sind bei der 0·18 n-Kalilauge (nach Ansäuern der Probe) nach 9 Tagen nur geringfügige Anfänge von Rosafärbung zu bemerken, auch nach 12 Tagen ist erst eine schwache Umwandlung insofern eingetreten, als bei einer kleinen Menge der Stäbchen ein teilweises Herauslösen der Gramfarbe stattfindet. Bei Milzbrand ist bemerkenswert, daß sowohl 2n-Salzsäure (7·3 Prozent) als 0·18 n-Kalilauge (1 Prozent) nur wenig lösend wirken.¹

¹ Es möge noch auf den Einfluß der geänderten Färbemethode (α -, β - und γ -Färbung) hingewiesen werden; es zeigt sich auch hier wie auf S. 240, daß die Tröpfelmethode in vielen Fällen ein zutreffenderes und klareres Bild liefert als die, den Alkohol $\frac{1}{2}$ bis 1 Minute auf dem Deckglase zu belassen.

Bei den einleitenden Bemerkungen zu diesem Kapitel wurde aus der Arbeit Joblings und Petersens eine Tabelle angeführt über die Beziehungen der Jodzähl von Bakterien zu ihrer Verdauung durch Trypsin (vgl. auch die Tabelle über den Lipoidgehalt und Jodzähl, S. 272). Auf Grund ihrer Versuche kommen sie zu dem Schlusse, daß die Größe des Gehaltes an ungesättigten Lipoiden dem Widerstand der Bakterien (durch Trypsin) proportional sei; sie suchen diese Beobachtung auch dadurch zu bekräftigen, daß sie Tuberkelbazillen sowohl in getrockneter Form als auch nach energischer Extraktion mit organischen Lösungsmitteln der Trypsinverdauung aussetzten. Die Jobling-Petersensche Tabelle über die Ergebnisse dieser Versuche möge auch noch wiedergegeben werden:

1 ccm Aufschwemmung von Tuberkelbazillen	Lipoidgehalt Proz.	N-Ver- dauung mg	Proz.
Getrocknet	31.2	0.13	23
Extrahiert durch Äther, Chloroform und Alkohol	9	0.33	44
Extrahiert im Soxleth mit Äther 120 Stdn., Alkohol 100 Stdn., Benzol 50 Stdn.	7	0.46	57

Durch die langandauernde Extraktion mit Äther, Alkohol und Benzol (im ganzen 270 Stunden lang) steigt die Prozentzahl für die Verdauung auf 57. Nun habe ich auf S. 264 u. ff. gezeigt, daß Hefe, Mycoides und Aureus durch Erhitzen mit Alkohol in ihrer Gramfestigkeit geschädigt werden: je länger die Behandlung mit Alkohol und je höher die hierbei angewandte Temperatur ist, desto gramfreier werden die Bakterien und desto mehr schwindet die charakteristische Form der Bakterien. In ihrer Arbeit machen Jobling und Petersen selbst die Bemerkung, daß durch einfache Soxlethextraktion keine ausreichende Spaltung der Proteinlipoiden eintritt. Es fällt darum auf, daß sie den geringeren Widerstand der extrahierten Bakterien bei der Trypsinverdauung einzig und allein auf den geringeren Gehalt an ungesättigten Lipoiden zurückführen. Nach meinen Versuchen zu schließen, setzt durch die langandauernde Behandlung mit Alkohol eine chemische Umwandlung der Zellinhaltsstoffe ein, welche mit oder ganz allein zur Erklärung der durch die Extraktion geschwächten Widerstandskraft der Bakterien gegen die tryptische Verdauung herangezogen werden dürfte.

Den Lipoiden wird von mehreren Seiten eine Bedeutung für die Gramfestigkeit von Bakterien zugeschrieben. Sieht man den Lipoidgehalt gramfester und -freier Bakterien durch, so scheint diese Annahme wenig Berechtigung zu haben. Folgende Literaturangaben stehen uns zu Gebote, die von Jobling und Petersen und die von Nicolle und Alilaire:

		Jobling-Petersen	Nicolle-Alilaire	
		Lipoid- gehalt in Prozenten	Azeton-Extrakt in Prozenten Trockensubst.	Chloroform- Extrakt in Proz. Trockensubst.
gram- fest.	Tuberkelbazillen . . .	32.7	—	—
	Staphylokokken . . .	4.5—8.5	—	—
	Diphtheriebazillen . . .	5.5—7.5	7	5.2
	Subtilisbazillen . . .	1.7	—	—
	Hefe (Frohberg)		4.2	2.9
gram- frei	Typhusbazillen . . .	7.0—8.2	15.4	10.6
	Colibazillen . . .	4.2—8.2	15.2	11.8

Die Gramfestigkeit der Bakterien von dem Lipoidgehalt (oder von der Größe des Chloroformextrakts) abhängig zu machen, ist nach diesen Werten nicht zulässig. Ein anderer Gedanke hätte hier scheinbar mehr Berechtigung und zwar betrifft er die Jodzahl der aus den Bakterien abgeschiedenen Lipoiden, wobei ich es noch unentschieden lassen will, ob diese abgeschiedenen Lipoiden mit den in den Bakterien vorkommenden wirklich in ihrer Zusammensetzung übereinstimmen.

Bekanntlich ermittelt man die Jodzahl von Fetten in der Weise, daß die Chloroformlösung mit überschüssiger alkoholischer Jod- und Quecksilberchloridlösung versetzt wird, worauf nach Zugabe von Jodkalium das nicht umgesetzte Jod mit n/10-Thiosulfatlösung titriert wird. Auch bei der Gramreaktion spielt der Zusatz von Jodjodkalium eine wichtige Rolle. Man konnte von Haus aus wohl annehmen, daß das Jod der Lugolschen Lösung beim Färbeprozesse auch die Äthylenbindungen des ungesättigten Fettsäureradikals im Lipoid jodieren würde. Bekannt ist es ja, daß aus Bakterienleibern Fettsäuren vom Ölsäuretypus abgeschieden werden können. Jobling und Petersen haben nun die Jodzahl von Lipoiden mehrerer Bakterien zu bestimmen versucht; die gefundenen Werte sind im folgenden zusammengestellt:

		Jodzahl
gram- fest	Tuberkelbazillen . . .	20
	Staphylokokken . . .	60—91
	Diphtheriebazillen . . .	80—100
	Subtilisbazillen . . .	40 (?)
	Tetanusbazillen . . .	44 (?)
gram- frei	Typhusbazillen . . .	30—38
	Colibazillen . . .	32—40

Unter der Annahme, daß die von Jobling und Petersen mit einem Fragezeichen versehenen Werte von Subtilis und Tetanus den wahren Verhältnissen nahekommen, muß man doch zugeben, daß die Jodzahl kein rechtes Unterscheidungsmerkmal für gramfeste und -freie Bakterien abgibt. Die Werte für Subtilis und Tetanus, insbesondere für den Tuberkelbacillus sind zu niedrig im Vergleich zu denen des gramfreien Typhus- und Colibacillus.

2. *Bulgaricus*.

Eine bekannte Erfahrung lehrt, daß gramfeste Bakterien in älteren Kulturen zu einem mehr oder weniger großen Teile ihre Gramfestigkeit einbüßen; im besonderen Maße zeigt diese Eigentümlichkeit der Joghurtbacillus.

Vorversuche mit Material von Kulturen in Milch bei 37 bis 40° ergaben, daß dasselbe nach 1 bis 2 Tagen noch verhältnismäßig gut gramfest war, daß aber nach 3 Tagen die Gramfestigkeit immer mehr abnahm, falls die Kultur dauernd bei einer Temperatur von 37° gehalten wurde. Nach 5 und mehr Tagen wurden die Bazillen zum größten Teile gramfrei: sie ließen sich mit Fuchsin blaßrot und rot färben. Da sich, wie bekannt bei diesen Kulturen, in Milch bis zu etwa 1·5 Prozent Milchsäure bildet, so lag ja die Vermutung nahe, daß die Bildung dieser Säure und der Rückgang der Gramfestigkeit in einem ursächlichen Zusammenhange miteinander stehen könnten.

Die Schwierigkeit, die für solche Versuche hinreichenden Mengen reinen Materials zu erhalten, konnte leicht behoben werden, da nach dankenswerter Privatmitteilung von Herrn Prof. Dr. Burian der Joghurtbacillus auch in einer mit Traubenzucker versetzten Hefeabkochung ein ganz gutes Wachstum zeigt. Hefeabkochung ist, wie bekannt, in den letzten Jahren als brauchbare Nährlösung für Bakterienkulturen empfohlen und auch mit Erfolg benützt worden. Sie wurde in folgender Weise bereitet: 20 g Bäckereipreßhefe, mit 100 g Wasser 7 Minuten lang zum Kochen erhitzt, läßt man etwas absetzen, filtriert, füllt auf etwa 100 ccm mit Wasser auf, zentrifugiert, löst 7 g Traubenzucker darin auf, füllt diese Hefe-Traubenzuckerlösung in Reagenzgläser und sterilisiert sie etwa 1/2 Stunde in siedendem Wasserbade; Kontrollproben, bei 36 1/2° und 40° gehalten, bewiesen die Sterilität dieser Hefelösungen. Das Bakterienmaterial stammte aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin und wurde 2 Tage nach Empfang auf seine Gramfärbbarkeit geprüft; Färbemethode war, wie in allen Fällen: je 1 Minute und 1/4 Minute 12 Tropfen Alkohol tröpfeln. Das Berliner Material wurde ohne Vorbehandlung gefärbt. Der Bacillus zeigte sich hierbei in Form von kleinen dunkelblauen und schwarzblauen kurzen Stäbchen, welche auf zartem und dickerem eiweißartigen Gerinnsel von roter und bläulicher Farbe gelagert waren; rosa gefärbte Stäbchen waren nur vereinzelt sichtbar.

Nach den Kulturversuchen in Hefe-Traubenzuckerlösung zu urteilen, ist die Temperatur von 37 bis 40° bei einer Dauer von 1 bis 1 1/2 Tagen die für das Wachstum des *Bulgaricus* günstigste; bei der Temperatur von 45° zeigt er gleichfalls ein gutes Wachstum. Doch hat es den Anschein, als ob die höhere Temperatur bei einer Dauer von 24 Stunden und länger die Gramfestigkeit des Bacillus schädigt. Zur Veranschaulichung des Gesagten möge das Ergebnis zweier Kulturversuche mitgeteilt werden.

- Kulturprobe I, 24 Stunden bei 45° in Hefe-Zuckerlösung gezüchtet (zentrifugiert und nicht zentrifugiert) = größtenteils gramfest bis ziemlich gramfest, kleinerer Teil rosa nebst Übergängen, Bulgar. in längeren und kürzeren Fäden.
- „ II, 3 Stunden bei 40° und 16 Stunden bei 36½° in Hefe-Zuckerlösung gezüchtet (zentrifugiert) = gut normal, am Rande vereinzelt kurze rosa gefärbte Stäbchen, alles Übrige jedoch aus Fäden bestehend.

Für die folgenden Versuche wurde Bakterienmaterial von Hefenährlösungen, die bei 36½ bis 40° gehalten wurden, nach einmaligem Zentrifugieren benützt und zwar in Form von Aufschwemmungen in Reagenzgläsern; die Temperatur betrug hierbei 36½°, nur in einem Falle 23°. Zur Verwendung gelangten: Salzsäure (0.27 n = 1 Prozent), Kalilauge (0.18 n = 1 Prozent, i-Milchsäure (2n = 18 Prozent und 0.17 n = 1.5 Prozent). Bei der Entnahme von Proben wurden diese nach entsprechender Neutralisation mit Soda- oder Säurelösung (Salz- oder Essigsäure) zweimal zentrifugiert.

Durch 1 prozentige Salzsäure wird unter den angegebenen Versuchsbedingungen *Bulgaricus* nach etwa 2 Tagen fast ganz gramfrei, durch 1 prozentige Kalilauge nach etwa 2 Tagen zur Hälfte gramfrei; nach 8tägiger Laugenwirkung wird die Umwandlung vollständig. Die wenigen eingestreuten Hefezellen (aus der Hefe-Traubenzuckerlösung stammend) zeigen ein analoges Verhalten. — Bei den Versuchen mit Milchsäure sind Unregelmäßigkeiten zu verzeichnen, die der Aufklärung noch bedürfen. Wie bei *Aureus* und Hefe (s. S. 247 u. 250), wirkt auch 2n-Milchsäure (18prozent.) auf die Gramfestigkeit des *Bulgaricus* kaum ein, erst bei der Dauer von 15 bis 22 Tagen (bei 36½° und 23°) schreitet die Umwandlung stärker vorwärts. Die eingestreuten Hefezellen werden gleichfalls nur langsam umgewandelt. Ganz anders verhält sich nun *Bulgaricus* gegen die verdünntere 1.5 prozentige Milchsäure; schon nach 3 bis 4 Tagen (Temperatur 36°) waren die Fäden und Stäbchen fast oder ganz gramfrei. Ebenso gingen die eingestreuten Hefezellen ihrer Gramfestigkeit verlustig. Das Verhalten von *Bulgaricus* und Hefe gegen Milchsäure ist auch im Hinblick auf die Versuche von *Aureus* mit der gleichen Säure (vgl. S. 247 und 250) bemerkenswert, die Kokken wurden, wie dort angegeben, in ihrer Gramfestigkeit nicht geschwächt, obwohl sie in dem einen Falle 3 Tage einer 10prozentigen Milchsäure bei 36° und in dem anderen Falle sogar 34 Tage einer 4.5prozentigen Milchsäure bei 20 bis 25° ausgesetzt waren. Dies auffallende Verhalten der Milchsäure veranlaßte mich, die für *Bulgaricus* benutzten Lösungen von 1.5 und 18 Prozent und desgleichen frisch hergestellte von der gleichen Konzentration auf ihr Inversionsvermögen gegenüber 20prozentigen Rohrzuckerlösungen bei 23 bis 25° zu prüfen, um vielleicht Anhaltspunkte für ein solch

verschiedenartiges Verhalten zu gewinnen. Die Bestimmung der Inversionskonstante:¹

$k \times 10000$ ² ergab: für die 1.5 prozent. Lösung 0.37 } alte 0.31 } frische
 „ „ 18 „ „ 1.5 } Lösung 1.11 } Lösung

Die Inversion des Rohrzuckers durch die 1.5 und 18prozentige Milchsäure vollzieht sich im Sinne der Dissoziationstheorie: die Inversionskonstante der 18prozentigen Säure ist etwa viermal größer als die der 1.5prozentigen, mit anderen Worten: die stärker konzentrierte Säure invertiert Rohrzucker unter gleichen Bedingungen viermal schneller als die schwächer konzentrierte. Die Werte für die frisch dargestellte Säure sind im Vergleiche zu der alten etwas niedriger, wieweit dies zutrifft, könnten erst genauere Versuche lehren. Auf jeden Fall lassen sich die Unterschiede, welche sich bei der Einwirkung von Milchsäurelösungen auf Aureus, Hefe und *Bulgaricus* ergeben haben, nicht durch die Ionenlehre erklären. Hingegen scheinen namentlich die Ergebnisse der Kochsalzversuche bei Aureus, Hefe und *Mycoides* dafür zu sprechen, daß Selbstverdauungserscheinungen eine Rolle spielen; es war deshalb nötig, solche Versuche mit *Bulgaricus* anzustellen.

Für die Verdauungsversuche wurden *Bulgaricus*kulturen in der Hefe-Traubenzuckerlösung bei Temperaturen von $36\frac{1}{2}$ bis 40° mit und ohne Zusatz von wenig Toluol, sonst ohne weitere Vorbehandlung sich selbst überlassen, in einem Falle wurde zentrifugiertes Material mit physiologischer Kochsalzlösung bei $36\frac{1}{2}^\circ$ unter Zusatz von wenig Toluol in verschlossenem Reagenzglas angesetzt. Das Ergebnis war, daß *Bulgaricus* bei allen Proben nach Verlauf von 3 bis 4 Tagen fast völlig oder ganz gramfrei wurde, während die eingestreuten Hefezellen kaum von ihrer Gramfestigkeit etwas eingebüßt hatten, bei *Bulgaricus* machte sich hierbei eine blasse Gegenfärbung mit Fuchsin bemerkbar.

Demnach wird *Bulgaricus* bei Selbstverdauung, bei Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung, durch verdünnte Säuren und Kalilauge (1 bis 2 prozent.) gramfrei. Stärker konzentrierte Milchsäure (18 prozent., auch 9 prozent.) bringt unter den gleichen Bedingungen diese Wirkung nicht hervor. Es liegt hier die Annahme nahe, daß an der Umwandlung

¹ annähernd genau durchgeführte

² Berechnet nach der Formel

$$k = \frac{2(w_m - w_n)}{[(w_m - W) + (w_n - W)](t_n - t_m)};$$

vgl. Ostwald-Luthers *Hand- und Hilfsbuch f. phys.-chem. Messungen*. Die alten und die frischen Säurelösungen waren den gleichen Temperaturschwankungen von 23 bis 25° unterworfen.

des gramfesten *Bulgaricus* in gramfreien durch verdünnte Säuren und Alkali Endoenzyme mit beteiligt seien, welche durch stärker konzentrierte Milchsäurelösungen in ihrer Wirksamkeit geschädigt wurden.

Immerhin ist es erforderlich, die Einwirkung von Milchsäurelösungen auf Kleinwesen unter den in dieser Arbeit angegebenen Bedingungen und Vorsichtsmaßregeln näher zu prüfen und diese Untersuchungen auch auf andere Oxysäuren auszudehnen.

Aus dem Bisherigen ergibt sich mit ziemlicher Sicherheit, daß die öfters beobachtete mangelhafte Gramfärbbarkeit des *Bulgaricus* auf eine beginnende Umwandlung der für die Färbung maßgebenden Inhaltsstoffe (nukleinartiger Verbindungen) zurückzuführen ist, wahrscheinlich die Folge eines wenig günstigen Kulturverfahrens, wobei Bildung von geringen Mengen Milchsäure auch eine Rolle spielen dürfte. Nach den gemachten Beobachtungen müssen völlig gramfreie *Bulgaricus*individuen als entwicklungsunfähig bezeichnet werden.

