

[Aus der bakteriologischen Abteilung des hygienischen Instituts in Bonn.]
(Abteilungsvorsteher: Prof. H. Reichenbach.)

Die Lackmusmolke als differentialdiagnostisches Hilfsmittel und ihr Ersatz durch eine künstliche Lösung.

Von

Dr. Ernst Seitz,
früherem Assistenten am Institut.

Überblickt man die Zahl der Stoffe, die in großer Mannigfaltigkeit der Herkunft und Zusammensetzung der Differentialdiagnose des Typhusbacillus dienstbar gemacht worden sind, so legt die auf sie verwandte Arbeit nicht nur Zeugnis ab von der Wichtigkeit dieser Diagnose, sondern die überreichliche Fülle der noch heute mit Erfolg benutzten Nährmittel ist zugleich der Ausdruck für die gelegentliche Unzulänglichkeit der einzelnen Methoden, deren Ersatz durch ein unfehlbares Diagnostikum noch nicht gelungen ist. Ein großer Teil der Nährmedien verlor an Bedeutung, als durch die Entdeckung der Paratyphusgruppe der Wissenschaft neue Aufgaben in der Abzweigung dieser Verwandten des Typhusbacillus gestellt wurden, während gleichzeitig die Nährböden, die auch der Paratyphusbacillus charakteristisch beeinflusste, in den Vordergrund des Interesses rückten.

Diesem Vorzuge verdankt auch die Lackmusmolke die mehr oder weniger führende Stellung, welche ihr in der Erkennung einer typhusverdächtigen Reinkultur von vielen Untersuchern eingeräumt wird. Angegeben wurde sie von Petruschky (1) im Jahre 1889 zur Unterscheidung von Typhus und typhusähnlichen Bakterien in einer Zeit, die an Differenznährböden noch nicht sehr reich war. Ihr Prinzip fand Anklang, aber ihre Herstellung war für den Nichtgeübten so schwierig, daß der

Autor sich veranlaßt sah, sein Rezept der Firma Kahlbaum in Berlin zu fabrikmäßiger Ausführung zu übergeben. Auch heute noch wird sie wohl von den wenigsten im Laboratorium hergestellt, jedenfalls empfehlen die Lehrbücher, die mir zugänglich waren, nach Anführung ihrer Herstellungsweise mit einer gewissen Resignation, daß sie „am besten“ von Kahlbaum fertig bezogen werde. Heim (2), in dessen Lehrbuch der Bakteriologie im übrigen der Laboratoriumstechnik eine besonders liebevolle Ausführung zuteil geworden ist, verzichtet sogar ganz auf die Angabe ihrer Bereitung und nennt nur Kahlbaum als ihre Bezugsquelle. Ebenso rät Hübener (3) in seinem Buche über Fleischvergiftung, in welchem die Herstellungsweise der übrigen Differenzialnährböden sehr eingehend beschrieben wird, kurzweg, die Lackmusmolke von Kahlbaum fertig zu beziehen, da so die Einheitlichkeit des Nährbodens am sichersten gewährleistet werde.

Infolge dieser Schwierigkeiten der Herstellung hat es denn auch nicht an Versuchen gefehlt, die Lackmusmolke durch künstliche Nährlösungen von ähnlicher Wirkung zu ersetzen. Im Jahre 1896 unternahmen es Proskauer und Capaldi (4), auf synthetischem Wege eine Nährflüssigkeit zusammenzustellen, die dieselben Dienste leisten sollte, wie die Lackmusmolke, ohne die Schwierigkeiten der Darstellung zu besitzen. Die beiden Lösungen, welche sie auf Grund ihrer Untersuchungen als geeignet zur Unterscheidung von Typhus und Coli empfahlen, haben dasselbe Schicksal gehabt, wie zwei später von Barsiekow (5) ebenfalls als Ersatz der Lackmusmolke angegebene Nährmedien. Sie sind niemals an Stelle, sondern höchstens neben der Lackmusmolke verwandt worden, und je mehr die letzten Jahre bakteriologischer Forschung die große Verbreitung der Paratyphusbazillengruppe gezeigt haben, desto seltener liest man von der Verwendung der Proskauer-Capaldischen sowohl wie der Barsiekowschen Nährböden: man kann sagen, daß die Lackmusmolke beide überlebt hat. Sie konnte von ihnen nicht verdrängt werden, weil alle diese Nährlösungen in ihrem Prinzip nicht über eine gewisse Ähnlichkeit mit der Lackmusmolke hinauskamen, jeder einzelne dagegen in der Vielseitigkeit der Wirkung von der Lackmusmolke übertroffen wurde. Ausschlaggebend war dabei ihre Wertlosigkeit gegenüber der Differentialdiagnose der Paratyphusbazillengruppe.

Was nun das Verhalten der einzelnen Bakterienarten in der Molke anlangt, so ist sie von Petruschky bekanntlich zunächst zur Unterscheidung des Typhus von typhusähnlichen Bakterien angegeben worden. In erster Linie handelte es sich dabei auch für Petruschky um das *Bacterium coli*, obwohl dieser Name von ihm nicht genannt wird. Über die Reaktion des typischen *Bacterium coli* in der Molke gibt es keine nennenswerten Widersprüche. Ihre Nährstoffe ermöglichen ihm ein

lebhaftes Wachstum, das schon äußerlich in einer intensiven Trübung zutage tritt. Parallel mit dieser Trübung geht eine starke Säurebildung, die zu einer intensiv roten Färbung der Lackmusmolke führt. Die Angaben über die Quantität der gebildeten Säure schwanken in ziemlich weiten Grenzen: während Petruschky (1) nach 8 tägigem Wachstum 7 bis 10 Prozent $n/10$ Lauge gebrauchte, beschrieb Sternberg (6) „typhimorphe“ Stämme, die 6 bis 8 Prozent $n/10$ Säure bildeten, und von andern wurde bis zu 16 Prozent beobachtet.

Die starke Säuerung, die das *Bacterium coli* hervorruft, beruht auf seiner Fähigkeit, den in der mit Wasser zu gleichen Teilen verdünnten Molke zu etwa 2 Prozent enthaltenen Milchzucker zu zersetzen. Diese Eigenschaft, die in der Mehrzahl der Fälle mit Gasbildung einhergeht, zeichnet das *Bacterium coli* vor allen andern Vertretern der Gruppe aus. Sie bedarf zu ihrer vollen Entfaltung einer Temperatur von 30 bis 35° C, bei der man schon nach 5 bis 6 Stunden eine deutliche Rötung der Lackmusmolke bemerkt. Wenn diese Färbung sich auch im allgemeinen nach etwa 24 Stunden zu dem typischen hellen Rot zu vervollkommen pflegt, so muß doch darauf hingewiesen werden, daß von dieser Regel Ausnahmen vorkommen. Man findet nämlich nicht selten Stämme, auch Buchholz (8) z. B. hat solche beschrieben, die die Lackmusmolke nach kurzer anfänglicher Rötung bläuen, dann aber nach einigen Tagen bzw. etwa einer Woche eine zweite dauernde intensive Rötung hervorrufen. Der Ausdruck „Alkaligenes“, den Buchholz für diese Stämme verwendet, scheint mir nicht sehr glücklich gewählt, da er von Petruschky (1) doch gerade für Bakterien geprägt ist, welche die Lackmusmolke von vornherein und dauernd blau färben.

Zweifellos handelt es sich bei diesen Stämmen um eine langsam sich entwickelnde Fähigkeit, den Milchzucker zu zersetzen, welche nur in Lösungen zum Ausdruck kommt, da sie den Drigalskiagar dauernd blau zu lassen pflegen. Will man, worüber sich streiten ließe, diese Stämme überhaupt dem *Bacterium coli* zurechnen, so wird man sie wohl am besten als atypisches *Coli* bezeichnen.