Über die Gramfärbung von Fetten.

Nach den Versuchen von Jobling und Petersen schien es nicht uninteressant zu sein, die Gramfärbung an einigen Fetten selbst zu prüfen; es mußte sich da zeigen, ob ein größerer oder geringerer Gehalt an ungesättigten Fettsäuren einen Einfluß auf die Gramfärbung auszuüben imstande ist.

Bei diesen Versuchen kam es in erster Linie darauf an, Fette in möglichst feiner Verteilung zu untersuchen. Von den Fetten selbst wurden diejenigen berücksichtigt, welche sich durch eine hohe und durch eine niedrige Jodzahl auszeichnen: Leinöl mit einer Jodzahl von 170 bis 202, Hammeltalg von 33 bis 46 und Lanolin von 20 bis 21. Außerdem wurden noch geprüft die ungesättigte Ölsäure und die gesättigte Stearinsäure.

Die genannten Verbindungen wurden durch Gummi arabicum und Wasser in der bekannten Weise emulgiert; bei den festen und halbfesten Fettstoffen ist es angebracht, die Emulgierung in einem vorher erwärmten Mörser vorzunehmen. Zur Bereitung einiger Emulsionen wurde auch etwas Hühner-eiweißlösung benützt, um die Öltröpfchen besser haftend auf dem Deckglas zu machen. Von den Emulsionen wurden Deckglaspräparate angefertigt, welche nach dem Trocknen an der Luft teils ohne Fixierung, teils mit Fixierung in der bakteriologisch üblichen Weise zur mikroskopischen Untersuchung gelangten. In der Regel wurde wie folgt gefärbt: je 2 Minuten Gentiana- und Lugolsche Lösung, bis $\frac{1}{2}$ Minute 80 bis 97 Prozent Alkohol (ohne Tröpfeln) und darauf Fuchsinlösung. Die feine Verteilung der emulgierten Fette wurde im hängenden Tropfen geprüft; die Teilchengröße war, abgesehen von unvermeidlichen größeren Partikelchen, eine zweckentsprechende und für den Vergleich mit Bakterien ausreichende.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Färbungen bei Leinöl, Hammeltalg und Lanolin zum größeren Teile als gramfrei zu bezeichnen sind. Das Schwankende liegt wohl an der fettartigen Beschaffenheit dieser Stoffe, welche die Farbwirkung nicht sicher hervortreten läßt. Durch zahlreiche andere, hier nicht mitgeteilten Versuche sind wir zur Überzeugung gelangt, daß den Fetten Leinöl, Hammeltalg, Lanolin, auch der Ölsäure ein gramfestes Verhalten nicht zugeschrieben werden kann; die Annahme, daß eine hohe Jodzahl des Lipoids für das Zustandekommen der Gramreaktion maßgebend sei, hat durch die obigen Versuche keine Stütze erhalten.

Aus allem, was die Versuche bis jetzt ergeben haben, kann geschlossen werden, daß die chemische Zusammensetzung des Bakterienleibes es ist, welche die Gramfärbung bedingt. Die in Betracht kommende Substanz ist ohne Zweifel organischer Natur und muß der Reihe der organisch-chemischen Verbindungen angehören. Der Gedanke war naheliegend, die große Klasse von Eiweißstoffen für unsere Untersuchung heranzuziehen, die darauf hinzielte zu prüfen, ob es unter diesen gramfeste und gramfreie Verbindungen gibt. Ähnliche Untersuchungen sind wohl schon früher ausgeführt worden, und am gründlichsten geschah dies durch A. Fischer und zwar nach Gesichtspunkten, welche später besprochen werden sollen. Jedoch wurde von diesem Forscher die Gramreaktion in ganz geringem Umfange für seine Färbungsversuche herangezogen. Aus diesen und anderen Gründen machte es sich erforderlich, verschiedene eiweißähnliche und eiweißartige Verbindungen und Organteile auf ihr Gramverhalten zu prüfen und im Anschlusse daran die nach der Fischerschen Methode gewonnenen Granula dem gleichen Färbungsverfahren zu unterwerfen. Zur gründlichen Prüfung dieser Fragen war es nach den bis jetzt in vorliegender Arbeit gemachten Erfahrungen angebracht, nicht bloß Material in ursprünglicher Form, also nicht vorbehandeltes, nach Gram zu färben, sondern auch solches, das einer Vorbehandlung mit Säure, Alkali oder heißem Wasser unterworfen wurde. Diesen Untersuchungen sind die folgenden Abschnitte gewidmet.

Gramfärbung von Eiweiß, eiweißartigen und anderen Stoffen (Eiweiß, Pepton, Kasein, Schalenhaut des Hühneries, Horn, Nuklein, Nukleinsäure, Bolus, Kieselgur, Quarzsand, Lezithin, Zungenepithelien); Chromatfällungen nach A. Fischer.

Zur Versuchsanordnung ist folgendes anzuführen.

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Präparate auf Deckgläser gebracht und an der Luft getrocknet, falls nichts anderes angegeben ist; feste Stoffe wurden mit wenig Wasser im Mörtel oder im Uhrgläschen verrieben und auf dem Deckglase verteilt. Die Chromatniederschläge nach

A. Fischer brachte man noch feucht auf Deckgläser, trocknete sie an der Luft an, wusch in fließendem Wasser 15 Sekunden lang aus und trocknete sie wieder an der Luft. Im übrigen wurden diese Chromatfällungen, wenn irgend möglich, genau nach den Angaben Fischers (in Petrischalen usw.) vorgenommen. In einigen Fällen wurden zur feineren Verteilung des Materials Bolus alba und gut gewaschener Sand benutzt: Bolus reinigten wir durch einen Schlämmprozeß von den gröberen Partikelchen. Kasein lösten wir unter Zuhilfenahme von wenig Soda in destilliertem Wasser und machten dann die Lösung schwach essigsauer. Die Schalenhaut wurde frischen Hühnereiern entnommen und durch einfaches Abziehen von der Eischale in wenig Wasser gelöst. Das Hornmaterial erhielten wir durch gelindes Abschaben vom Fingernagel, nur die feineren Anteile wurden bei den Versuchen berücksichtigt. Das Dihydroleuzithin, ein aus Holzgeist kristallinisch sich ausscheidendes Präparat, verdanke ich dem Entgegenkommen von Herrn Geh. Rat Paal. Die Epithelien wurden durch gelindes Abschaben der Zunge gewonnen. Bei der Behandlung der Epithelien mit Salzsäure und mit Kalilauge wurde mit der Probeentnahme folgendermaßen verfahren. Die HCl-Proben zentrifugierte man durch einfaches Verdünnen mit destilliertem Wasser, die KOH-haltige erst nach Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure. Im übrigen schloß sich die Versuchsanordnung der früher geschilderten an. An Stelle der weggelassenen umfangreichen Tabelle sind folgende Angaben einzuschalten.

Eiweiß (Albumen ovi sicc.).

Angewandte Färbemethode: je 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{4}$ bis 1 Minute 80 bis 97 Prozent. Alkohol ohne Tröpfeln, 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln.

Die Eiweißchromatfällungen nach A. Fischer wurden in 5 Prozent. Lösungen mit 2·5 Prozent. Kaliumdichromatlösung (doppeltes Volum.) und etwas Eisessig vorgenommen.

Pepton Witte.

Färbemethode: je 1 bis 3 Minuten und 1 bis 2 Minuten ohne Tröpfeln, 1 bis 3 Minuten und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln (20 Tropfen).

Pepton wurde sowohl in 40 Prozent. als auch in 5 Prozent. Lösungen (s. weiter unter!) mit dem doppelten Volumen 2·5 Prozent. Dichromatlösung unter Zusatz von etwas Eisessig gefällt, und die entstandene Fällung in der bekannten Weise weiter behandelt.

Kasein.

Färbemethode: je 2 Minuten und 1 Minute ohne Tröpfeln.

Benutzt wurde eine schwach essigsäure Lösung, von der 8 ccm mit 9 ccm 2·5 Prozent. Dichromatlösung unter Zusatz von wenig 20 Prozent. Essigsäure versetzt wurden.

Schalenhaut des Hühnereies.

Färbemethode: je 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Minute 80 bis 97 Proz. Alkohol ohne Tröpfeln.

Präparat wurde durch Zerreiben nach Zusatz von wenig Wasser im Achatmörser feinstens verteilt.

Horn.

Färbemethode: je 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Minute 80 bis 97 proz. Alkohol ohne Tröpfeln.

Über die Behandlung des Materials mit 25 prozent. Salzsäure, 25 prozent. Schwefelsäure, 2 prozent. Kalilauge und Toluol ist folgendes zu sagen. Eine Probe mit Salzsäure wurde 2 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, die andere im Autoklaven auf siedendem Wasserbade. Die Schwefelsäure ließ man 9 Stunden bei etwa 105° einwirken; nach Zusatz von Ammonkarbonat wurde zentrifugiert. Die Proben mit Kalilauge wurden teils $\frac{1}{2}$ Stunde auf 95°, teils 5 Stunden auf 70° erhitzt und darauf nach Ansäuern mit Salzsäure zentrifugiert. Eine mit Alkoholäther und warmem Essigester nacheinander behandelte Probe wurde mit Toluol 5 Stunden lang auf 111° erhitzt.

Nuklein und Nukleinsäure (Grübler).

Nuklein.

Färbemethode: je 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln und unter Tröpfeln.

Die Vorbehandlung bestand im Erwärmen von Proben mit 15 prozent. Salzsäure, 2 und 4 prozent. Kalilauge bei 36°, während 2 bis 5 Tage; der Versuch mit Salzsäure wurde auf 3 Wochen ausgedehnt. Die Kaliprobe säuerte man vor dem Zentrifugieren wie üblich an. Bei einer anderen Versuchsreihe wurden das eine Mal Nuklein und Quarzsand (je 1 g) mit Kieselgur (0.3 g) $\frac{1}{4}$ Stunde lang scharf zerrieben, das andere Mal ohne Nuklein nur mit Kieselgur und Quarzsand, beide Male unter Zusatz von etwas Wasser; Färbemethode hierbei: je 1 Minute und $\frac{1}{4}$ Minute tröpfeln.

Nukleinsäure.

Färbemethode: je 1 bis 2 Minuten und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln.

Für die Chromatfällung nach A. Fischer (a. a. O. S. 43 und 44) wurden 5 ccm einer 3 prozent. Nukleinsäurelösung (unter Zusatz von NH_3) mit 1 ccm einer 5 prozent. Chromsäurelösung versetzt; die Deckglaspräparate mit dieser Chromatfällung wurden wie folgt gefärbt. In dem einen Falle spülte man nur nach dem Zusatz von Alkohol und Fuchsin mit Wasser nach, im anderen Falle nach jedesmaligem Zusatz der Gramflüssigkeit, wie es A. Fischer bei Färbungen für unerläßlich hält. Bei einer anderen Versuchsreihe wurde Nukleinsäure 5 bis 6 Tage einmal mit 15 prozent. Salzsäure, das andere Mal mit 2 prozent. Kalilauge bei 36° erwärmt; das Kalipräparat wurde vor dem Zentrifugieren wieder mit Salzsäure angesäuert.

Lezithin und Paalsches Dihydrolezithin.

Färbemethode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Minute ohne Tröpfeln.

Die Behandlung dieser Präparate wurde mit 15 prozent. Salzsäure bei 36° vorgenommen und dauerte 8 Tage; die Säure sättigte man vor dem Zentrifugieren durch Ammoniak ab.

Zungenepithelien.

Färbemethode: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute ohne Tröpfeln, je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln (15 bis 30 Tropfen).

Die Epithelien wurden mit 2 n- und 4 n-Salzsäure (7·3 und 14·6 prozent.), mit 0·18 n- und 0·36 n-Kalilauge (1 und 2 prozent.), n/1-Kalicarbonatlösung (6·9 prozent.) 4 bis 17 Tage bei 20, 25 und 36° stehen gelassen; nach Verlauf von 4 und mehr Tagen wurden Proben entnommen; die Erhitzung der Epithelien mit destilliertem Wasser auf 97 bis 98° wurde nur $3\frac{1}{4}$ Stunde lang fortgesetzt; Probeentnahme nach $\frac{3}{4}$ und $3\frac{1}{4}$ Stunden.

Eiweiß.

Dieses verhält sich bei den Färbungen unter den angegebenen Versuchsbedingungen einmal mehr gramfrei, das andere Mal weniger, wie noch zahlreiche andere Färbungsversuche lehrten; in diesen und den folgenden Fällen sehen wir übrigens Reinblaufärbung bereits als positiven Ausfall der Gramreaktion an. Behandlung des Eiweißes mit Salzsäure ändert an den Färbungsverhältnissen nichts: ein Teil des mikroskopischen Präparates erscheint mehr der weniger gramfest, der andere gramfrei in den verschiedenen Abstufungen. Fischersches Eiweißchromat verhält ich ganz ähnlich; auch beim Eiweißstannat sehen wir die gleichen wechselnden Erscheinungen; ob Serumalbumin (Grübler) mehr nach der positiven Seite als Eiweiß neigt, ist nicht näher untersucht worden.

Pepton Witte.

Pepton Witte, bekanntlich zum größten Teile aus Albumosen und zum kleineren Teile aus Pepton bestehend, bildet nach dem A. Fischerschen Chromatfällungsverfahren gut ausgebildete Granula verschiedenster Größe. Um das Verhalten von Granula und Gerinnsel beim Pepton besser verfolgen zu können, wurde dasselbe in 2 Anteile zerlegt: in einen in kaltem Wasser löslichen und in einen darin unlöslichen. Den in kaltem Wasser unlöslichen Anteil reinigten wir durch Absetzenlassen des mit Wasser übergossenen Peptons und durch öfteres Dekantieren mit Wasser und brachten ihn dann unter Zusatz von wenig Soda in Lösung. Dieser Peptonanteil neigte nicht zur Granulabildung. Das Wichtigste an allen diesen Versuchen ist, daß Pepton Witte eine Zwischenstellung von gramfest und gramfrei einnimmt, ebenso wie Hühnereiweiß. Von weiterem Interesse ist die Frage, ob die Fischersche Hypothese, daß die großen Granula der Entfärbung durch Alkohol länger widerstehen als die kleinen (a. a. O., S. 116), zu Recht besteht. Da Fischer bei der Gramfärbung eine Wasserspülung nach jedesmaligem Zusatz der Färbungsflüssigkeiten für notwendig erachtet (vgl. a. a. O., S. 84 und 105), wurde auch diese Behandlungsweise als Vergleich zu

der in der Bakteriologie üblichen geprüft. Das Ergebnis aus den zahlreichen Färberversuchen ist dahin zusammenzufassen, daß die Fischersche Hypothese — beim Pepton wenigstens — im allgemeinen nicht zutrifft; die mikroskopischen Bilder, welche man nach der Fischerschen Methodik erhält, sind zu wechselvoll und schwankend, als daß wir behaupten dürften, der Ausfall der Gramreaktion hänge einzig und allein von der Korngröße ab. Daß ein größerer Substanzreichtum, dichteres Gefüge der Granula und des Gerinnsels bisweilen zu einer mehr oder weniger gramfesten Reaktion führen kann, ist richtig, und ich fand dies auch bei meinen Versuchen in dieser Arbeit öfter bestätigt, aber durchaus nicht regelmäßig, sondern recht schwankend. Dies Schwankende auf Zufälle beim Färbeprozesse zurückführen zu wollen, ist bei dem überaus zahlreichen Versuchsmateriale vorliegender Arbeit nicht angängig.

Kasein; Schalenhaut des Hühnereies.

Auch hier zeigen sich ähnliche Färbungsverhältnisse wie beim Eiweiß und Pepton Witte; teils positiver teils negativer Ausfall der Gramreaktion. Kasein scheint mehr Neigung zu haben, sich etwas positiver zu färben als Eiweiß, Pepton und die Schalenhaut. Das Ergebnis bei der Schalenhaut ändert sich nicht, wenn Proben derselben mit kalter oder warmer Salzsäure vorbehandelt wurden.

Horn.

Nicht vorbehandeltes Material zeigte bei kürzerer Einwirkung ($\frac{1}{4}$ Minute) des differenzierenden Alkohols Neigung zu Gramfestigkeit (eine Folge des dichteren Gefüges von Horn?), bei einer Dauer von $\frac{1}{2}$ Minute ist die Blaufärbung weniger stark. Das Ergebnis verschiebt sich nur wenig, wenn das Hornmaterial mit organischen Lösungsmitteln wie mit Toluol bei 111° oder mit Salzsäure im Autoklaven oder mit 25prozentiger Schwefelsäure (bei etwa 105°) behandelt wurde. Am meisten wirkte noch heiße Kalilauge ein: dieser Umstand, zusammen mit der Beobachtung, daß nach der Einwirkung mit Salzsäure, Schwefelsäure und Kalilauge vereinzelt gelbliche bis farblose Partikelchen bei den Grampräparaten sichtbar wurden, ließ mich vermuten, daß bei bestimmten Substanzen oder Verbindungen, welche gramfest sich verhalten, es doch möglich sei, dieselben durch chemische Eingriffe gramfrei zu machen.

Nuklein und Nukleinsäure (aus Hefe).