Nicht ganz so einheitlich, wie beim *Bacterium coli* und der Erklärung schwieriger zugänglich sind die Angaben der Literatur über das Verhalten des *Typhusbacillus* in der Lackmusmolke. Nach den ersten Untersuchungen Petruschkys „pflegte der *Typhusbacillus* nach 24 Stunden gegenüber dem Kontrollgläschen einen Stich ins Rötliche zu zeigen. Nach 2 bis 3 Tagen stellte sich deutliche aber relativ geringe Rötung — Säuerung — ein, welche zur Neutralisation in der Regel 2 bis 3 Prozent $n/10$ Natronlauge erforderte“. Denselben Standpunkt vertritt in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1899 Petruschkys Assistent, Alfons

Fischer (10). Mit nachdrücklichem Hinweis auf die Wichtigkeit der Lackmusmolke betont er, daß jeder Bacillus, der in ihr viel Säure bilde, oder sich gar als Alkalibildner darstelle, kein Typhusbacillus sei. Im Lehrbuch von Kolle-Hetsch (11) heißt es, daß der Typhusbacillus nur eine ganz geringe Verfärbung des violetten Tones in den roten bewirkt, die Molke sonst aber klar läßt. Ähnlich lautet die Angabe Neufelds (7) im Kolle-Wassermannschen Handbuch. H. Pribřam (12) untersuchte 40 Typhusstämmen in Kahlbaumscher Lackmusmolke. Er fand in jedem Falle nach 20 Stunden Rötung und leichte Trübung und kommt zu dem Schlusse, daß ein Bacillus, der innerhalb einer Beobachtungszeit von 3 Wochen eine azurblaue Färbung der Molke hervorruft, kein Eberth'scher Bacillus sei. Auch Zupnik (13), der seine Stämme zu wiederholten Malen in einer in Abständen von mehreren Wochen von Kahlbaum bezogenen Lackmusmolke prüfte, kommt zu demselben Resultate, und bestätigte damit eine im gleichen Jahre von Boit (14) unter v. Drigalskis Leitung an etwa 100 Typhusstämmen ausgeführte Untersuchungsreihe. Der einzige Punkt, in dem beide Autoren nicht ganz einig sind, ist das Klarbleiben der Lackmusmolke. Zupnik stellte fest, daß alle von ihm untersuchten Stämme eine „wenn auch sehr geringe, doch deutliche“ Trübung zeigten, während Boit 24 Stunden nach der Einsaat bezüglich der Klarheit keinen Unterschied mit nicht geimpfter Lackmusmolke finden konnte. Er hält dieses Merkmal für so sicher, daß er nicht anstand, die Diagnose Typhusbacillus für erschüttert zu erklären, als in einem Falle außer der Rötung sich auch Trübung zeigte, deren durch eine Verunreinigung bedingte Ursache auszuschalten ihm erst nach mühevollen Isolierungsversuchen gelungen sei. Boit kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Lackmusmolke neben der Agglutination das feinste und sicherste Unterscheidungsmittel zwischen Typhus und typhusähnlichen Bazillen bilde. Bei reiner Typhuskultur bleibt die Klarheit der Lackmusmolke dauernd erhalten. Ihr anfangs dunkles Rot geht in wenigen Tagen in ein mittleres Rot über, das beim Fernbleiben von Verunreinigungen meist unverändert bleibt. In einzelnen Fällen nimmt das mittlere Rot nach längerer Zeit ohne nachweisbare Verunreinigung wieder einen dunkleren Farbenton an, von dem aus ein allmählicher Übergang ins Violette bis Dunkelblaue stattfinden kann. Diese letztere Beobachtung Boits, daß auch beim Typhusbacillus eine Verwandlung des ursprünglich roten Tones in blaue Färbung vorkommen kann, war nicht neu, denn es hatte schon 2 Jahre vorher Altschüler (15) unter 30 Typhusstämmen 5 gefunden, die nach vorhergehender Säuerung der Kahlbaumschen Lackmusmolke vom 3. Tage an Alkali bildeten, während alle übrigen noch nach 3 Wochen das typische

Verhalten — Säuerung nicht über 3 Prozent $n/10$ Säure — zeigten. Agglutinatorisch wurde die Typhusnatur dieser 5 Stämme bestätigt, bei einem außerdem noch durch den Pfeifferschen Versuch. Altschüler hält sich nach diesem Resultate nicht mehr für berechtigt, der Lackmusmolke zuliebe an der Typhusnatur dieser Stämme zu zweifeln. Er verlangt ihr gegenüber dieselbe Kritik wie z. B. dem Wachstum auf Kartoffel oder dem Verhalten zu einem Typhusimmunserum. „Das typische Wachstum in Lackmusmolke spricht wohl pro, eine nachträgliche Alkalibildung dagegen noch nicht contra Typhusbacillus.“ Diese Altschülerschen Ergebnisse sind bis jetzt in der Literatur nicht bestätigt worden, vielmehr hat man, vielleicht unter dem Eindruck der ebenfalls von Altschüler (16) behaupteten Umzüchtung des Alkaligenes in den Typhusbacillus, die Exaktheit seiner Versuchsbedingungen angezweifelt. Boit (14) erklärt: „Auf Grund meiner Untersuchungen stehe ich nicht an, anzunehmen, daß die nach 3 Tagen in die alkalische Reaktion umgeschlagenen Stämme keine Typhusreinkulturen waren. Der positive Pfeiffersche Versuch beweist zwar die Typhusnatur der Stämme, nicht aber ihre Reinheit.“

In Übereinstimmung damit schreibt Kutscher (17) im 1. Ergänzungsbande des Kolle-Wassermannschen Handbuches: die neuerdings von Altschüler gemachte Mitteilung, wonach in der Petruschkyschen Lackmusmolke von 30 Stämmen fünf schon vom 3. Tage an Alkali bildeten, konnte indes nicht von Kutscher und Meinicke an einem sehr umfangreichen Untersuchungsmaterial bestätigt werden, so daß der Wert der Typhusdiagnose mit Hilfe der Lackmusmolke nicht herabgesetzt sein dürfte. Reine Typhuskulturen säuerten die Lackmusmolke stets dauernd.

Die von Petruschky als Höchstmaß geforderten 3 Prozent $n/10$ Säure sind in den Angaben anderer Autoren teilweise recht erheblich überschritten worden. So gibt z. B. Weichardt (18) bei der Charakteristik mehrerer Typhusstämmen an, daß sie nach 2 mal 24 Stunden niemals mehr als 5 Prozent $n/10$ Säure gebildet hätten, während Schottmüller (24) in einer von Grübler bezogenen wie in einer selbstgemachten Lackmusmolke übereinstimmend bei einem sicheren Typhusstamme 16 Proz. $n/10$ Säure beobachtet haben will!

Zu einer Trennung des Typhus- vom Ruhrbacillus ist nach allgemeiner Anschauung die Lackmusmolke im Gegensatz zur Barsiekowlösung nicht geeignet: Beiden Bakterienarten wird im allgemeinen ein gleichartiges Verhalten in dieser Nährlösung zugeschrieben. Immerhin begegnet man einzelnen Widersprüchen. So findet sich bei Lentz (19) im Handbuch von Kolle-Wassermann die Angabe, daß nach anfänglicher leichter Rötung des Nährbodens vom 5. bis 6. Tage an allmählich die Bildung von Alkali einsetze, und damit ein Umschlag der roten Farbe

in Blau erfolge. An einer anderen Stelle (20) spricht derselbe Autor nur von der Säuerung der Lackmusmolke durch die echte Ruhr und stellt diese in Gegensatz zu der durch verschiedene Pseudodysenteriestämme nach anfänglicher Rötung bewirkten Blaufärbung. Ein ähnlicher Widerspruch findet sich in dem Buche von Lehmann und Neumann (21). Einmal heißt es dort: Das *Bacterium dysenteriae* erzeugt, wie der *Typhusbacillus*, in Lackmusmolke geringe Säuerung, an anderer Stelle (9) wird gesagt, der Ruhrbacillus mache die Molke sauer, später alkalisch. Doerr (22) gibt an, daß in einer von Grübler bezogenen Lackmusmolke der Säuregrad etwas stärker werden könne als beim *Typhusbacillus*. So habe ein Krusescher Stamm nach 4 Tagen einen Säuregrad entsprechend 6 Prozent n/10 Lauge entwickelt. Von der Mehrzahl der übrigen Autoren sind irgendwelche Unterschiede zwischen Typhus- und Ruhrbacillus nicht festgestellt worden.