Als ziemlich gut gramfeste Verbindungen erwiesen sich Nuklein und Nukleinsäure. Die Körner und Klümpchen, wie sie durch Verteilung dieser

Verbindungen in Wasser erhalten werden, wurden bei der angewandten Färbungsmethode tief-schwarzblau gefärbt.¹ Durch Behandlung mit Salzsäure und Kalilauge wird Nukleinsäure ersichtlich mehr im gramfreien Sinne gefärbt, desgleichen Nuklein durch Kalilauge, jedoch nicht oder kaum durch Salzsäure. Diese Farbänderung kann nicht physikalischen Ursprungs allein sein; dafür spricht das Verhalten des Nukleinpräparates zu Salzsäure und Kalilauge: durch Salzsäure wird Nuklein in seinem Färbungsvermögen nur ganz geringfügig beeinflusst, während Kalilauge, welche bekanntlich Nuklein in Eiweiß und Nukleinsäure spaltet, in der Weise wirkt, daß die Verbindung etwa zur einen Hälfte blau und tiefblau, d. h. gramfest, zur anderen blaurot und rot, also gramfrei gefärbt wird. Man darf der Vermutung wohl Raum geben, daß dies Färbungsergebnis auf einen Zerfall des Nukleins in Eiweiß und Nukleinsäure zurückzuführen ist. Die Versuche mit Quarzsand und Kieselgur (einer amorphen und weniger reinen SiO_2 -Verbindung als Quarzsand) zeigen uns klar, daß bei den Färbungen Quarzsand fast farblos bleibt, Kieselgur aber blaßrosa, mitunter auch mit bläulichem Tone gefärbt wird, Beobachtungen, die deutlich darauf hinweisen, daß es Verbindungen und Stoffe gibt, welche sich gramfrei verhalten oder überhaupt keinen Farbstoff (in unseren Falle Fuchsin) annehmen.

Lezithin und Dihydrolezithin Paal.

Da festhaftende Lezithin-Deckglaspräparate nur schwer herstellbar waren, so wurde Lezithin mit dem gramfesten Nuklein und einem Tropfen Wasser zusammen auf dem Deckglase verrieben, Lezithin verhält sich, wie es scheint, mehr gramfrei; ob daran die fettige Beschaffenheit des Lezithins die Schuld trägt, mag unentschieden bleiben. Bemerkenswert ist, daß nach Behandlung von Lezithin mit Salzsäure dasselbe ziemlich gut gramfest wird; denn bis jetzt hatten wir nur den umgekehrten Fall kennen gelernt, daß gramfeste Bakterien durch Salzsäure gramfrei wurden. Das Paalsche Dihydrolezithin, das sich gramfest verhält, wird durch Salzsäure in seiner Färbung nicht beeinflusst.

Zungenepithelien.

Die bei diesen Versuchen durchgeführte Trennung in nicht zentrifugiertes und zentrifugiertes Material geschah mit aus dem Grunde, um zu zeigen, daß bei Anwesenheit dicklicher Speichelflüssigkeit die Einwirkung des

¹ Die Verteilung von Nuklein und Nukleinsäure wurde auch durch kräftiges Verreiben mit Quarzsand und Wasser vorgenommen, auch da zeigten sich die Nukleinpräparate gut gramfest.

Reagenz auf die Epithelzellen teils verzögert wird, teils zu einem mehr oder weniger deutlichen mikroskopischen Bilde führt. Deshalb treten bei dem zentrifugierten Materiale die Veränderungen innerhalb der Epithelzellen durch Kalilauge und heißes Wasser besonders schön in Erscheinung. — Aus dem Versuche ergibt sich, daß durch Salzsäure und Kalilauge die Gramfestigkeit der Epithelzellen mit ihren Kernen geschädigt, und diese bei längerer Berührung mit diesen Reagenzien immer mehr gramfrei werden. Eine ganz unbedeutende Wirkung übt die $\frac{1}{1}$ -Pottaschelösung (6·9 prozent.) aus, vergleichbar mit derjenigen bei *Mycoides* und *Aureus* (auf S. 258). Ein gewisses Interesse bietet das Verhalten der Epithelzellen gegen destilliertes Wasser von 97 bis 98°. Wie Kalilauge die Zellkerne bald zum Verschwinden in den Epithelzellen bringt, ebenso wirkt heißes Wasser, nur mit dem Unterschiede, daß im letzteren Falle die Kerne fast vollständig verschwinden; die Epithelzellen selbst erscheinen kräftiger blau gefärbt als beim Ausgangsmateriale.

Bezüglich der den Epithelzellen eingestreuten Hefezellen und Bakterienstäbchen ist zu bemerken, daß nur die ersteren durch die betreffenden Reagenzien 2n-Salzsäure, $\frac{1}{1}$ -Pottaschelösung und 0·18 n-Kalilauge verschieden stark beeinflusst werden, dagegen nicht die gramfesten Bakterienstäbchen; die Umwandlung der Hefe in gramfreie ist aber verlangsamt, wenigstens was die Einwirkung der 2n-Salzsäure und 0·18 n-Kalilauge auf nicht zentrifugiertes Material betrifft, wofür analoge Versuche von früher vorliegen. Auf die Gegenwart der Speichelflüssigkeit wird wohl die verlangsamte Umwandlung zurückzuführen sein.

Da sich gezeigt hat, daß die Zellkerne der Zungenepithelien gramfest sind und bei der Einwirkung von Salzsäure, Kalilauge, Pottaschelösung eine große Übereinstimmung in ihrem Verhalten mit gramfesten Bakterien aufweisen, so wurden die Versuche auf solche Objekte ausgedehnt, von denen man annimmt, daß der Hauptbestandteil wie bei den Epithelkernen aus nukleinartigen Verbindungen, auch Chromatin oder chromatische Substanz genannt, zusammengesetzt ist. Hierfür kämen für uns die Zellkerne des Erbsenkeimes (oder auch anderer Keime) mit den Kernteilungsfiguren und außerdem Spermien in Betracht. Im folgenden sind die Untersuchungen nach dieser Richtung hin in Kürze zusammengestellt; die dazu gehörigen, zum Teil sehr reichhaltigen Tabellen sind aus dem schon bekannten Grunde weggelassen.

Zur Gramfärbung der Zellkerne und Kernteilungsfiguren von Erbsenkeimen.

Triebkräftige Erbsen wurden durch feuchten Sand zum Keimen gebracht; bei einer Länge von 1 bis 2 cm schnitt man das Würzelchen ab. Zum Härten der Präparate wurde sowohl 97 prozent. Alkohol als 1 prozent. Quecksilberchloridlösung verwendet; in Alkohol beließ man den Wurzelkeim 2 bis 3 Tage, in der Quecksilberlösung nur 1 bis 1½ Tage. Durch Auslaugen mit destilliertem Wasser entfernte man das Sublimat. Nach der Härtung mit Alkohol oder mit Sublimatlösung wurde das Würzelchen zur Vorbereitung der Mikrotomschnitte mit verdünntem Alkohol — 99 prozent. Alkohol — Toluol — Toluol-Paraffin bei 60° — festes Paraffin bei 60° behandelt. Das Paraffin lösten wir durch Xylol heraus oder auch durch Toluol, welches sich gleichfalls hierzu eignet, wenn auch das Lösungsvermögen etwas geringer zu sein scheint. Die weiteren Flüssigkeiten zur Vorbereitung für die Färbung der Mikrotomschnitte (Längsschnitte) waren Alkohol und Wasser. Gefärbt wurde nach Gram, in einem Falle mit dem bekannten Hämalaun. Wenn auch verschiedene Forscher (G. Retzius, M. Mosse u. a.) Fixationslösungen ohne Säuren wie Essigsäure u. a., absol. Alkohol, Sublimatlösungen zum Färben von Gewebsschnitten besonders empfehlen, so ergab sich hinsichtlich der Sublimathärtung für uns doch die Forderung zu prüfen, ob sich ein Einfluß dieser Metalllösung auf den Ausfall der Gramreaktion bemerkbar macht. Für diesen Zweck wurden *Mycoides* und *Coli* mit 1 prozent. Sublimatlösung bei etwa 17° 3 bis 5 Tage stehen gelassen. Bei der Entnahme von Proben wurden diese jedesmal vorher 2 bis 3 mal mit destilliertem Wasser zentrifugiert, um alles Quecksilberchlorid zu entfernen. Das Colizentrifugat prüfte man nach 1, 2, und 5 tägiger Einwirkung des Sublimats zum Nachweise von Spuren Hg in den Stäbchen mit verdünntem Schwefelammon; schwärzlich gefärbte Stäbchen konnten hierbei nicht oder nur in ganz geringem Maße mikroskopisch wahrgenommen werden. Die Gramfärbung der mit 1 prozent. Sublimatlösung behandelten *Mycoides*- und *Coli*proben ergab folgendes (Färbemethode war: je 1 Minute und ½ Minute tröpfeln).

Ein Einfluß der 1prozentigen Sublimatlösung auf *Mycoides* war nicht erkennbar, auch nicht auf *Coli*, sofern die Dauer der Einwirkung auf etwa 2 Tage beschränkt blieb; war *Coli* 5 Tage mit Sublimat in Berührung, so konnte die Färbung nach Gram nicht mehr als gramfrei angesprochen werden: die Stäbchen waren teils tiefblau und blau, teils rosa mit Übergängen, im Gegensatze zu dem gut gramfreien Ausgangsmateriale. Meine Vermutung geht dahin, daß, da Hg in den Colibazillen durch Schwefelammon nicht nachweisbar war, die für die Gramfärbung in Betracht kommenden Zellstoffe (Nukleinproteine, Nukleinleizithine oder ähnliche Verbindungen) durch das Quecksilberchlorid (oder vielmehr durch seine H-Ionen?) eine chemische Änderung erleiden, welche zu dieser unterschiedlichen Färbung führen kann. Ähnliche Farbverhältnisse gerade beim

Colibacillus sind ja dem Bakteriologen eine nicht unbekannte Erscheinung. Nach dem Ausfalle der Vorprüfungen war eine Beeinflussung der Gramfärbung durch Sublimathärtung nicht anzunehmen, falls man sie auf 1 bis $1\frac{1}{2}$ Tage beschränkte.

Zu der bei der Färbung der Zellkerne und Kernteilungsfiguren von Erbsenkeimen angewandten Methode ist folgendes zuzufügen. Gefärbt wurde mit Gentiana- und Jodjodkaliumlösung 1 bis 2 Minuten lang, jedoch die Alkoholbehandlung wurde verschiedentlich abgeändert: $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Minute tröpfeln, Wasserspülung, Fuchsin, Wasser, 2 malige Alkoholspülung, Xylol, Balsam oder: ohne Gegenfärbung mit Fuchsin $\frac{1}{2}$ Minute Alkohol tröpfeln, Toluol, Balsam. Häkalaun ließen wir 15 Minuten auf das Präparat einwirken, darauf wurde es in der üblichen Weise weiter behandelt, also Waschen mit Leitungswasser, Entwässern mit abs. Alkohol, darauf Xylol, Balsam.

Man kann die Ergebnisse kurz dahin zusammenfassen, daß sich bei der Gramfärbung (und bei der mit Häkalaun) Kernkörperchen, Chromatinkörnchen, Chromosomen durchschnittlich gut gramfest (= schwarzblau und dunkelblau) verhalten, während die Spindelfasern anscheinend nur eine Blaufärbung zeigen. Von der Substanz, aus welcher Kernkörperchen, Chromatinkörnchen und Chromosomen aufgebaut sind, nimmt man an, daß sie aus Protein- und Nukleinverbindungen bestehe. Irgendwie gesichert ist diese Annahme nicht, und wenn man die Literatur über diesen Gegenstand überblickt (vgl. S. 296), so wird es klar, daß der Name „Nukleinverbindungen“ nur einen Sammelbegriff darstellt für Stoffe, welche bei der Spaltung Nuklein, Nukleinsäure von schwankender Zusammensetzung, nebst eiweißartigen Verbindungen, Zuckerarten u. a. m. liefern.

Durch die obigen Versuche wird nicht entschieden, ob die Gramfestigkeit der Kernkörperchen, Chromatinkörnchen und Chromosomen auf chemischen oder physikalischen Vorgängen beruht. Immerhin ist es auffallend und mit der Fischerschen Hypothese nicht in glatter Übereinstimmung, daß die kleinen Chromatinkörnchen sich ebensogut gramfest wie die Chromosomen färben lassen.

Zur Gramfärbung von Spermien.

Von Spermien wurden die des Stiers und des Menschen berücksichtigt; erwünscht wäre es in Hinblick auf die Untersuchungen von A. Kossel u. a. gewesen, Material auch vom Lachs und Hering zu verwenden (vgl. hierzu die Literaturzusammenstellung S. 298); wegen der Kriegsverhältnisse war dies leider nicht möglich. Das Stierspermienmaterial stammte von einem frisch geschlachteten, $1\frac{1}{2}$ bis 2 Jahre alten gesunden Bullen; zu den Färbungen wurden sowohl die Spermien des Hodens wie des Nebenhodens be-

nutzt. Die Versuchsanordnung schloß sich der schon früher angegebenen an; das Spermienmaterial wurde wieder in Reagenzgläsern angesetzt; an Reagenzien kamen folgende zur Anwendung: 2 n-, $\frac{n}{1}$ - und auch $\frac{n}{2}$ -Salzsäure bei 36°, 0.04 bis 0.36 n-Kalilauge bei 36°, $\frac{n}{2}$ -Buttersäure bei 36° und 25°, 97 prozent. Alkohol bei 36° und 3 Wochen bei 20°, Alkoholäther bei 20° 12 Tage lang. Angewandte Färbemethode war: je 1 Minute und $\frac{1}{2}$ Minute Alkohol ohne Tröpfeln.

Zu den Versuchen mit den Spermien ist zu sagen, daß allgemein die Gramfärbung der untersuchten Spermien durch zwei verschiedene Faktoren beeinflußt werden kann: 1. durch die schleimige Beschaffenheit des Samenblasensekretes, falls es durch chemische Reagenzien noch keine Veränderung erlitten hat, und 2. durch Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung. Was den ersten Fall betrifft, so hat sich gezeigt, daß die nicht zentrifugierten Spermien bei gleicher Färbungsweise ein blasserer Blau zeigen als die mit Wasser zentrifugierten; hierbei mag es dahingestellt bleiben, inwieweit wiederum der Zusatz von destilliertem Wasser zum Sekret auf die Färbbarkeit der Spermien von Einfluß ist. Daß physiologische Kochsalzlösung den positiven Ausfall der Gramreaktion mehr oder minder deutlich beeinträchtigen kann, wurde durch besondere Versuche an Stierspermien des Nebenhodens und an menschlichen Spermien erwiesen. Da also die beiden genannten Faktoren für die Färbbarkeit der Spermien von Bedeutung sein können, so war es schwierig, eine völlig einwandfreie Behandlungsweise des Materials anzuwenden. Im einzelnen ist von den Beobachtungen folgendes hervorzuheben.

Stierspermien.

Hier sowohl wie bei den menschlichen Spermien beobachtet man, daß ohne Vorbehandlung mit Chemikalien Kopf- und Schwanzteil unterschiedlich gefärbt werden: im Kopfteile herrscht mehr ein Blau vor, im Schwanzteile mehr eine rötliche Farbentönung. Bei den Stierspermien geht das Blau des Kopfhinterstückes in ein Blaßblau oder Rotblau über, während der Schwanzteil in seiner gesamten Länge eine rötliche Färbung besitzt; beim Verbindungsstück ist diese regelmäßig kräftiger und dunkler, doch selten ein reines Blau. Oft ist das Verbindungsstück durch dunkle, punktförmig aneinander gereihte Differenzierungen ausgezeichnet. Die Färbung des Kopfes ist allgemein blasser als bei den menschlichen Spermien und weist zum Unterschiede von diesen oftmals streifige, in der Längsrichtung des Kopfes liegende dunkelblaue Differenzierungen auf. Durchschnittlich ist der dem Halse anliegende Teil des Kopfes strichförmig dunkelblau und schwarzblau gefärbt. Bezüglich der Einwirkung von Salzsäure und Kalilauge auf die Stierspermien ist bemerkenswert,

daß Salzsäure bei kurzer Behandlung die zentral und die basal blau bis schwarzblau differenzierten Stellen des Kopfes zum Verschwinden bringt; die Färbung desselben macht einer mehr gleichmäßig blaßblauen und blaßblauroten Platz; nach 2 Tagen etwa ist der Kopfinhalt bei sehr vielen mehr oder weniger herausgelöst, so daß die wahrscheinlich inhaltsleeren Hüllen nur ganz blaß oder überhaupt nicht gefärbt erscheinen. Der Schwanzteil zeigt bei der Behandlung mit Salzsäure eine rote, blaurote und auch schwarzblaue Färbung. Ob die mehrfach hierbei beobachteten gramfesten Körnchen dem Kopfinhalte entstammen, ist ungewiß, aber nicht unwahrscheinlich. Zum Unterschiede von Salzsäure wirkt Kalilauge in der Weise ein, daß die Färbung des Kopfinhaltes — das ist ja die uns am meisten interessierende Frage — offensichtlich mehr oder weniger stark nach Rot umschlägt; bei längerer Einwirkung der Lauge scheint eine Zunahme der Rotfärbung nicht immer stattzufinden, wie Versuche zeigten. Kalilauge löst den Schwanzteil nach ziemlich kurzer Zeit fast ganz auf, nur das Kopfstück bleibt erhalten, während, wie erwähnt, Salzsäure die Eigenschaft besitzt, nur den Inhalt des Kopfes herauszulösen.

Menschliche Spermien.

Im Vergleiche zu den Stierspermien ist bei den menschlichen Spermien das Hinterstück des Kopfes gramfest; dieser tiefblau bis schwarzblau gefärbte Teil nimmt eine größere Fläche ein als bei den Stierspermien, und so können wir vielfach Spermienköpfe beobachten, bei denen die Hälfte und drei Viertel der Kopffläche blau, dunkler bis schwarzblau gefärbt sind, seltener zu einem Viertel und vier Vierteln. Wie bei den Stierspermien, so ist auch hier, abgesehen von den vollgefärbten (= vier Vierteln) Köpfen das Vorderstück nur ganz blaß (blaßblau und blaßblaurot) gefärbt; die Rundung der Kopfspitze ist deshalb häufig weniger deutlich sichtbar. Der rötliche und blaurote Ton herrscht, wie schon erwähnt, auch beim Schwanzteile der menschlichen Spermien vor. Der Hals erscheint oft ungefärbt, jedoch nicht so häufig wie bei den Stierspermien, das Verbindungsstück ist durch kräftigeren Farbton hervorgehoben und durch mehrere dunklere Pünktchen ausgezeichnet.