Noch sehr viel bunter wird das Bild, wenn man die Beobachtungen sammelt, die über das Verhalten der Paratyphusbazillengruppe zur Lackmusmolke in der Literatur niedergelegt sind. Schottmüller (24), dem wir die erste Beschreibung der Paratyphuskrankheit in Deutschland verdanken, unterschied bereits zwei Typen des Paratyphusbacillus. Von den bei sechs Fällen isolierten Krankheitserregern verhielten sich nämlich zwei der Lackmusmolke gegenüber genau wie der *Typhusbacillus*, färbten sie also dauernd leicht rot, während die übrigen vier die Molke zwar zunächst ebenfalls leicht säuerten, sie dann aber nach etwa 10 Tagen alkalisch machten. Auf Grund dieser Unterschiede nannte Schottmüller den ersten Typus *Bacillus paratyphosus acidumfaciens*, oder Typus A., während der zweite von ihm als *Bac. paratyphosus alcalifaciens* Typus B bezeichnet wurde. In den zahlreichen Veröffentlichungen über den Paratyphus, die der ersten Schottmüllerschen Arbeit bald folgten, ist die Lackmusmolke bei der großen Mehrzahl der Fälle als differentialdiagnostisches Hilfsmittel mit Erfolg verwendet worden, und sie hat ihre Wertschätzung behalten, obgleich die in der Hand der einzelnen Autoren mit ihr erzielten Resultate recht verschiedenartig ausgefallen sind. Ziemlich übereinstimmend lauten lediglich die Angaben über die Reaktion des Paratyphus A, auf Grund deren neben serologischer Spezifität schon Brion und Kayser (25) den von ihnen gezüchteten Erreger einer Paratyphusepidemie dem Typus *acidumfaciens* einzureihen vermochten. Nach ihrer Angabe säuerte der von ihnen isolierte Stamm die Molke in demselben Grade wie der *Typhusbacillus*, ohne später eine alkalische Reaktion zu erzeugen. Ganz vereinzelt ist, soweit ich habe feststellen können, Bonhoff (26) mit seiner Anschauung geblieben, daß der Paratyphus A, ebenso wie der *Typhusbacillus*, die Reaktion der Lackmusmolke gänzlich

unverändert lasse. Etwas von der Schottmüllerschen Angabe abweichend schreiben Drigalski, Conradi und Jürgens (27) über ihr Saarbrückener Stäbchen: Petruschkys Lackmusmolke war nach 20 Stunden auch bei geringer Einsaat stark gerötet, blieb aber völlig klar, nach 3 bis 4 Tagen war diese Färbung einer stahlblauen gewichen. Die Titrierung ergab nach 24 Stunden einen Verbrauch von 0.37 bis 0.4^{cem} n/10 Lauge auf 10^{cem} Lackmusmolke. Ein ganz anderes Verhalten berichtete Hünemann (28) von seinem Paratyphus B-Stamm in der Lackmusmolke. Dieser sollte nämlich, obgleich er in Neutralrotagar Fluoreszenz und Gasbildung hervorrief, in der Lackmusmolke mit leichter Trübung wachsen, aber ohne Farbenveränderung und ohne Säurebildung. Krane-puhl (29) beobachtete bei dem Erreger eines Paratyphusfalles schon nach 24 Stunden Alkalibildung in der Molke, während Poggenpohl (30) erklärt, der Paratyphus B-bacillus erzeuge nach etwa 14 Tagen eine alkalische Reaktion der Lackmusmolke. Die Ergebnisse der beiden zuletzt erwähnten Autoren bezeichnen etwa die Grenzen in den Schwankungen der Zeitangaben. So sagt denn auch Kutscher (31) im Handbuch von Kolle-Wassermann: „Bezüglich des Umschlagens wechseln die Angaben von kürzester Zeit (2 Tage) bis zu mehreren Wochen. Diese voneinander abweichenden Beobachtungen hängen sehr wahrscheinlich mit der Menge der Einsaat und der ungleichen Wachstumsenergie der einzelnen Stämme zusammen.“ Lentz (32) sah an einer größeren Anzahl von Paratyphusstämmen alle Übergänge vom langsamen zu schnellem Umschlag, sowie völliges Freibleiben der Oberfläche bis zur Kahmhautbildung in kürzester Zeit. Präziser wird im Lehrbuch von Kolle und Hetsch (11) erklärt, daß nach anfänglicher Rötung und Opaleszenz die Molke beim Paratyphus B vom dritten Wachstumstage unter zunehmender Trübung einen bläulichen Ton annehme, bis sie unter Klärung nach 10 bis 12 Tagen intensiv blau geworden sei im Gegensatz zu den übrigen Vertretern der Typhus-Coli-gruppe, bei denen bekanntlich der Umschlag in dunkles Blau nie erfolge. Ähnlich äußern sich Kisskalt (33) und Lehmann und Neumann (21).

Noch größer werden die Widersprüche, wenn man zum Vergleiche auch die Angaben über die Bakterien der Enteritis, der Schweinepest, Kälberruhr und des Mäusetyphus heranzieht, die ja für gewöhnlich als kulturell identisch mit dem Paratyphus B-Bacillus angesehen werden. Am einheitlichsten lauten noch die Resultate bezüglich des Bacterium enteritidis Gärtner. Der Tibertische (34) Stamm schlug nach 7 bis 8 Tagen um, manchmal schneller auftretende Trübung und Farbumschlag werden mit der wechselnden Menge der Einsaat in Zusammenhang gebracht. Nach Fischers (35) Angabe, der zu ähnlichen

Ergebnissen kam, hat auch Durham bei Fleischvergiftungsstämmen nach zunächst eintretender Rötung sehr früh Blaufärbung beobachtet. Auf letztere Tatsache wird in den Lehrbüchern ebenfalls verschiedentlich hingewiesen. In direktem Gegensatz dazu steht die Äußerung von van Ermengem (36), das *Bacterium enteritidis* Gärtner entwickle in der Lackmusmolke ziemlich starkes Wachstum ohne Farbenänderung oder Säureproduktion.

Der Hogeholera- oder Schweinepestbacillus war einer der ersten, bei denen sich von Smith (37) das Umschlagen der Molke feststellen ließ, er wurde daher von diesem Autor als ein Alkalibildner für die Molke bezeichnet. Im Widerspruche hierzu heißt es bei Joest (38): Der *Bacillus suipestifer* erzeugt in Lackmusmolke deutliche Rotfärbung, die auch nach Wochen noch unverändert besteht! Die gebildete Säuremenge entspricht 5 bis 6 Prozent n/10 Lauge. Übereinstimmend hiermit erklärt Boeder (39), daß die Bazillen der Schweinepest und der Fretschenseuche die Molke bereits nach 20 Stunden deutlich säuern, und daß die starksaure Reaktion noch nach Wochen unverändert ist. Als Gegensatz zu den Resultaten dieser beiden Autoren führt Koske (40) die Ergebnisse Graberts an, der bei 14 von 17 Schweinepeststämmen nach anfänglicher Rötung im Verlaufe von 49 bis 72 Stunden alkalische Reaktion eintreten sah; bei den übrigen erfolgte der Umschlag der Molke erst nach 8 bis 14 Tagen. Im Lehrbuch von Kolle-Hetsch (23) endlich wird nur von deutlicher Rotfärbung der Lackmusmolke durch den *Bacillus suipestifer* berichtet, eine Alkalibildung wird nicht erwähnt.

Die gleichen Differenzen herrschen in den Angaben über den Mäusetyphus. Löfflers (41) erste Mitteilung enthält zwar nichts über sein Verhalten in der Molke, doch wird ihm Säuerung der Milch unter reichlichem Wachstum zugeschrieben. Damit unvereinbar ist die Angabe Bongerts (42), daß der Mäusetyphusbacillus die Molke unter Trübung stark bläue. Die Lehrbücher bezeichnen seine Eigenschaften als völlig übereinstimmend mit dem Paratyphus B, was also anfängliche Säuerung, dann Alkalibildung bedeuten würde, mit Ausnahme von Lehmann und Neumann (21), nach denen er die Lackmusmolke von vornherein alkalisch macht. Also auch hier ist jede mögliche Reaktion beobachtet worden.