Die Einwirkung von Salzsäure und Kalilauge auf die Spermien vollzieht sich allgemein in gleicher Weise wie bei den Stierspermien: die Säure löst leicht den Kopfinhalt heraus; die schwach färbbaren Kopfhüllen mit den Schwänzen bleiben zurück, während Kalilauge nur den Schwanzteil weglöst. Daß $\frac{1}{2}$ -Buttersäure (4.4 prozent.) bei 36° und einer Dauer von 3 bis 21 Tagen nicht wie Salzsäure die Wirkung hat, den Kopfinhalt herauszulösen, wird wohl in der geringen Dissoziierbarkeit

dieser organischen Säure begründet sein. Die mehr oder minder starke Gramfestigkeit der Spermienköpfe des Menschen geht durch Salzsäure und Kalilauge deutlich und klarer als bei den Stierspermien nach der gramfreien Seite über. Bezüglich der Kaliwirkung beobachten wir die interessante Erscheinung, daß bei einigen Versuchen ein Teil der Köpfe, mitunter sogar der größere Teil, schwarzblau (= gut gramfest) gefärbt ist, ferner daß bei Einwirkung der Kalilauge unter gewissen Bedingungen die Gramfestigkeit, wie es scheint, zurückgeht und einer Blau- und Rotfärbung Platz macht. Neben gramfesten Spermienköpfen sieht man schon bei kurzer Kalieinwirkung (2prozentige KOH nach 7 Stunden bei 36°) die Hälfte und mehr gut gramfrei. Bemerkenswert ist hier, daß durch die 7stündige Einwirkung der 2prozentigen Kalilauge eine fast klare Lösung entstanden ist, aus der die Spermienköpfe (ohne die Schwänze) durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure wieder abgeschieden werden konnten, genau so, wie wir es bei analogen Versuchen mit gramfesten Bakterien beobachtet haben.

Allen diesen Versuchen mit Salzsäure und mit Kalilauge ist gemeinsam, daß die Färbung der Köpfe gleichmäßiger ist als beim Ausgangsmaterial; es fehlt durchschnittlich die Differenzierung des Kopfteles, wie wir sie beim Original finden.

Eine längere Aufbewahrung der Spermien in Alkohol und in Alkoholäther bei Zimmertemperatur scheint nach vorliegendem Versuchsmateriale keine merkliche Änderung in der Färbung hervorzurufen. Dies stimmt auch gut mit den Beobachtungen überein, welche bei der Behandlung von Bakterien mit Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln bei 17 bis 20° (vgl. S. 265 u. 268.) gemacht wurden.

Zur Biondifärbung der Spermien.

In seinem Werke bespricht G. Retzius das Verhalten der sich entwickelnden Spermien der Mammalier zu der Biondifärbung (6. Kap.); in der Tab. XXII finden sich farbige Abbildungen (Figg. 17 bis 27) reifer Spermien vom Menschen nach der Behandlung mit dem Ehrlich-Biondigemische.¹ Diese Biondifärbungen lassen einen Vergleich zu der von uns geschilderten Gramfärbung menschlicher Spermien zu. Retzius hebt bei den reifen Spermien die intensiv grüne Färbung des Kopfes hervor, besonders in der hinteren Partie desselben, während das Vorderstück sich bedeutend heller grün färbt. Wie bei den nach Gram gefärbten Spermien

¹ Es ist dies eine wässerige Lösung von Rubin-, Orange- und Methylgrünfarbstoff (Retzius).

sind auch bei den Retziusschen Präparaten voll, zur Hälfte und zu einem Viertel grün gefärbte Köpfe zu sehen; die Vollfärbung scheint aber nur bei den auf der schmalen Seite liegenden Köpfen einzutreten. Das Schwanzstück färbt sich nach beiden Färbemethoden ziemlich einheitlich, d. h. bei der Gramfärbung rötlich bis blaurot, bei der Biondifärbung rötlich; in beiden Fällen ist der Schwanzanhang mit der Manschette kräftiger gefärbt als der übrige Teil des Schwanzes. Während das Verbindungsstück nach der Retziusschen Zeichnung schwache, etwas verwischt aussehende Differenzierungen aufweist, beobachtet man bei der Gramfärbung des öfteren, jedoch nicht regelmäßig, durch kräftigeren Farbton hervorgehobene Punktierungen.

Aus dieser Gegenüberstellung ersieht man, daß die Grünfärbung nach Biondi der tief- bis schwarzblauen Färbung nach Gram entspricht. Die Grünfärbung der Spermienköpfe bleibt nach den Angaben von Retzius (a. a. O., S. 68) auch dann bestehen, wenn das Sperma eine starke Fäulnis durchgemacht hatte, eine Beobachtung, welche auch für die Gramfärbung zutrifft, wie aus einem mit schwach fauligem Material angestellten Versuche hervorgeht.

Nicht unerwähnt möge die Bemerkung von Retzius auf S. 68 (a. a. O.) bleiben, daß die Neigung zur Grünfärbung mit Biondi bei verschiedenen Tierklassen etwas wechselt; bei einigen davon scheint sie besonders stark ausgeprägt zu sein, bei anderen wieder in geringerem Maße. Analoge Verhältnisse finden sich, wie wir oben gesehen haben, bei den Spermien vom Stier und vom Menschen; auch hier ist die Farbstärke verschieden: eine Blau- bis blassere Färbung bei den Spermienköpfen des Stieres, eine Tiefblau- bis Schwarzblaufärbung bei denen des Menschen.

An dieser Stelle dürfte es angebracht sein, nicht bloß das über die chemische Zusammensetzung von Spermienköpfen Bekanntgewordene in Kürze anzuführen, sondern auch das, was überhaupt an Arbeiten über nukleinhaltige Verbindungen und Substanzen bis jetzt (1916) erschienen ist, da diese Untersuchungen in wenig übersichtlicher Weise in der Literatur wiedergegeben sind.

Zusammenstellung der in Betracht kommenden Literatur über nukleinhaltige Substanzen.

Die allgemeine Annahme geht dahin, daß im Zellkerne Nukleine, Nukleoproteide (Verbindungen von Nukleinsäuren mit verschiedenen eiweißartigen Stoffen) enthalten sind (vgl. Botazzi-Boruttau, Hammarsten, Heidenhain, Verworn, Abderhalden u. a.). Nach Botazzi-Boruttau „bilden die Proteide die morphologische Grundlage jedes Kernes wie auch jeden

Protoplasmas, den festorganisierten Anteil der zelligen Elemente, an welchen der Bestand des Lebens geknüpft ist. — Die Nukleoproteide reagieren sauer und verbinden sich leicht mit Alkalien.“ Verworn ist der Ansicht, daß die „echten“ Nukleine im Protoplasma ganz zu fehlen scheinen. Abderhalden nimmt in jeder Kernart spezifisch gebaute Eiweißanteile an, welche in den Nukleinen und Nukleoproteiden enthalten sind; so ist nach ihm die Eigenart des Abbaues bestimmter organischer Verbindungen für manche Mikroorganismen ebenso charakteristisch wie ihr morphologisches Verhalten und ihre übrigen biologischen Eigenschaften.

Im Anschlusse hieran mögen Angaben über Bakteriengifte kurz erwähnt werden. Kruse in seiner „Mikrobiologie“ (S. 857 und ff.) weist darauf hin, daß nach Dörr bei Diphtherie-, Dysenterie- und Staphylotoxin durch stark dissoziierte Säuren, nicht aber durch schwach dissoziierte, eine Abschwächung der Giftwirkung eintritt, bei lange andauernder Behandlung mit Säure eine Zerstörung des Giftes stattfindet. Bekannt ist ja auch, daß gegen Temperaturen die verschiedenen Gifte sich verschieden verhalten (S. 875); für jedes Gift gibt es eine Temperaturgrenze, bei der dasselbe seine Wirksamkeit einbüßt; in getrocknetem Zustande überstehen die Gifte eine Erhitzung viel besser, in Übereinstimmung mit den Enzymen, z. B. der Buchnerschen Hefenzymase: Von Wichtigkeit für uns ist noch die neuere Beobachtung Galeottis, daß ein aus Cholera-vibrionen durch Kali abgeschiedenes Nukleoproteid die charakteristischen Cholerasympptome bedingte.

Über die Färbung von Eiweißstoffen und nukleinhaltigen Substanzen.

Von den vielen in der Literatur verstreuten Angaben über das färberrische Verhalten von Eiweißstoffen füge ich nur einige an. Lilienfeld (1893) zeigte, daß aus einer Lösung von Methylgrün mit Fuchsin Eiweiß das Fuchsin, Nukleinsäure dagegen das Methylgrün mit starkem Farbton aufnehmen. A. Fischer, dessen Werk über Fixierung usw. des Protoplasmas schon angeführt worden ist, dehnte seine Färbungsversuche auf zahlreiche organische Gebilde und Verbindungen aus. Fischer unterscheidet hier regelmäßig zwischen Farbstoffen sauren und basischen Charakters. Serumalbumin- und -globulin, mit Alkohol gefällt, färben sich mit allen sauren und basischen Farbstoffen sehr stark, mit Ausnahme von Methylgrün; mit Sublimat gefällte Albumose wird in ihrer Färbbarkeit nicht beeinflusst, nur Methylgrün wird bei dieser Fällungsart etwas aufgenommen. Nuklein (aus Essigsäurefällung) färbt sich gleich gut mit sauren wie mit basischen Farbstoffen. Von Bedeutung für uns sind Fischers Versuche mit Nukleinsäure und mit Pepton. Hefenukleinsäure (durch Sublimatfällung) nimmt keine sauren Farbstoffe auf, dagegen basische sehr stark; diese sogenannte Acidophobie läßt sich nach Fischer auch durch Fixierungsmittel nicht beseitigen. Dagegen färbten sich gerinnselartige Gebilde von Albuminnukleat, durch Fällung von Serumalbumin mit Nukleinsäure entstanden, mit basischen und sauren Farben gleich gut. Nukleinsäure als Platinfällung nimmt saure Farbstoffe dann an, wenn ein tropfenweiser Zusatz von verdünnter Schwefelsäure zu den Farblösungen erfolgt; eine chemische Beeinflussung der Nukleinsäuregranula wird nach Fischer als ausgeschlossen betrachtet. Zu den „acidophoben“

Verbindungen gehört auch das Pepton, doch auch die basischen Farbstoffe sind hier von ziemlich geringer Färbekraft.

Von weiteren Forschern mag M. Heidenhain (1907) genannt werden, welcher der Ansicht ist, daß alle Eiweißkörper wegen ihrer sauren und basischen Natur nach 2 Seiten hin reagieren, da sie sowohl Farbbasen wie Farbsäuren aufzunehmen imstande sind; hierbei zeigt sich, daß bestimmte Eiweißverbindungen vorzugsweise nach der einen, andere nach der anderen Seite hin zu reagieren befähigt sind. In das für uns in Betracht kommende Gebiet fallen auch die Arbeiten von Feulgen (1912, 1913) über das Verhalten von Nukleinsäuren zu Farbstoffen; sein Hauptzweck war, zu prüfen, ob die Färbbarkeit des Zellkernes mit basischen Farbstoffen auf einer wirklichen Salzbildung oder nur auf einer Adsorptionerscheinung beruht. Er gewann u. a. eine Verbindung von Nukleinsäure (mittels Natriumnukleat; Formel = $C_{43}H_{57}N_{15}P_4O_{34}Na_4 \cdot 9H_2O$) mit Malachitgrün (wahrscheinlich ein nukleinsaures Malachitgrün), ferner ein nukleinsaures Malachitgrünleukohydrat, schwer rein erhältlich. Mit einem Nukleinate (aus einer Nukleinsäure von Kalbsthymus bereitet) des Kristallviolett-leukohydrates und einem der Methylenblau-base stellte er einige Löslichkeitsversuche an. Während die Kristallviolettverbindung in Methyl- und Äthylalkohol löslich war, aber nicht unverändert, zeichnete sich die Methylenblauverbindung dadurch aus, daß in den Lösungsmitteln keine Abspaltung der Farbbase eintrat. Bei späteren Versuchen benutzte Feulgen neben der Nukleinsäure aus Thymusdrüse eine Pankreasnukleinsäure und fand da, daß das thymusnukleinsaure Kristallviolett in methylalkoholischer Lösung sehr leicht die Hälfte seines Farbstoffgehaltes unter Bildung eines sauren Salzes abgibt, während das pankreasnukleinsaure Kristallviolett im Holzgeist sich als beständig erwies. Zu einer Entscheidung der Frage, ob Salzbildung oder Adsorption die Zellkernfärbung bedinge, kam Feulgen nicht. Einen beachtenswerten Beitrag zu dieser Frage brachte S. Skraup (1916) in einer Arbeit über „Vitalfärbung mit einfachsten Farbstoffen und ihre Fixierung“; auf Grund seiner experimentellen Versuche faßte er die Vitalfärbung und hiermit die Färbung überhaupt als eine Adsorptionerscheinung auf.

Über die Zusammensetzung und das chemische Verhalten von Protaminen und Nukleinsäuren.

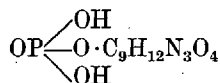
Miescher war der erste, welcher durch Ausziehen von Spermien des Rheinlachs ein Protamin darstellte; es ist eine starke Base, welche im Spermienkopfe als nukleinsaures Protamin enthalten sein soll; sie wird durch Sublimat und andere Eiweißfällungsmittel gefällt. Nach Ansicht Piccards war das Protamin Mieschers durch Guanin und Hypoxanthin verunreinigt. Später (von 1896 ab) beschäftigte sich A. Kossel eingehend mit der Untersuchung von Protaminen der Spermienköpfe. Die Darstellungsweise Kossels interessiert uns besonders; er verfuhr in folgender Weise, Die Testikeln des Lachs und des deutschen Störes wurden in bestimmter Weise mit Wasser bei gewöhnlicher Temperatur behandelt und vom Flüssigen nach Zusatz von wenig Essigsäure durch Filtration befreit; den Rückstand kochte er mehrmals mit Alkohol aus, zog ihn dann mit Äther aus und schüttelte

die zurückbleibenden, mit Alkohol und Äther ausgezogenen Anteile mehrmals mit 1 prozent. Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur durch. Aus dem schwefelsauren Filtrate wurde das Protaminsulfat durch Alkoholzusatz abgeschieden und gereinigt. Auf Grund von Elementaranalysen stellte Kossel eine vorläufige Formel für das aus Lachsspermien gewonnene Protaminsulfat auf; 1898 entschied er sich nach erneuter Darstellung dieser Verbindung für die Formel $C_{30}H_{59}N_{17}O_7 \cdot 2H_2SO_4$, welche er in Anlehnung an das Protamin aus Heringsspermien abänderte in $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot 2H_2SO_4 + H_2O$, da die Protamine nach Kossels Ansicht in mehreren Hydrationsstufen vorkommen, welche leicht ineinander übergehen können. Dieses Protaminsulfat aus Lachsspermien nannte er Salminsulfat und das aus Störspermien Sturinsulfat, dessen Zusammenhang wahrscheinlich folgender ist: $4C_{36}H_{69}N_{19}O_7 + 11H_2SO_4$. Für das aus Heringsspermien gewonnene Protaminsulfat, Clupeinsulfat genannt, schlug er die Formel $C_{30}H_{59}N_{17}O_7 \cdot 2H_2SO_4$ vor. Alle diese Protamine sind weiße lockere Produkte, wie scheint, ohne kristallinische Eigenschaften. Nach Kurajeff sollen Salmin und Clupein identisch sein; die Protamine geben mit Eiweiß oder Albumose dem Histon ähnliche Verbindungen; hierzu mag erklärend zugefügt werden, daß Abderhalden (Handbuch II, 1910, S. 446 nach Steudel) die Histone in die Mitte von den einfachen (wie den Protaminen) und den komplizierten Eiweißstoffen stellt. — 1897 untersuchte Mathews die Spermien eines Seeigels (*Arbacia*) und des Herings. Zerschnittene Hoden des Seeigels wurden, nachdem sie mehrere Monate in 92 prozent. Alkohol, wahrscheinlich bei gewöhnlicher Temperatur, gelegen hatten, mit Alkohol ausgekocht und mit Äther ausgezogen. Der Alkohol-Ätherauszug enthielt nun 16.4 Prozent Lezithin, 7.1 Prozent Cholesterin und 76.5 Prozent Fette u. ähnl. In dem derartig entfetteten Spermienmaterial wies Mathews Nukleinsäure (Formel = $C_{40}H_{54}N_{14}P_4O_{27}$) nach und an Stelle von Protamin das sogenannte Arbacin, welches eine kompliziertere Eiweißverbindung darstellt. Mathews ist der Ansicht, daß das „Chromatin“ des Spermienkopfes der *Arbacia* wahrscheinlich ganz oder teilweise aus einer Verbindung der Nukleinsäure mit Arbacin besteht; die Arbaciaspermien enthielten keine freie Nukleinsäure, auch kein in Ammoniak lösliches Nuklein. Er begründet seine Ansicht damit, daß vor der Behandlung der entfetteten Spermien mit 1 bis 2 prozent. Schwefelsäure keine Nukleinsäure durch Ausziehen mit Wasser oder Ammoniak abgeschieden werden konnte. Weiterhin gewann Mathews aus den Spermienköpfen des Herings nukleinsaures Protamin, dem er die Formel $C_{30}H_{57}N_{17}O_6 \cdot C_{40}H_{54}N_{14}P_4O_{27}$ zuschreibt. Auch Eber- und Stierspermien zog Mathews in den Kreis seiner Untersuchungen; besonders sind es die Stierspermien, welche uns interessieren. Miescher hatte in den Stierspermien kein Protamin nachweisen können; zu dem gleichen Ergebnisse kam auch Mathews; weder in den Stier- noch in den Eberspermien gelang es ihm nach der Kosselschen Methode, protamin- oder histonähnliche Verbindungen abzuscheiden, nur Spuren eines nicht näher von ihm beschriebenen Eiweißkörpers erhielt er. — Aus den mit Alkohol und mit Äther vorbehandelten Spermien der Makrele gewann Kurajeff 1898 nach der Kosselschen Methode (unter Anwendung von 1 prozent. Schwefelsäure) ein Protaminsulfat, Scombrinsulfat genannt, welches gereinigt die Zusammensetzung $C_{30}H_{60}N_{16}O_6 \cdot$

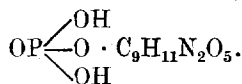
$2\text{H}_2\text{SO}_4$ und $\alpha_D = -71.81^\circ$ hatte. Kurajeffs Ansicht geht dahin, daß in den Spermien verschiedener Tiere Protamin mit Nukleinstoffen verbunden enthalten sei (vgl. hierzu die Ergebnisse von Mathews bei den Stier- und Eberspermien!). — Nach Malenück kommt auch in den Spermien des russischen Störes (*Accipenser Guldenstädtii*) ein Protamin vor; er arbeitete nach der Kosselschen Methode; das Material wurde vorher mit Alkohol ausgekocht und darauf mit Äther im Soxhlet ausgezogen. Zusammensetzung des Protaminsulfates = $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{N}_{13}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4$ (vgl. auch oben die von Kossel für Sturinsulfat aufgestellte Formel!). — A. Kossel und Kutscher (1900) gewannen aus den reifen Spermien von *Gadus* (Kablja) ein Histon (*Gadushiston*) und Ehrström (1901) aus den reifen Spermien von *Lota vulgaris* das Lotahiston. — Dezani (1909) fand, daß die aus Thunfischspermien abgeschiedenen Proteinbasen sich in ihrem Verhalten den Histonen nähern. — Zur Gewinnung von Nukleinsäure behandelte Steudel (1911) Heringsspermien in folgender Weise. Die Spermien wurden häufig mit Wasser zentrifugiert, hierbei blieben nur die Köpfe im Sediment als schweres weißes Pulver zurück; den Rest der Schwänze entfernte er durch erschöpfendes Ausziehen mit Alkohol und mit Äther. Aus diesem Spermienmaterial schied er eine Nukleinsäure von der Zusammensetzung $\text{C}_{43}\text{H}_{57}\text{N}_{15}\text{P}_4\text{O}_{30}$ ab.