Über das Verhalten der Kälberruhrbazillen gibt Jensen (43) an, daß sie die Lackmusmolke dauernd säuerten. In der Sammlung unseres Institutes finden sich 2 als Kälberruhr bezeichnete Stämme unbekannter Herkunft, welche in der Kahlbaumschen Lackmusmolke im Verlaufe

von 2 bis 3 Tagen nach anfänglicher Säuerung eine alkalische Reaktion erzeugen.

Die Unterschiede, die hiernach die einzelnen Vertreter der Paratyphus B-Gruppe in ihrem Verhalten gegen die Lackmusmolke zeigen, lassen es naheliegend erscheinen, sie zur Differentialdiagnose innerhalb der Gruppe zu verwerten. Indes sind die Verschiedenheiten hierfür zu wenig ausgeprägt und nicht konstant gewesen. Böhme (44) beobachtete übereinstimmend mit Bonhoff (26), daß die Mäuse-typhus- und Schweinepeststämme im allgemeinen früher umschlugen als der Paratyphus B. Der einzige recht charakteristische Unterschied in den Ergebnissen beider Autoren ist nur die absolute Zeit des Umschlages, welcher in allen Fällen bei Bonhoff um einige Tage später angegeben wird. Einen qualitativen Unterschied bezeichnen die Feststellungen Kreuders (46), der Mäuse-typhus mache die Molke trübe und alkalisch, während die Enteritidis-Gärtner- und Suipestiferstämme sie erst nach anfänglicher Säuerung bläuten. Kutscher und Meinicke (47) führen geringe quantitative Unterschiede in der Zeit des gewöhnlich nach 2 bis 4 Tagen eintretenden Umschlages der Paratyphus B- und Enteritisgruppe auf verschiedenen Säuregehalt des Glases zurück. Die Angabe v. Drigalskis (48), welcher bei seinem Neunkirchener Stäbchen einen qualitativen Unterschied gegen den Paratyphus B festgestellt haben wollte, konnten sie nicht bestätigen und legen diesen Widerspruch einer nicht einwandfreien Lackmusmolke v. Drigalskis zur Last. Trautmann (49) stellte in seiner vergleichenden Arbeit bei dem zur Gärtnergruppe gehörigen Düsseldorfer Stäbchen Alkaleszenz der Molke vom 6. Tage ab fest. Bezeichnend für das Durcheinander der Anschauungen ist aus seiner Veröffentlichung folgender Satz: „Weiter besteht keine absolute Einheitlichkeit in den Angaben über die Veränderungen der Lackmusmolke. Schottmüller gibt für Typus A seiner Stämme Säuerung der Molke und dauernde ‚roströte‘ Färbung an, Brion und Kayser ein gleiches Verhalten wie bei *Bacterium typhi*, bei dem bekanntlich (!) Molke nach 8 bis 14 Tagen wieder leicht alkalisch wird, was ich bei Brions Stäbchen aber erst nach 3 bis 4 Wochen feststellen konnte. (Brion und Kayser hatten, wie erwähnt, unter dem gleichen Verhalten wie bei *Bacterium typhi* eine dauernde leichte Rotfärbung verstanden.) Für Typus B sah Hünemann bei seinem Stamm ‚Wachstum mit leichter Trübung, aber ohne Säurebildung‘, während für die anderen Stämme des Typus B von den Autoren stets spätestens in der 2. Woche alkalische Reaktion mit vorausgegangener Säuerung festgestellt wird. Meine Versuche stimmen mit ihnen überein. Aber auch bei dem Hünemannschen Stamme sah ich nach anfänglicher Säuerung vom 8. Tage ab die Reaktion mehr und mehr alkalisch werden.“

Die Trautmannsche Arbeit ist aus dem Bonner Laboratorium hervorgegangen, der Stamm Hünemann befindet sich noch in unserer Sammlung, er erzeugt in jeder Kahlbaumschen nicht länger als $\frac{1}{2}$ Stunde sterilisierten Lackmusmolke nach anfänglicher Säuerung spätestens am 3. Tage eine alkalische Reaktion. In der Hand dreier Untersucher hat also derselbe Stamm drei verschiedene Reaktionen in der Lackmusmolke geliefert.