Hiermit schließen in der Hauptsache die Versuche mit Spermienmaterial ab; dafür setzen Arbeiten ein, welche u. a. besonders die Erforschung des Abbaues von Nukleinsäuren zum Ziele haben. Im folgenden ist eine Auswahl solcher Arbeiten (bis 1916) mitgeteilt, soweit sie uns für das vorliegende Untersuchungsmaterial von einiger Bedeutung zu sein schienen.

Levene und Jacobs (1911) nehmen bei der Hefennukleinsäure an, daß sie aus 4 „Nukleotid“ genannten Komplexen besteht, welche der Inosinsäure und Guanylsäure analog zusammengesetzt sind; durch gemäßigte Hydrolyse der Hefennukleinsäure gelang es ihnen, ein Pyrimidinnukleotid (Cytidin-Nukleotid) =



darzustellen und das Uridin-Nukleotid (Uridinphosphorsäure, s. u.) =

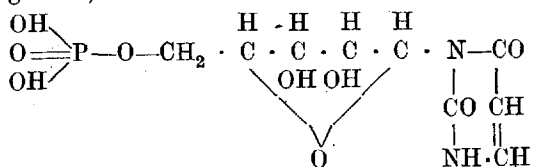


In einer Mitteilung in Gemeinschaft mit La Forge (1912) faßt Levene seine Ansicht dahin zusammen, daß die organischen Komplexe der Hefennukleinsäure zum Teil aus Purin-, zum Teil aus Pyrimidinbasen zusammengesetzt sind. Die Pyrimidinkomplexe sind entgegen den Purinkomplexen durch ihre Widerstandskraft gegenüber der hydrolysierenden Wirkung von verdünnten Mineralsäuren und Enzymen ausgezeichnet; die Pyrimidinkernkomplexe bestehen aus Pyrimidin + Ribose, miteinander glykosidartig gebunden. Levene und La Forge gaben dem Pyrimidinkerne die Form eines C- und N-haltigen, sechsgliedrigen Ringes. — Plimmer und Scott (1908) machen über das chemische Verhalten von Nukleinsäure (Hefennukleinsäure?) interessante Angaben. Nukleinsäure ebenso wie Nukleoproteine sind gegen

Salzsäure wenig beständig; es wird hierbei Phosphorsäure langsam abgespalten, während sogenannte Phosphoproteine durch Salzsäure unter gleichen Bedingungen nicht verändert werden. Läßt man auf Nukleinsäure bei 37° 1 prozent. wässrige Natronlauge 24 Stunden lang einwirken, so wird kein P als Phosphorsäure abgeschieden. Als Plimmer (1913) auf Nukleinsäuren, welche aus Thymus, Weizen oder Fleisch dargestellt waren, die Fermente des Darmkanals einwirken ließ, beobachtete er eine Hydrolyse dieser Säure; wurde statt der Fermente n-Salzsäure ($\frac{P}{1}$ bis 2n) benutzt, so war die Hydrolyse der Nukleinsäure erst nach 8 Tagen bei einer Temperatur von 75° beendet; 76 Tage dagegen währte es, wenn man an Stelle von Salzsäure $\frac{P}{1}$ - bis 2n-Natronlauge derselben Temperatur anwendete, wobei noch ein kleiner Teil unveränderter Nukleinsäure im Reaktionsgemische zurückblieb. Plimmer stellte außerdem vergleichende hydrolytische Versuche an mit organischen Phosphorverbindungen wie Glycerophosphorsäureester, Phosphorsäureäthylester, Hexosephosphorsäure und einer „Phytinsäure“: es werden Glycerophosphorsäureester, Phosphorsäureäthylester und noch langsamer Phytinsäure durch Säuren hydrolytisch gespalten, die beiden ersteren in 10 Tagen bei 92°, Phytinsäure in 8 Tagen, aber nur zur Hälfte; Alkali ist bei allen dreien ohne jede Einwirkung, während Hexosephosphorsäure durch n-Alkali ($\frac{P}{1}$ bis 2n) in 1 Tage, durch n-Salzsäure in 3 bis 5 Tagen hydrolysiert wird. — In bezug auf die obigen Ergebnisse von Levene und La Forge ist eine Mitteilung Steudels (1912) beachtenswert, welcher zu dem Schlusse kommt, daß bei der Thymusnukleinsäure eine glykosidartige Bindung N-haltiger Körper mit dem Hexosemolekül anzunehmen ist. — Im Anschlusse an die Steudelsche Arbeit mögen die von Johnson und Chernoff (1913) und die von van Ekenstein und Blanksma (1914) erwähnt werden. Es ist bemerkenswert, daß diese Forscher ebenso Levene und La Forge im Gegensatz zu Steudel, welcher an Thymusnukleinsäure eine Hexose abschied, aus Nukleinsäuren eine Pentose und zwar Ribose erhielten; v. Ekenstein und Blanksma bezeichnen sie als *d*-Ribose. Von der Johnson-Chernoffschen Arbeit interessiert noch das Folgende. Ihre Versuche stellten Johnson und Chernoff mit Nukleinsäuren, aus Hefe und aus Thymusdrüse gewonnen, an; sie fassen wie Levene und La Forge (s. oben) die Nukleinsäure als Polynukleotide auf, welche bei gemäßigter Hydrolyse das Nukleotid liefern und sich bei weiterer Hydrolyse in Purin- und Pyrimidinbasen nebst Kohlenhydrate spalten; die Spaltstücke dieser Nukleotide sind die Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und eine Pentose, nämlich Ribose. Johnson und Chernoff fassen Pyrimidinnukleotid als ein Additionsprodukt eines Pyrimidins und eines Zuckers auf. In Übereinstimmung mit Levene und La Forge fanden sie, daß die pyrimidinhaltigen Nukleotide schwer hydrolysierbar sind; erst konz. Säure bei Temperaturen von 120 bis 130° führen Spaltung herbei, während die purinhaltigen Komplexe durch verdünnte Säuren leicht zu hydrolysieren sind. Folgende Arbeiten über die Einwirkung von Fermenten u. a. auf Nukleinsäure mögen noch kurz angeführt werden. Hefennukleinsäure wird nach de la Blanchardière (1913) durch die Fermente des Thymus und der Leber abgebaut, durch Hefepulver bei 40° unter Zusatz von Chloroform nach Versuchen von Jones und Richards (1914) in das Guanosinsalz der Guanylsäure ge-

spalten, liefert nach Thannhauser (1914) mit menschlichem Duodenalsaft bei 37° unter Zusatz von Toluol nach Verlauf von 72 Stunden eine „Triphosphonukleinsäure“ genannte Verbindung $C_{32}H_{49}O_{23}N_{15}P_3$. Hydrolysiert man nach Thannhauser und Dorfmueller (1914) Hefenukleinsäure in ammoniakalischer Lösung bei 120 bis 125° u. Druck, so entstehen zwei kristallinische Substanzen, von denen die eine (Triphosphonukleinsäure) näher untersucht wurde (s. w. u.). Die Eigenschaften der Nukleinsäure werden von Steudel in Abderhaldens Handbuch II, 1910, S. 575 etwa wie folgt beschrieben. Die Nukleinsäure ist schwer löslich in kaltem Wasser, in heißem nur unter Zersetzung löslich, unlöslich in Alkohol und Äther. Die „echte“ Nukleinsäure dreht das polarisierte Licht nach rechts; Steudel faßt diese „echte“ Nukleinsäure als eine Tetrametaphosphorsäure auf, welche, den Glycerinphosphorsäuren ähnlich, an jedem P-Atome eine Hexosengruppe (und auch Pentosengruppe, D.) enthält, an die je ein Molekül Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin gebunden ist. — Schließlich möge hier noch der schematische Abbau von Nukleoprotein durch Pepsin zur besseren Übersicht mitgeteilt werden (vgl. z. B. Euler-Lindner). Man nimmt an, daß Nukleoprotein hierbei in eine Eiweißart und ein Nuklein gespalten wird, worauf das Nuklein durch NaOH in Nukleinsäure und eine Eiweißart zerfällt und die Nukleinsäure durch Einwirkung bestimmter Agentien weiter in kleinere Spaltstücke wie Pyrimidin- und Purinbasen, Kohlenhydrate usw. — Daß über Nuklein, über sein Verhalten und ähnliches nur ganz wenig bekannt geworden ist, wird aus Obigem ersichtlich. Diesem mag nur noch zugefügt werden, daß zur Darstellung von Nuklein nach Kossel Hefeschlamm in ganz verdünnte Natronlauge eingetragen wird, worauf das Reaktionsgemisch sofort in verdünnter Salzsäure filtriert wird; durch die Säure wird das gelöste Nuklein zur Ausscheidung gebracht.

(Während des Druckes erschienen.) Nach den neuesten wertvollen Untersuchungen von Thannhauser und Dorfmueller besitzt die Triphosphonukleinsäure die Formel $C_{32}H_{42}O_{23}N_{13}P_3$; sie stellen u. a. für die Uridinphosphorsäure folgende Konstitutionsformel auf (die für Triphosphonukleinsäure s. im Orig. nach):



Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse; Folgerungen hieraus.

Auf S. 248 und 254 haben die Versuche von Aureus, Mycoides und Hefe mit stark und schwach ionisierten Säuren ergeben, daß diese Bakterien hierdurch mehr oder weniger gramfrei werden; beschleunigt wird dieser Vorgang durch Erhöhung der Reaktionstemperatur und der Säurekonzentration. Ganz nach der Größe ihrer Dissoziation¹ wirken die Säuren

¹ Milchsäure als einzige der bis jetzt untersuchten Säuren macht eine Ausnahme.

(vgl. die messenden Versuche mit Hefe, S. 253); starke führen in kurzer Zeit den Verlust der Gramfestigkeit herbei, mittelstarke langsamer und schwache, wie die Ameisensäure bei einer Konzentration von $\frac{1}{2}$, fast gar nicht; niedrige Temperaturen, wie 8° und tiefer, verlangsamen den Übergang zu Rot im Vergleiche zu den höheren Temperaturen wie 22° und 36° ; die Reaktionsgeschwindigkeit wird also herabgedrückt wie bei chemischen Prozessen. Andere gramfeste Bakterien, wie Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand, Actinomyces und Bulgaricus, werden gleichfalls durch die stark dissoziierte Salzsäure unter den verschiedensten Versuchsbedingungen (S. 257) gramfrei. Auch Alkalilaugen (0.04n bis $\frac{1}{2}$ -Kalilauge) führen bei Aureus, Mycoides und Hefe diese Umwandlung herbei (S. 258 bis 260); $\frac{1}{1}$ -Soda- und Pottaschelösungen sind in Anbetracht ihrer geringeren OH-Konzentration schwächer. In der Wirkungsweise der Alkalikarbonate bestehen zwischen Hefe einerseits und Aureus nebst Mycoides andererseits Unterschiede. Hefe wird durch die Karbonate mehr oder weniger schnell gramfrei, während unter den gleichen Versuchsbedingungen Aureus und Mycoides nur schwach oder fast unmerklich beeinflußt werden. Im Gegensatze zu Hefe, Mycoides und Aureus werden Diphtherie, Pseudodiphtherie und Subtilis durch 0.04- bis 0.18n-Kalilauge ziemlich unverändert gelassen, nur Actinomyces und Bulgaricus nehmen die rote Fuchsinfarbe an (S. 260 u. 261). Wie Versuche mit dem gramfreien Colibacillus zeigen (S. 262 bis 291), wird derselbe durch Salzsäure, Kalilauge und Alkohol im wesentlichen nicht verändert, doch hat es den Anschein, als ob er durch diese Agenzien einheitlicher rotgefärbt wird; die vor der Behandlung schwach oder undeutlich gramfest gefärbten Stäbchen sind fast ganz verschwunden. Lösungsmittel, wie Alkohol, Azeton, auch Wasser (S. 264 bis 269) wirken bei höherer Temperatur von etwa 65° an in der Weise auf Hefe, Mycoides und Aureus, daß die Zellsubstanz nicht mehr die gramfeste Färbung annimmt. Diese Wirkung ist mit größter Wahrscheinlichkeit der Hydroxyl- oder einer analog zusammengesetzten Atomgruppe der genannten Lösungsmittel zuzuschreiben; im Verein mit der höheren Temperatur leiten die Lösungsmittel eine Hydrolyse der die Gramfärbung bedingenden Zellstoffe ein; daß es hierbei zu einer Abspaltung und folgenden Herauslösung von fettähnlichen Stoffen (z. B. Lipoidverbindungen) kommt, ist anzunehmen.

Es gibt chemische Verbindungen einfacherer und komplizierterer Zusammensetzung, welche sich bei der Gramfärbung unter den in dieser Arbeit angewandten Versuchsbedingungen deutlich verschieden verhalten: teils gut gramfest, teils weniger bis gramfrei (S. 284 bis 290). Zu den gramfesten Stoffen sind Hefennuklein und Hefennukleinsäure zu rechnen,

eine Mittelstellung nehmen Hühnereiweiß und Kasein ein, während Kieselgur nach der gramfreien Seite neigt; Quarzsand, feinstens zerrieben, bleibt so gut wie ungefärbt, desgleichen Pepton. Auch A. Fischer fand, daß die basischen Farbstoffe, wie Fuchsin, Safranin, Gentiana u. ä., gegenüber dem „Platinpepton“ (durch Fällen mit Platinchlorid erhalten) in ihrer Färbekraft stark gehemmt sind. Nicht nur Nuklein und Nukleinsäure nehmen die Gramfarbe an, sondern auch Zellkerne. So färben sich die Kerne der Zungenepithelien, ferner bei den Erbsenkeimen Kernkörperchen, Chromatinkörnchen und Chromosomen gut gramfest. Von den Spermien des Stieres und des Menschen zeigen nur die letzteren eine ausgesprochene Neigung zur Gramfestigkeit, weniger im allgemeinen die Stierspermien.

Zur Klärung der etwas verwickelten Verhältnisse, die bei der Einwirkung von Salzsäure und besonders von Alkalien auf die Gramfärbung verschiedener Bakterien auftreten, sind die Beobachtungen von Levene und von Plimmer wichtig (S. 300). Levene fand, daß sich die purin- und pyrimidinhaltigen Komplexe der Hefennukleinsäure verschieden gegenüber dem hydrolysierenden Einflusse verdünnter Mineralsäuren verhalten: die pyrimidinhaltigen Komplexe werden schwieriger, d. h. weniger schnell hydrolysiert als die purinhaltigen. Plimmer konnte zeigen, daß Nukleinsäure und Nukleinproteine gegen Salzsäure wenig beständig sind, da sie langsam Phosphorsäure abspalten; viel beständiger sind die sog. Phosphoproteine gegenüber dieser Säure. Verschieden ist die Wirkung von Natronlauge auf Nukleinsäure; hier wird kein Phosphor aus dem Molekül herausgezogen. Und so nimmt die Hydrolyse der Nukleinsäure durch Natronlauge eine viel längere Zeit in Anspruch als die mit Salzsäure. Weiterhin für uns wichtig sind die Versuche Plimmers mit den einfachen Phosphorsäureestern: dem Glyzerophosphorsäureester, Phosphorsäureäthylester und der Hexosephosphorsäure; auch hier tritt eine verschiedene Wirkungsweise von Säure und Alkali in Erscheinung: Säuren wirken langsam hydrolysierend, Alkalien bleiben im allgemeinen ohne Wirkung; Hexosephosphorsäure dagegen wird durch Alkali schneller hydrolysiert als durch Salzsäure. Diese Unterschiede in dem Verhalten gegen Salzsäure und Alkali finden wir auch bei den von uns untersuchten Bakterien wieder. Manche hierbei gemachte Erscheinung, so z. B. das abweichende Verhalten von Hefe, Mycoides, Aureus, Actinomyces, Bulgaricus einerseits und Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis andererseits gegen Kali läßt sich durch die obigen Untersuchungen von Levene und von Plimmer erklären. Dieses übereinstimmende oder abweichende Verhalten im Reaktionsmechanismus führt uns dazu anzunehmen, daß das Wesen der Gramfestigkeit von Bakterien an das Vorhandensein be-

stimmter organischer chemischer Verbindungen im Zelleibe gebunden ist, diese organischen Verbindungen scheinen in das große, nur wenig durchforschte Gebiet der Nukleoproteide mit ihren verschiedenartigen, an dem Molekül hängenden Komplexen und Seitenketten zu gehören. Macht man diese Annahme, so lassen sich die meisten der hier und von anderer Seite gemachten Beobachtungen und Erscheinungen ziemlich zwanglos erklären: so der Einfluß von Säuren und Alkalien oder der von Alkohol, Azeton, Wasser bei höheren Temperaturen; H- und OH-Ionen treten hier in Wirksamkeit. Findet beispielsweise in manchen Fällen bei Anwendung von Kali keine oder schwache Wirkung statt, so läßt sich dies in ungezwungener Weise dahin deuten, daß es sich hierbei um festere oder anders geartete Kerngebilde handelt, ähnlich den pyrimidinhaltigen Kernen im Vergleiche zu den purinhaltigen.¹ Der Verlust der Gramfestigkeit ist dann auf eine Hydrolyse und Spaltung ester- oder glykosidartiger, primär noch nicht erfaßter Nukleoproteidverbindungen zurückzuführen, deren Spaltstücke gramfrei sind.² Unter dieser Voraussetzung sind auch Zwischenstufen in den Gramverhalten der Spaltstücke denkbar: je nach der Art der Komplexe und Seitenketten in den Nukleoproteidverbindungen und je nach der chemischen Zusammensetzung der Spaltstücke werden sich diese mehr oder weniger nach Gram färben lassen; als Beispiel hierfür können die Färbungsverhältnisse bei den Stierspermien dienen.

Meine Ansicht, daß die Gramfestigkeit von Bakterien auf einen Gehalt gramfester Nukleoproteide oder nukleoproteidähnlicher Verbindungen im Zelleibe zurückzuführen ist, konnte bei der Bedeutung dieser Frage wesentlich gestützt und sichergestellt werden, wenn der Nachweis gelänge, daß der Bakterienleib faßbare grambeständige Stoffe enthält; solche Stoffe mußten sich auch nach Zertrümmerung der Bakterienzelle als gramfest erweisen, falls chemische Eingriffe hierbei vermieden wurden. Dazu eignete sich in ausgezeichneter Weise die wohlbekannte Buchnersche Methode der Zymasegewinnung durch Zerreiben des Zellenmaterials mittels Quarz-

¹ Wie weit sekundäre Einflüsse fördernd oder hindernd hier mitspielen, muß bei dem augenblicklichen Stande der Eiweißchemie unerörtert bleiben.

² Es sei mir gestattet, meiner Auffassung über das chemische Verhalten des Zellkernes Ausdruck zu verleihen. Meine Ansicht geht dahin, daß im entwicklungsfähigen Zellkerne die in ihm enthaltenen Nukleoproteid- und ähnlichen Verbindungen die Fähigkeit besitzen müssen, mit Wasser aufzuquellen. Unter dieser Voraussetzung sind dann diese Nukleinverbindungen imstande, vielleicht mit Hilfe von geringen Mengen Salzen, chemische Reaktionen einzugehen, welche von einem Abbau und folgenden Aufbau (Synthese) bestimmter organischer Verbindungen begleitet sind. Man könnte sich dann den entwicklungsfähigen Zellkern als eine mikrochemische Fabrik auf- und abbauender Nukleinverbindungen vorstellen.

sandes und Kieselgur: Chemische Einflüsse waren hier ausgeschlossen, eine Beeinflussung des Bakterienmaterials beim Zerreiben desselben mit Sand und Kieselgur durch Erwärmung des Gemisches war nach den Versuchen von Macfadyen und seinen Mitarbeitern denkbar und bei der Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse zu berücksichtigen. Nach den Beobachtungen derjenigen Forscher, welche sich mit der Zymasegewinnung beschäftigt haben, konnte eine Schädigung des zerriebenen Gemisches durch Erwärmung desselben nur quantitativer Art sein, nicht qualitativer. Durch diese Überlegungen geleitet, wurden Hefe und Mycoides nach dem Buchnerschen Verfahren behandelt.

Färbung von Hefe und Mycoides nach dem Zerreiben mit Quarzsand und Kieselgur; Färbung des Buchnerschen Hefepreßsaftes nach Gram.

Über die Anordnung der Versuche ist folgendes zu sagen. Das Zerreiben mit Quarzsand und Kieselgur und die übrigen Operationen wurden, soweit Hefe in Frage kam, genau nach der Vorschrift von Buchner vorgenommen; es erübrigt sich daher, näher darauf einzugehen. Das Mischungsverhältnis von Quarz und Kieselgur betrug bei Hefe wie bei Mycoides 1:0.3 (nach Buchner). An Hefe wurden für die Zymasegewinnung 500 g frische und abgepreßte Brauereihefe von Riebeck & Co., Leipzig, in Arbeit genommen; der Direktion derselben und insbesondere Herrn Chefchemiker Singewald für die so bereitwillige Überlassung der in den Kriegszeiten wertvollen Hefematerialien bin ich zu Dank verpflichtet.

Mycoides wurde für die Versuche 2 mal auf Agar übergeimpft; bei der einen Versuchsreihe wurde das Material vorher mit destilliertem Wasser zentrifugiert, bei der anderen, wo größere Mengen zur Verwendung gelangten, unterließen wir diese Vorbehandlung.

Quarzsand wurde durch Salzsäure und Waschen mit Wasser gereinigt und gegläht; Kieselgur (Präparat des Hygienischen Instituts) fand ohne weiteres Verwendung.

Der nach Buchners Vorschrift gewonnene Hefepreßsaft wurde in 4 Fraktionen gesondert aufgefangen; Gewicht des vereinigten Preßsaftes = 119 g. Die einzelnen Fraktionen des Preßsaftes wurden auf ihre Gramfärbbarkeit in der Weise untersucht, daß wir Proben in dünner Schicht auf Deckgläser verteilen und sie $\frac{1}{4}$ Stunde an der Luft antrocknen ließen. Zur Prüfung auf Gärtüchtigkeit setzten wir auch eine Probe mit dem aus den 4 Fraktionen vereinigten Preßsaft an, nachdem er 1 Tag bei 5 bis 10° gestanden hatte. Es wurden hierzu 2 Einhornsche Gärröhrchen benützt; in das eine kam eine Lösung von 8 g Rohrzucker in 20 ccm Hefepreßsaft (= 7 ccm etwa), in das andere nur Preßsaft. Nach Zusatz von je 2 Tropfen Toluol und Verschuß der offenen Schenkel mit Quecksilber wurden die Röhrchen einer Temperatur von 20 bis 23° ausgesetzt. In dem Röhrchen mit dem Zuckerhefesaft begann sehr bald eine ziemlich stürmische Gärung; schon nach etwa

4 Stunden wurde der größte Teil der Gärflüssigkeit in das Kugelhöhrchen getrieben; die Gärung setzte auch dann noch weiter fort, wogegen das Kontrollhöhrchen nach Verlauf nach 6 und mehr Stunden im geschlossenen Schenkel nur geringfügige Schaumbildung zeigte. Die Gärthätigkeit des gewonnenen Hefepreßsaftes war damit erwiesen.

Der Preßrückstand von der Zymasedarstellung wurde zum Schlusse langsam auf etwa 250 Atm. Druck ausgepreßt; von diesem Rückstand wurden ebenfalls Deckglasproben in der obigen Weise angefertigt und nach Gram gefärbt.

Es sei noch bemerkt, daß alle für die Hefesaftgewinnung notwendigen Operationen hintereinander ausgeführt wurden. Färbungsversuche wurden auch mit lose durchgemischtem Bakterienmaterial ange stellt. Hierzu wurden Quarzsand und Kieselgur im bekannten Verhältnisse von 1:0.3 im Mörser feinstens zerrieben, dann Hefe (etwa 1 g) bzw. Mycoides hinzugegeben, und das Ganze lose und unter gelindem Druck mit Hilfe eines Nickelspatels verteilt. Nachdem davon Proben mit wenig Wasser auf Deckgläser verteilt waren, wurde die Bakterienmischung dann mit Pistill im Mörser $\frac{1}{2}$ und $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden kräftig zerrieben und gleichfalls zu Färbversuchen benutzt.

Von Färbemethoden kamen die folgenden in Betracht:

- a) je 1 Min. und $\frac{1}{4}$ Min. tröpfeln
- b) „ 1 „ „ $\frac{1}{2}$ „ „
- c) „ 1 „ „ $\frac{1}{2}$ „ ohne Tröpfeln.

a) b) und c) wurden bei Hefe, a) und c) bei Mycoides angewendet. Es folgen die Ergebnisse.

Hefe.

Die im Mörser mit Pistill kräftig zerriebene Bakterienmischung (im Gewichte von 1 bis 2 g) zeigte keine unversehrte Zellen mehr, nur noch größere, kleinere und kleinste Zellstücke, von denen sich ein guter Teil gramfest verhielt, während der andere sich in Abstufungen bis zu Rot (auch in Form von feinem Gerinnsel) färben ließ. Kieselgur war hier wie in früheren Fällen rosa, rot und bläulichrosa gefärbt, Quarzsand fast farblos, nur peripherisch etwas schwach bläulich oder rötlich.

Der Augenschein lehrte deutlich, daß in der Hefezelle eine Substanz enthalten ist, welche Trägerin der Gramfestigkeit ist. Sowohl bei derartigen Hefemischungen als auch bei den mit Mycoides, kann man die Beobachtung machen, daß ein Teil des mikroskopischen Bildes tiefblau und blau erscheint, der andere dagegen mehr oder weniger den rötlichen Ton besitzt. Das sind nicht Zufälligkeiten, welche dem Färbeprozesse anhaften, sondern diese Farbenunterschiede sind, wie viele Versuche gelehrt haben, darauf zurückzuführen, daß die gelösten und die ungelösten Anteile des Präparates beim Antrocknen sich ganz nach ihrer physikalischen Beschaffenheit auf dem Deckglase gruppieren.

Bei der Durchmusterung der eben geschilderten Präparate findet man keine Anhaltspunkte für die Bestätigung der Fischerschen Hypothese, daß die Gramfärbung sich nach der Korngröße richtet oder daß die substanzreicheren Partikelchen durchschnittlich die Gramfärbung länger behalten als substanzärmere.

Die Versuche mit dem lose durchmischten Materiale zeigen, daß bei sorgsamer und feiner Verteilung des Präparates auf dem Deckglase sich keine Unterschiede in der Färbung bemerkbar machen. Bezüglich der Versuche mit größeren Mengen Hefemischung (im Gewichte von 500 g) beobachtet man u. a. farblose, inhaltsleere Zellen; es hat den Anschein, als ob die den Zellinhalt umschließende Membran die Eigenschaft besitzt, das Herauslösen der Gramfarbe bei der Behandlung mit Alkohol zu verlangsamen. Das mikroskopische Bild des Preßrückstandes von der Zymasedarstellung unterscheidet sich nicht erheblich von dem der vorigen Mischung. Auch hier beobachtet man farblose, fast inhaltsleere Zellen, welche durch schwarzblaue oder dunkelrote Differenzierungen ausgezeichnet sind.

Übersichtlicher sind die mikroskopischen Bilder, welche man bei der Färbung der vier Fraktionen des Preßsaftes erhält. Alle vier zeigen feinstes und gleichmäßig verteiltes Gerinnsel; der kleinere Teil davon ist gramfest (tiefblau bis schwarzblau), der größere gramfrei.¹ Mithin gehen auch in den Hefepreßsaft gramfeste Bestandteile des Zellinhaltes über. Dies ist eine weitere Stütze für die Annahme, daß es eiweißartige Substanzen und insbesondere Nukleoproteinverbindungen sind, welche die Gramfestigkeit der Hefe bedingen. Irgendwie wesentliche Unterschiede im Färbeverhalten der einzelnen Fraktionen waren nicht zu erkennen; dagegen zeigte sich der 4 Wochen alte Preßsaft verändert; es war nur rotes, rötliches oder höchstens bläulichrotes Gerinnsel zu sehen. Dies ist nach den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen auf eine allmählich einsetzende chemische Umwandlung der gramfesten Bestandteile des Preßsaftes bei der Aufbewahrung zurückzuführen.

Mycoides.

Die Versuche lassen klar und deutlich erkennen, daß auch Mycoides nach dem Zerreiben mit Quarzsand und Kieselgur zwei verschieden färbbare Bestandteile besitzt, einen gramfesten und einen gramfreien. Man sieht guterhaltene gramfeste Teile von Stäbchen, welche durch den Quarz-

¹ Hefepreßsaft enthält ziemliche Mengen Kieselsäure, welche von der benutzten Kieselgur herrühren (Wróblewski, Buchner, Zymasegärung. S. 71).

sand glatt quer durchschnitten sind. Die der Mycoideskultur anhaftende Schleimsubstanz neigt offensichtlich nach der gramfreien Seite, desgleichen Kieselgur (vgl. oben), während die Quarzstückchen, auch die kleinsten Splitterchen, fast ungefärbt sind.

Im Zusammenhange mit obigen und anderen Versuchen dieser Arbeit stehen folgende Untersuchungen, welche an dieser Stelle besprochen werden mögen: E. u. H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, A. Wróblewski, Über den Buchnerschen Hefepreßsaft und Kruse, Bürgers, Schermann und Schreiber, Beziehungen zwischen Plasmolyse, Verdaulichkeit, Löslichkeit und Färbbarkeit von Bakterien; Auflösungserscheinungen von Bakterien.

Daß Enzyme und Zymase, wie Buchner und Hahn (S. 230, Zymasegärung) fanden, durch Alkohol und noch viel stärker durch Methylalkohol, dem Anfangsgliede der homologen Reihe der Alkohole, geschädigt werden, findet durch die Versuche vorliegender Arbeit (S. 265 u. ff.) seine Erklärung: die eiweißartigen Stoffe (Nukleoproteid- und ähnliche Verbindungen) werden, soweit Äthylalkohol in Betracht kommt, durch die OH-Gruppe chemisch verändert und zwar stärker als durch Äther, welcher indifferent zu sein scheint; aus diesem Grunde ist von Buchner, Hahn und Rapp zur Abtötung der Hefezellen bei der Gewinnung von Dauerhefe ein Gemisch von Alkohol (oder Azeton nach Rapp) mit Äther erfolgreich benutzt worden. Über das chemische und physikalische Verhalten dieser Hefeeiweißstoffe erfahren wir von Wróblewski manches Wichtige. Er stellte fest, daß die Gärkraft der Zymase durch Zusätze von ganz kleinen Mengen Salzsäure oder Essigsäure (schon bei 0.05 Prozent) verringert wird; Natronlauge (bei etwa 0.1 Prozent) erhöht dieselbe (durch Bildung von Phosphaten? Verf.), bei einem Gehalte von 0.2 Prozent verschwindet die Fermentation. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen kommt Wróblewski zu dem Schlusse: „Die vergärende Wirkung der Zymase ist ohne Zweifel ein chemischer Prozeß; demnach sind alle Einwirkungen, welche denselben modifizieren, chemische Wirkungen. Wir sind demnach berechtigt, zu sagen, daß Säuren, Basen, Phosphate, neutrale Salze, Formalin, Nitrite, salpetrige Säure, Alkohol und sogar Wasser beim Verdünnen des Saftes chemisch auf die Zymase wirken.“ Wichtig für uns ist, daß nach Wróblewski im Hefepreßsaft hühnereiweißähnliche Stoffe vorhanden sind, welche sich durch eine verschiedene Koagulationstemperatur auszeichnen; von den Eiweißarten der Zymase wurde die eine bei etwa 42°, eine zweite bei 47°, eine dritte bei 60 bis 65° und eine vierte bei 73 bis 78° gefällt; beim Erhitzen der Zymase über 70° (etwa) hinaus

wurden nur geringe Mengen Proteinstoffe niedergeschlagen. Wir haben es also hier mit zwei oder mehreren, vielleicht noch nicht ganz reinen eiweißartigen Stoffen von verschiedener Koagulationstemperatur zu tun.

Ein ähnliches Verhalten gegen Temperatureinflüsse zeigen Bakterien bei der Selbstverdauung, bei der Verdauung mit Trypsin und Pepsin und gegen Kalilauge nach den Untersuchungen von Kruse, Bürgers, Schermann und Schreiber. Bei der Verdauung in physiologischer Kochsalzlösung werden die durch Hitze vorher abgetöteten Bakterien durchschnittlich nicht aufgelöst, ausgenommen Meningokokken und Milzbrandbazillen; bei *Prodigiosus* tritt nach Erhitzung auf 60° keine Auflösung ein, dagegen bei höherer Temperatur und besonders bei 100°. Die Trypsinverdauung, der die gramfreien Bakterien im Gegensatz zu den gramfesten erliegen, läßt gleichfalls auffallende Unterschiede bezüglich der Temperaturhöhe erkennen: die auf 60° erhitzten gramfreien Bakterien wurden öfters durch Trypsin weniger angegriffen als die auf 100° erhitzten. Gleiche Erscheinungen traten auch mit Pepsinsalzsäure auf. Nicht erhitzte Bakterien wurden gar nicht oder nur wenig von Pepsin angegriffen; bei vorher erhitztem Material machten sich zwischen gramfesten und -freien Bakterien Unterschiede bemerkbar: die festen wurden gar nicht angegriffen, dagegen die freien sehr und zwar die auf 100° erhitzten mehr als die auf 60°. Noch augenfälliger wird das Bild bei der Einwirkung von 1prozentiger Kalilauge auf gramfreie Bakterien; hier spielt in eigenartiger Weise die Höhe der Temperatur, die vorher angewandt wurde, eine Rolle. Bei vielen dieser gramfreien Bakterien war die Auflösung dann am größten, wenn sie vorher nicht erhitzt waren, und am schwächsten, wenn die Temperatur vorher auf 100° gesteigert war; einen mittleren Grad der Auflösung zeigten diese Bakterien nach Erhitzung auf 60°. In Übereinstimmung mit diesen Auflösungserscheinungen durch 1prozentige Kalilauge bei 37° ist der mikroskopische Befund: die unerhitzten Bakterien zeigen nach der Kalibehandlung Gerinnsel, Detritus und andere Zerfallserscheinungen, die auf 60° erhitzten weniger und am geringsten bei den auf 100° erhitzten. Lassen sich nicht die von Kruse und seinen Mitarbeitern aufgefundenen Unterschiede am besten auf einen Gehalt verschiedenartiger komplizierter Eiweißsubstanzen in den Bakterienzellen zurückführen? Auch Wróblewski hat es durch seine Versuche wahrscheinlich gemacht, daß in der Zymase eiweißartige Substanzen enthalten sind, welche einen verschieden hohen Koagulationspunkt besitzen. Kennen wir doch seit langem schon den Bence-Joneseiweißkörper (Harneiweiß von Bence-Jones), welcher bei 50 bis 58° koaguliert, um sich bei höherer Temperatur oder auch beim Abkühlen unterhalb 50° wieder zu lösen!

Nehmen wir in den gramfesten und gramfreien Bakterien verschiedenartige hochkomplizierte Eiweißstoffe (in die große Klasse der Nukleoproteid-, Lezithid- und ähnlicher Verbindungen gehörig) an, so lassen sich alle diese beobachteten Unterschiede ziemlich ungezwungen erklären; die Unterschiede werden dadurch hervorgerufen, daß die Nukleinverbindungen in den Bakterienzellen chemisch verschieden gebaut sein können, gegen Agenzien sich verschieden verhalten können, eine verschiedene Koagulationstemperatur besitzen u. a. m.; daher ist es auch einleuchtend, daß manche Bakterien durch Salzsäure chemisch schneller, manche wieder durch Kalilauge verändert werden, andere wieder leichter P abspalten usw.

Zur Frage der Färbungstheorien unter Berücksichtigung der Färbung nach Gram.

Bei den so zahlreichen Färbeversuchen nach Gram in dieser Arbeit drängt sich auch die Frage auf, welcher der verschiedenen Färbungstheorien man den Vorzug geben könnte. Bekanntlich gibt es hier zwei Richtungen: die eine, welche die Färbung als Adsorptionserscheinung (ein entschiedener Vertreter ist A. Fischer) auffaßt, und die andere, welche den Färbeprozess als auf Salzbildung beruhend ansieht. Es sind dies zwei Anschauungen, welche ihrem Wesen nach sich scharf gegenüberstehen. Eine recht übersichtliche Zusammenstellung der bis jetzt bekannt gewordenen Theorien ist 1913 von Sisley erschienen, welche hier wiedergegeben werden soll. Da er in seinem Aufsatz auf Unnas Darlegungen nicht eingeht, so mögen sie an dieser Stelle noch einmal kurz angeführt werden (vgl. S. 242). Unnas Ansicht geht dahin, daß bei der Gramfärbung die Jodfarbstoffverbindung mehr oder weniger stark an das Gewebe (organische) gekettet wird je nach der chemischen Verwandtschaft des betreffenden Gewebes zu dem Jodfarbstoffe. Sisley führt als erste die Wittsche Theorie der festen Lösung an, wonach die Färbungen als feste Lösungen von Farbe in der Fasersubstanz aufgefaßt wird. Auf folgender Überlegung beruht diese Theorie. Bringt man den in einer Flüssigkeit gelösten Farbstoff auf die Faser, so wird die Faser dauernd gefärbt, falls der Farbstoff in der Fasersubstanz löslicher ist als in der Flüssigkeit, in welcher er vorher gelöst war; ist die Löslichkeit des Farbstoffes in der Flüssigkeit größer als in der Faser, so wird Entfärbung eintreten. Krafft denkt sich die Färbung als eine Fällung kolloidaler Salze auf die Oberfläche oder ins Innere der Faser (sogen. Theorie der Färbung durch kolloidale Fällung). Folgendes Beispiel, welches zur Begründung dieser Theorie angeführt wird, dürfte auch für uns von Interesse sein. Glimmer (also ein Aluminiumsilikat) färbt sich in der warmen Lösung eines Handelsfarbstoffes, des Diaminschwarz BH nicht an, dagegen sehr stark nach Zusatz von Kochsalz; die Färbung ist dann wäschebeständig. Eine andere Färbungstheorie, welche nach Sisley manche Erscheinung gut erklären kann, jedoch nach seiner Ansicht noch nicht ausreichend gesichert erscheint, ist die elektrische, wonach die Farbstoffe und die Faser beim Färben den

Regeln der Kontaktelektrisierung folgen; die elektrische Leitfähigkeit der Farbstoffe in Lösung ist mit Sicherheit festgestellt worden. Sisley selbst neigt einer physiko-chemischen Färbetheorie zu. Da die chemischen Funktionen der Textilfasern bei den Färbeprozessen eine Rolle spielen, so ist er der Ansicht, daß der Farbstoff eine Molekularassoziation mit der Faser bilde.

In vorliegender Arbeit ist zu den Versuchen nur ein einziger Farbstoff, das Gentianaviolett, benutzt worden. Aus diesem Grunde kann die Ansicht, die ich mir von dem Färbeprozesse gebildet habe, zunächst nur für die Gramfärbung Gültigkeit beanspruchen. An anderer Stelle dieser Arbeit habe ich darauf hingewiesen, daß es unter den chemischen Verbindungen und Substanzen teils gramfeste teils gramfreie gibt, teils auch solche, welche eine Mittelstellung zwischen diesen einnehmen, ferner auch solche, welche überhaupt keine oder nur ganz schwache Färbung annehmen (unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen!).

Zu den gramfesten Verbindungen gehören Nuklein, Nukleinsäure, auch das von Tamura entdeckte Mykol; zu den gramfreien (welche also die Fuchsinfärbung annehmen) sind zu rechnen: Kieselgur, gewisse Umwandlungsprodukte von Nukleinverbindungen u. a.; eine Zwischenstellung zwischen gramfest und gramfrei nehmen Hühnereiweiß und Kasein ein, während Quarzsand, auch Pepton, die Gegenfärbung mit Fuchsin so gut wie gar nicht zeigen. Da nun auch gramfeste Bakterien, denen ganz gewiß gramfest färbbare Zellsubstanzen eigen sind, durch Säuren, nicht so regelmäßig durch Alkalilaugen, in gramfreie übergeführt werden können, so wird man alles dieses so zu deuten haben, daß der Färbeprozess bei der Gramreaktion abhängig ist in erster Linie von der chemischen Zusammensetzung des Substrates, in zweiter Linie in bestimmten Fällen von der physikalischen Beschaffenheit des Substrates, einem mehr oder minder großen Substanzreichtum des Substrates nach A. Fischer. Als einfachstes und sinnfälligstes Beispiel für meine Auffassung möchte ich das Verhalten tierischer und pflanzlicher Fasern gegen Kalilauge und gegen Farbstoffe anführen. Seide und Baumwolle, zwei chemisch durchaus verschiedene Substanzen, welche bei mikroskopischer Vergrößerung als glatte Fasern von etwas verschiedener äußerer Form erscheinen, zeigen wie bekannt ein verschiedenes Verhalten gegen Kalilauge und gegen Fuchsinlösung. Seide löst sich in kochender 8prozentiger Kalilauge auf, Baumwolle nicht oder nur wenig; Seide wird durch alkoholische Fuchsinlösung dauernd gefärbt, Baumwolle nicht. Stellen wir diesem noch die Farbeigenschaften von Quarzsand, Pepton und Nuklein entgegen! Quarzsand rein anorganisch, Pepton und Nuklein rein organisch, aber beide chemisch doch ganz verschieden zusammengesetzt! Die erste Verbindung

nimmt weder Gramfarbe noch Gegenfärbung mit Fuchsin an, ebenso die zweite, das Pepton, während die dritte Verbindung, das Nuklein, die reine Gramfarbe behält.

Was ist natürlicher als anzunehmen, daß die chemische Substanz des Substrats in erster Linie für den Ausfall der Gramreaktion maßgebend sein muß! Ich kann mich danach nur der bereits angegebenen chemischen Färbungstheorie von Unna anschließen, und zwar mit der auch von diesem Forscher erhobenen Einschränkung, daß manche Färbungsunterschiede auch auf physikalische Ursachen zurückgeführt werden können.

Zusammenfassung.

Der Ersatz des Jodjodkaliums durch Jodwasser bei der Gramreaktion ruft bei Hefe und Mycoides die charakteristische Gramfarbe hervor, während es bei Aureus nur bis zu einem Dunkelblautone kommt; Bromwasser und Chlorwasser an Stelle des Jodwassers bewirken eine von Br zu Cl zunehmende Aufhellung des Schwarzblaus. Es ist anzunehmen, daß sich hierbei brom- bzw. chlorhaltige Farbstoffverbindungen des Karbolgentianaviolett bilden.

Die Umwandlung der gramfesten Bakterien Aureus, Mycoides und Hefe in gramfrei durch Säuren vollzieht sich gemäß ihrem Dissoziationsgrade: die am stärksten dissoziierten Säuren bewirken die Umwandlung schneller als die mittelstarken, diese wiederum schneller als die schwachen Säuren. Erhöhung der Konzentration der Säure und Erhöhung der angewandten Temperatur beschleunigen die Reaktion.

Messende Bestimmungen zeigten deutlich, daß die Umwandlung gramfester Hefe in gramfrei abhängig ist von dem Dissoziationsgrade der benutzten Säure, von der Reaktionstemperatur und von der Säurekonzentration; danach kennzeichnet sich dieser Umwandlungsprozeß als ein chemischer Vorgang.

Auch andere gramfeste Bakterien, wie Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand, Actinomyces, Bulgaricus werden durch Säuren bei geeigneter Konzentration und geeigneter Temperatur gramfrei.

Eine Ausnahme in der Reihe der untersuchten Säuren macht die Milchsäure; eine eingehendere Prüfung der hier obwaltenden Verhältnisse ist erst erforderlich, um zu einem abschließenden Urteile zu gelangen.

Aureus, Mycoides und Hefe werden durch Kalilauge bei geeigneter Konzentration und Temperatur gramfrei; von anderen gramfesten Bakterien, wie Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis, Milzbrand, Actinomyces und

Bulgaricus wurden nur Actinomyces und Bulgaricus unter den obwaltenden Versuchsbedingungen durch Kalilauge gramfrei.

Von den organischen Lösungsmitteln sind die chemisch differenten, wie Alkohol, Azeton dadurch ausgezeichnet, daß sie unter geeigneten Versuchsbedingungen Aureus, Mycoides und Hefe gramfrei machen; je höher die hierbei angewandte Temperatur ist, desto schneller vollzieht sich — bei einem und demselben Lösungsmittel — diese Umwandlung; begünstigt wird sie auch durch einen noch nicht genauer festgestellten Gehalt des Lösungsmittels an Wasser. Wasser allein von etwa 97° wirkt in analoger Weise bei Hefe, schwächer bei Mycoides und gar nicht bei Aureus, wenn als Vergleichsdauer 1½ Stunden zugrunde gelegt werden.

Der Einfluß der chemisch indifferenten Lösungsmittel (Benzin, Benzol, Toluol) auf die Gramfestigkeit ist unerheblich, wenn annähernd gleiche Versuchsbedingungen wie bei den differenten Lösungsmitteln eingehalten werden; die Einwirkung nimmt aber zu bei Steigerung der Temperatur und mit der Dauer des Versuchs.

An mehreren Beispielen konnte gezeigt werden, daß das übliche Fixierungsverfahren von Deckglaspräparaten mittels kurzen Durchziehens durch die Bunsenflamme die Gramfestigkeit von Bakterien beeinträchtigen kann — eine Beobachtung, die von manchem Bakteriologen gemacht worden ist.

Die Reichertsche Versuchsanordnung ist nicht frei von Fehlern; vor allem ist die Benutzung feuchten Bakterienmaterials bei Brutschranktemperatur zu beanstanden. Es treten da autolytische Vorgänge im Zellleibe ein, welche schon an und für sich die Gramfestigkeit beeinträchtigen können. Die Umwandlung der gramfesten Bakterien durch Tetrachloräthylen ist auf die Wirkung der Salzsäure zurückzuführen, welche bei Anwesenheit schon geringster Spuren von Feuchtigkeit abgespalten wird.

Mit arabischem Gummi emulgierte Fette von verschieden großer Jodzahl, wie Leinöl, Hammeltalg und Lanolin lassen sich nicht gramfest färben; ein Zusammenhang zwischen Jodzahl und Gramfärbbarkeit besteht danach nicht.

Bei den Verdauungsversuchen mit Aureus, Mycoides und Hefe wurden die Beobachtungen von Kruse und seinen Mitarbeitern bestätigt. Im einzelnen ergab sich folgendes:

Aureus. Die Kokken wurden bei den Verdauungsversuchen durch physiologische Kochsalzlösung, durch Trypsin und Pepsin-Salzsäurelösung nur wenig oder gar nicht in ihrer Gramfestigkeit beeinträchtigt.

Agarkulturen von Aureus werden mit zunehmendem Alter gramfrei.

Mycoides. Sein Verhalten bei den Verdauungsversuchen gleicht im allgemeinen dem *Aureus*; nur physiologische Kochsalzlösung scheint die Gramfestigkeit des *Mycoides* erheblich zu schädigen. — *Mycoides* löst sich nach einer bestimmten Zeit sowohl in Salzsäure als auch in Kalilauge zum Teil auf; es entstehen Lösungen kolloidaler Natur. Aus den kalihaltigen Lösungen werden die Stäbchen durch Ansäuern in ihrer charakteristischen Form wieder gewonnen, aus den salzsäurehaltigen dagegen nach Zusatz von Kali nur unvollkommen oder gar nicht, da das Bakterienmaterial in diesem Falle mehr oder weniger je nach der Länge der Einwirkung der angewandten Salzsäure formlose Haufen bildet.

Ältere Agarkulturen von *Mycoides* wurden wie die von *Aureus* mit der Zeit gramschwächer.

Hefe. Hefe scheint bei den Verdauungsversuchen mit physiologischer Kochsalzlösung, Trypsin- und Traubenzuckerlösung (1 Prozent) schwieriger in ihrer Gramfestigkeit beeinflußt zu werden als *Aureus* und *Mycoides*. Auflösungsversuche von Diphtherie, Pseudodiphtherie, *Subtilis*, Milzbrand und *Actinomyces* in Salzsäure und in Kalilauge bestätigen die von Kruse und seinen Mitarbeitern an gramfesten Bakterien gemachten Beobachtungen. — Jobling und Petersen fanden, daß der Gehalt der Bakterien an ungesättigten Lipoidverbindungen proportional sei dem Widerstande der Bakterien gegen die Trypsinverdauung. Da nach der Versuchsanordnung von Jobling und Petersen ein lang andauerndes Erhitzen des Bakterienmaterials mit organischen Lösungsmitteln (besonders Alkohol) stattfand, so ist nach dem Versuchsmateriale vorliegender Arbeit anzunehmen, daß hierbei die Zellbestandteile eine chemische Änderung erleiden und dadurch weiteren chemischen Angriffen leichter zugänglich gemacht werden; dieser Umstand wäre in erster oder zweiter Linie zur Erklärung für die geschwächte Widerstandskraft der Bakterien gegen tryptische Verdauung heranzuziehen.

Hühnereiweiß, Kasein, Schalenhaut des Hühnereies nehmen bei der Gramfärbung eine Zwischenstellung zwischen gramfrei und gramfest ein. Das färberische Verhalten ist etwas schwankend, besonders beim Eiweiß, was z. T. wohl auf seine amphotere Reaktion zurückzuführen sein wird; als eine andere Ursache ist in gewissen Fällen ein größerer Substanzreichtum des Substrats bei einem positiven Ausfalle der Gramreaktion anzunehmen — im Einklange mit der A. Fischerschen Hypothese. Im übrigen aber hat sich diese, soweit die Gramfärbung in Frage kommt, nicht bestätigen lassen: die Fischersche Hypothese (a. a. O., S. 116) besagt, daß „die Gramsche Methode, als rein physikalische, die mit . . . Kalibichromat gefällte Albumose genau so nach Granulagröße sortiert wie die anderen sukdaneen Doppelfärbungen. Immer widerstehen die großen

Granula der Entfärbung länger als die kleinen, die nunmehr kontrast gefärbt werden können.“ Das vorliegende Material hat jedoch gezeigt, daß bei den Chromatfällungen von Pepton Witte und gereinigtem Pepton Witte unterschiedslos einmal die großen Granula mehr entfärbt wurden als die kleineren, ein andermal die kleineren mehr als die größeren.

Nuklein und Nukleinsäure verhalten sich zum größten Teile gut gramfest. Durch Kalilauge wird Nukleinsäure und besonders Nuklein in gramfreiem Sinne beeinflusst. — Färbungsversuche mit Kieselgur zeigen deutlich, daß es chemische Substanzen gibt, welche ausgesprochen gramfrei sind; Quarzsand gehört zu den Verbindungen, welche so gut wie ungefärbt bleiben.

Die Zellkerne der Zungenepithelien (im jugendlichen Zustande) sind gramfest; durch Einwirkung von Salzsäure und Kalilauge tritt eine mehr oder weniger starke Umwandlung des Kernes nach der gramfreien Seite ein.

Nikitines Angabe, daß es möglich sei, gramfrei gewordene Bakterien durch Löfflers Beize gramfest zu machen, trifft nicht zu.

Bei den Zellkernen und Kernteilungsfiguren von Erbsenkeimen, welche durch 1prozentige Sublimatlösung oder Alkohol gehärtet waren, lassen sich Kernkörperchen, Chromatin und Chromosomen durchschnittlich gut gramfest färben.

Die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Spermien vom Stiere und vom Menschen zeigen bei der Gramfärbung öfter eine blässere Färbung als die mit Wasser behandelten.

Die Stierspermien sind durchschnittlich blässer nach Gram gefärbt als die des Menschen; nur der dem Halse anliegende schmal begrenzte Teil des Kopfes (bei den Stierspermien) ist ziemlich regelmäßig gut gramfest; das Verbindungsstück ist oftmals durch dunklere Punktierungen ausgezeichnet. Die Einwirkung von Salzsäure auf die Spermien vollzieht sich in der Weise, daß der Kopfinhalt nach kurzer Zeit herausgelöst wird, wobei Kopfhülse und Schwanzteil erhalten bleiben; Kalilauge wirkt in der Weise, daß der Schwanzteil fortgelöst wird, während der Kopfinhalt unangetastet bleibt. Durch Kalilauge wird die Blau- und Bläßblaufärbung des Kopfes bei einem Teile des Materials in Rot übergeführt. Der sich hierbei abspielende Chemismus scheint etwas verwickelter Natur zu sein.

Bei den menschlichen Spermien macht sich im allgemeinen eine gut gramfeste Färbung des Kopfes bemerkbar. An dem Verbindungsstücke treten öfter dunkle Punktierungen hervor. Wie bei den Stierspermien, so wird auch bei den des Menschen der Kopfinhalt durch Salzsäure herausgelöst, durch Kalilauge der Schwanzteil fortgelöst. Die gramfeste Färbung des Kopfes wird durch Salzsäure wie durch Kalilauge durchschnittlich gramfrei.

Nach den von Retzius gegebenen farbigen Abbildungen menschlicher Spermien zu schließen, entspricht die Starkgrünfärbung des Biondigemisches der Tiefe und dem Schwarzblau der Gramfärbung.

Da sich die Umwandlung der gramfesten Bakterien *Aureus*, *Mycoides* und Hefe durch Säure und Alkali als hydrolytischer Vorgang deuten läßt, und da es erwiesen ist, daß Nuklein, Nukleinsäure und gewisse nukleinhaltige organische Gebilde gramfest sind, so geht meine Ansicht dahin, daß die Gramfärbung bei den Bakterien durch bestimmte Zellinhaltsstoffe hervorgerufen wird, welche ja nach ihrem chemischen Baue durch Säuren und Alkali einer verschieden starken hydrolytischen Spaltung des Moleküls unterliegen. Auf Grund der färberischen Ergebnisse gehören die hier in Frage kommenden Zellinhaltsstoffe in das große, wenig erforschte Gebiet der kompliziert zusammengesetzten Nukleinverbindungen.

Die Ansicht über das Wesen der Gramfärbung wurde wesentlich gestützt durch Färbungsversuche mit Buchnerschem Hefepreßsaft, zerriebener Hefe und zerriebenem *Mycoides* mittels Quarzsands und Kieselgur; die Versuche ergaben mit Sicherheit, daß die Gramfestigkeit dieser beiden Bakterienarten durch gramfeste Zellsubstanzen hervorgerufen wird; mithin daß das Wesen der Gramfärbung auf chemischer und nicht auf physikalischer Grundlage beruht.

Von den Theorien, nach welchen sich die Gramfärbung am einfachsten erklären läßt, wird der chemischen von Unna der Vorzug gegeben und zwar mit der wohl zu beachtenden Einschränkung von Unna und Verfasser, daß manche Färbungsunterschiede auf physikalische Ursachen zurückgeführt werden können.

Durch die vorliegenden Untersuchungen werden die sich oft widersprechenden Literaturangaben über die Einwirkung von Säure, Alkali u. a. m. auf gramfeste Bakterien richtig gestellt.

Von den chemischen Untersuchungen über Nukleinverbindungen haben die von Levene, Plimmer und Scott und von Johnson und Chernoff für die vorliegende Arbeit Bedeutung; folgende Beobachtungen dieser Forscher können zur Erklärung mancher in vorliegender Arbeit festgestellten Erscheinungen bei der Einwirkung von Säure und Alkali auf gramfeste Bakterien, organische Gebilde, wie Zellkerne und ähnliche herangezogen werden: 1. Die Pyrimidinkomplexe sind im Vergleiche zu den Purinkomplexen widerstandsfähiger gegen den hydrolytischen Einfluß verdünnter Mineralsäuren; 2. Nukleinsäure und Nukleinproteine sind gegen Salzsäure weniger beständig als die sog. Phosphoproteine; 3. Nukleinsäuren verschiedener Herkunft werden durch $\frac{n}{1}$ - und 2n-Natronlauge bei 75° bedeu-

tend langsamer hydrolysiert als durch $\frac{1}{2}$ - und 2 n-Salzsäure unter den gleichen Bedingungen. Ebenso wie sich bei den Nukleinverbindungen Unterschiede in der Wirkungsweise von Säure und Alkali bemerkbar machen, so auch bei den gramfesten Bakterien und den untersuchten organischen Gebilden; auch sie werden durch Kali teils verändert teils gar nicht oder nur wenig beeinflusst. Zu den ersteren gehören Aureus, Mycoides, Hefe u. a., zu den letzteren Diphtherie, Pseudodiphtherie, Subtilis usw. Dagegen zeigen alle gegen Säuren eine geringe Widerstandskraft, die in vielen Fällen schwächer ist als bei Anwendung von Kali. Dieses mit den chemischen Eigenschaften von Nukleinsäuren übereinstimmende Verhalten läßt sich am besten so erklären, wenn man annimmt, daß in den Bakterienleibern und den anderen kernhaltigen Gebilden Nukleinverbindungen oder nukleinartige enthalten sind.

Ein ganz ähnliches Verhalten zeigen Säuren und Basen bei ihrer keimtötenden Wirkung auf Bakterien. Durch Paul und Krönig wissen wir, daß diese abhängig ist von dem Dissoziationsgrade. Es hat sich experimentell nachweisen lassen, daß die meisten Bakterien empfindlicher gegen Säuren sind als gegen Laugen. Hierin sehen wir eine gewisse Übereinstimmung gramfester Bakterien in ihrem Verhalten gegen Säuren und Basen bei der Gramreaktion. Auch die Gramfärbung wird, wie wir gesehen haben, in weit größerem Maße von Säuren beeinflusst als von Kalilauge. Ein vollständiger Parallelismus zwischen keimtötender Kraft und Beeinflussung der Gramfärbung durch Säuren und Alkali besteht jedoch nicht; während nämlich nach Paul und Krönig Flußsäure und Oxalsäure als schwache bis mittelstarke Säuren an keimtötender Kraft die stark dissoziierte Salzsäure übertreffen, bietet vorliegendes Untersuchungsmaterial keinen Anhaltspunkt für eine Ausnahmestellung genannter Säuren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Gramfärbung.

Wenn Bakteriengiftstoffe in die Klasse der Nukleoproteidverbindungen gehören, wofür manche Angaben in der Literatur sprechen, so muß auf Grund vorliegender Versuche die Forderung erhoben werden, daß bei Abscheidung der Giftstoffe aus den Bakterienleibern nur möglichst indifferente (chemisch schwach wirkende) Reagenzien und möglichst niedrige Temperatur angewendet werden, wenn die Giftstoffe in unveränderter Form und in genügenden Mengen erhalten werden sollen.

Das Zentrifugieren von Bakterienaufschwemmungen im Wasser oder anderen wässrigen Flüssigkeiten liefert bisweilen keine einwandfreien Durchschnittsproben, auch nicht bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifuge von 3000 bis 3500. Die sicherste Probenentnahme bleibt die Methode, das gut durchmischte Durchschnittsmuster auf Deckgläser in

dünnere Schicht zu verteilen, an der Luft antrocknen zu lassen und wenn möglich Wasserspülung vorzunehmen und dann erst nach Gram zu färben.

Die Gramreaktion hat sich als ein ausgezeichnetes diagnostisches Mittel bewährt, um Änderungen in der chemischen Zusammensetzung hochkomplizierter eiweißartiger Verbindungen zu erkennen und den Verlauf solcher Übergänge verfolgen zu können. Durch verschiedene kleine Änderungen in der Methode, wie sie aus dieser Arbeit ersichtlich werden, wird die Gramfärbung in manchen Fällen in der Hand des Geübten ein nicht zu unterschätzendes Hilfsmittel sein nicht nur für den Bakteriologen, sondern auch für den Zoologen, Biologen, Botaniker u.a.

Literaturverzeichnis.

- Abderhalden, *Physiologische Chemie*. 3. Aufl. 1914; *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1912. Bd. LXXXI. S. 285.
- R. und W., Albert, Chemische Vorgänge in der abgetöteten Hefezelle *Zentralbl. f. Bakt.* 2. Abtlig. 1901. Bd. VII. S. 737.
- Albert, Buchner und Rapp, Dauerhefe. *Ber. d. Deutschen chem. Ges.* 1902. Bd. XXXV. S. 237.
- Aronson, Zur Biologie der Tuberkelbazillen. *Berliner klin. Wochenschrift*. 1910. Bd. XXXV. S. 1617.
- Bittroff und Momose, Beiträge zur Frage des granulären Tuberkulosevirus. *Robert-Koch-Stiftung*. 1913.
- de la Blanchardière, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1913. Bd. LXXXVII. S. 291.
- Botazzi-Boruttau, *Physiologische Chemie*. Leipzig und Wien 1902.
- Brudny, Über die Beziehungen der Bakterien usw. *Zentralbl. f. Bakt.* 1908. Bd. XXI. S. 62.
- E. und H. Buchner und M. Hahn, *Zymasegärung*. München und Berlin 1903. S. 58 u. ff.
- Bürgers, Schermann und Schreiber, Über Auflösungserscheinungen von Bakterien. *Diese Zeitschrift*. 1911. Bd. LXX. S. 119.
- Cederncreutz, Studien über die Bedingungen des positiven und negativen Ausfalles der Gramfärbung bei einigen Bakterien. *Arch. f. Dermat. u. Syphilis*. 1908. Bd. XCIII. S. 355.
- E. Deuben, -Zur Kenntnis der Flußsäure. *Habil.-Schrift*. Leipzig 1905. S. 9, 27, 33 u. 43; *Zeitschr. f. anorg. Chem.* 1905. Bd. XLIV.
- Derselbe, Über die Absorption der Uranylsalze. *Inaug.-Diss.* Erlangen 1898. S. 8; *Wiedemanns Annalen d. Physik*. 1898.
- Deycke, Zur Biochemie der Tuberkelbazillen. *Münchener med. Wochenschr.* 1910.
- Deycke und Much, Über einige strittige Punkte in der Biologie des Tuberkelbacillus. *Berliner klin. Wochenschr.* 1910. S. 1933 (im wesentlichen Streitschrift gegen Aronson).
- Dezani, nach *Chem. Zentralbl.* 1909. Bd. I. S. 34.
- Ehrström, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1901. Bd. XXXII. S. 351.
- Eisenberg, Über das Ektoplasma und seine Veränderung im infizierten Tiere. *Zentralbl. f. Bakt.* 1. Abtlig. 1909. Bd. XLIX.
- Derselbe, Untersuchungen über halbspezifische Desinfektionsvorgänge, über die Wirkung von Farbstoffen usw. *Ebenda*. 1913. Bd. LXXI.

- Ekenstein und Blanksma, nach *Chem. Zentralbl.* 1914. Bd. I. S. 965.
 Euler-Lindner, *Chemie der Hefe*. Leipzig 1915. S. 66, 80 u. ff.
 Feulgen, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1912. Bd. LXXX. S. 73; Bd. LXXXIV. S. 309; 1913. Bd. LXXXVIII. S. 370.
 A. Fischer, *Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas*. Jena (G. Fischer) 1899.
 Galeotti, *Zeitschr. f. Bakt. 1. Abt.* Bd. LXVII. S. 225.
 Gottstein, *Fortschritte der Medizin*. 1885. Bd. III; zitiert nach A. Fischer, *Fixierung, Färbung usw.* S. 116.
 Gram, Über die isolierte Färbung von Schizomyceten in Schnitten und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*. 1884. Bd. II.
 Gregersen, Über die antiseptische Wirkung des Magensaftes. *Zeitschr. f. Bakt. 1. Abtlg.* 1916. Bd. LXXXVII. S. 353.
 Grimme, Die Gramsche Methode der Bakterienfärbung. *Zentralbl. f. Bakt.* 1902. Bd. XXXII.
 Hamburger, *Zentralbl. f. klin. Med.* 1890. S. 425.
 Hammersten, *Physiologische Chemie*. Wiesbaden 1907.
 Heidenhain, Plasma und Zelle. 1. Abtlg., 1. Lief. 1907 im *Handbuch der Anatomie des Menschen* von Bardeleben. Bd. VIII. S. 1; nach Retzius, *Biol. Untersuchungen*. Neue Folge. Bd. XVI. S. 3.
 Hottinger, Beitrag zur Theorie der Färbung nach Gram. Kolloidchemisch-optische Gesichtspunkte. *Zentralbl. f. Bakt.* 1915. Bd. LXXXVI. S. 367.
 Jobling und Petersen, *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therapie*. 1915. Bd. XXIV. S. 292.
 Johnson und Chernoff, nach *Chem. Zentralbl.* 1913. Bd. II. S. 273.
 Jones und Richards, *Ebenda*. 1914. Bd. I. S. 1438.
 A. Kossel, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1897. Bd. XXII. S. 176; 1898. Bd. XXV. S. 165.
 Derselbe, *Zentralbl. f. Bakt.* 1896. Bd. XIX.
 A. Kossel und Kutscher, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1900. Bd. XXXI. S. 188.
 Krafft, *Ber. d. Deutschen chem. Ges.* 1899. Bd. XXXII. S. 1584.
 Krönig und Paul, Die chemische Grundlage der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. *Diese Zeitschrift*. 1897. Bd. XXV. S. 1.
 Kruse, Beziehungen zwischen Plasmolyse, Verdaulichkeit, Löslichkeit und Färbbarkeit von Bakterien. *Münchener med. Wochenschr.* 1910. Nr. 13.
 Derselbe, *Allgemeine Mikrobiologie*. Leipzig (F. C. W. Vogel) 1910. S. 40ff., 22 u. 495.
 Kruse, Bürgers, Schermann und Schreiber, Über Auflösungserscheinungen von Bakterien. *Diese Zeitschrift*. 1911. Bd. LXX. S. 126.
 Kurajeff, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1898. Bd. XXVI. S. 524.
 Levene, *Ber. d. Deutschen chem. Ges.* 1912. Bd. XLV. S. 608.
 Levene und Jacobs, *Ebenda*. 1911. Bd. XLIV. S. 1027.
 Lilienfeld (1893), nach Retzius, *Biolog. Untersuchungen*. Neue Folge. Bd. XVI. S. 4.
 Macfadyen, Allen, Morris und Rowland, *Ber. d. Deutschen chem. Ges.* 1900. Bd. XXXIII. S. 2764.
 Malenück, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1908. Bd. LVII. S. 99.
 Mathews, *Ebenda*. 1897. Bd. XXIII. S. 399.
Zeitschr. f. Hygiene. LXXXV

R. Mauch, Über physikal.-chemische Eigenschaften des Chloralhydrats und dessen Verwendung in pharm.-chemischer Richtung. *Arch. d. Pharmazie*. 1902. Bd. CCXL. S. 113 u. 166.

Nicolle und Alilaire, *Annal. Pasteur*. 1909; nach Kruse, *Mikrobiologie*. 1910. S. 55.

Nikitine, Contribution à la théorie d. l. color. d. microbes. *Russ. Arch. f. Patholog. usw.* Bd. V. Augustnummer; *Jahresber. über d. Fortschr. d. Lehre v. d. pathog. Mikroorg.* von Baumgarten. 14. Jahrg. 1898. S. 783. Ref.

Ostwald, *Lehrbuch d. allg. Chem.* Bd. II. 1893. S. 650 u. 651.

Paltauf, *Wiener klin. Wochenschr.* 1891 u. 1892.

Patzschke, Über die Widerstandsfähigkeit von Bakterien gegen hohe Temperaturen usw. *Diese Zeitschrift*. 1916. Bd. LXXXI. S. 246.

Paul und Krönig, Über das Verhalten der Bakterien zu chemischen Reagenzien. *Zeitschr. f. physik. Chem.* 1896. Bd. XXI. S. 414.

Piccard, nach A. Kossel, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1897. Bd. XXII. S. 176.

Plimmer und Scott, nach *Chem. Zentralbl.* 1908. Bd. II. S. 1941; 1913. Bd. II. S. 1130 u. 1131.

F. Reichert, Beiträge zur Gramfärbung. *Inaug.-Diss.* Heidelberg 1913.

Retzius, *Biologische Untersuchungen*. Neue Folge. XVI. Jena (G. Fischer) 1911. S. 5 u. 6, S. 65 u. Tab. 22.

Sisley, *Chemiker-Zeitung*. 1913. S. 1357 u. 1379.

S. Skraup, *Ber. d. Deutschen chem. Ges.* 1916. Bd. XLIX. S. 2142.

Stern, *Zentralbl. f. Bakt.* 1. Abtlg. 1908. Bd. XLVII. S. 561.

Steudel, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1911. Bd. LXXII. S. 305; 1912. Bd. LXXVII. S. 497.

Tamura, Zur Chemie der Bakterien. *Ebenda*. 1913. Bd. LXXXVII.

Thannhauser, *Ebenda*. 1914. Bd. XCI. S. 329.

Thannhauser und Dorfmueller, *Ebenda*. 1914. Bd. XCV. S. 259; 1917. Bd. C. S. 121.

Unna, Rosaniline und Pararosaniline. *Monatshefte f. Dermat.* Erg.-Heft 1887. Hamburg und Leipzig (L. Voß) 1887.

Verworn, *Allgemeine Physiologie*. 1909.

L. Weiss, Zur Morphologie des Tuberkelvirus unter besonderer Berücksichtigung seiner Doppelfärbung. *Berliner klin. Wochenschr.* 1909. S. 1797.

Wróblewski, *Journ. f. prakt. Chem.* 1901. Bd. LXIV. S. 1 u. ff.