Allen bisher erwähnten Mikroorganismen ist die Fähigkeit gemeinsam, die Lackmusmolke zu säuern, und sie sind dadurch mit Sicherheit zu trennen von einer Gruppe nicht selten anzutreffender Darmbakterien, welche eben, weil sie die Molke ohne anfängliche Säurebildung alkalisch machen, unter dem Namen *Bacillus faecalis alcaligenes* zusammengefaßt sind. Der erste Vertreter dieser Gruppe wurde von Petruschky (1) gezüchtet und in seiner Eigenart durch die Reaktion in der Molke erkannt. Später sind dann, nachdem auch auf sein gelegentliches Vorkommen als Krankheitserreger hingewiesen war, von Klimenko (50) in einer vergleichenden Untersuchungsreihe verschiedene Unterarten beschrieben worden. Ihr Verhalten in der Lackmusmolke beruht darauf, daß sie keines von den in diesem Nährboden enthaltenen Kohlenhydraten unter Säurebildung zu spalten vermögen, wohl aber unter mehr oder minder lebhaftem Wachstum zur Alkalibildung befähigt sind. Nicht recht verständlich ist darum die Angabe im Lehrbuch von Lehmann und Neumann (21), daß die meisten Schwierigkeiten die Abtrennung des *Bacillus faecalis alcaligenes* vom *Typhusbacillus* verursache. Im Gegenteil verdankt die Lackmusmolke nicht zum geringsten der Tatsache ihre Bedeutung, daß durch diese Reaktion der sonst kulturell nicht vom *Typhusbacillus* zu unterscheidende *Bacillus faecalis alcaligenes* mit Sicherheit zu diagnostizieren ist.

Die Widersprüche, die über das Verhalten der *Typhuscoligruppe* in der Lackmusmolke mitgeteilt worden sind, dürften in der ganzen bakteriologischen Literatur wohl kaum ihresgleichen finden; sie erschienen mir sonderbar genug, um sie noch einmal in gedrängter Übersicht tabellarisch zusammenzustellen (vgl. nebenstehende Tabelle I).

Die Mannigfaltigkeit der hier aufgezählten Widersprüche, die sich noch beträchtlich vermehren ließen, ist so groß, daß es nicht möglich ist, sie allein mit Verschiedenheiten der von den einzelnen Autoren geprüften Stämme zu erklären. Es liegt vielmehr nahe, für den weitaus größeren Teil der sich widersprechenden Angaben die Ursache zu suchen in verschiedenem Verhalten der Lackmusmolke.

Zur Prüfung dieser Annahme müssen wir versuchen, über die Wirkungsweise der Lackmusmolke ins Klare zu kommen.

Tabelle 1.

Typhusbacillus		Ruhrbacillus	
Petruschky	leicht rot, kein Umschlag	Shiga	leicht rot
Altschüler	Umschlag möglich nach einigen Tagen	Lentz i. K. W.	leicht rot, später Umschlag
Boit	Umschlag in seltenen Fällen nach Monaten	Lentz Z. f. H.	leicht rot, kein Umschlag
Kutscher	leicht rot, niemals Umschlag	Lehmann-Neumann	leicht rot,
Bonhoff	keine Säuerung	Lehmann-Neumann	leicht rot, später Umschlag
Lehrbücher	leicht rot, niemals Umschlag	Lehrbücher	leicht rot, kein Umschlag
Paratyphus A-Bacillus		Mäusetyphusbacillus	
Schottmüller	leicht rot, kein Umschlag	Löffler	Milch sauer
Bonhoff	keine Rötung	Bongert	Bläunung
Trautmann	Umschlag nach 3 Wochen	Lehmann-Neumann	desgl.
Brion und Kayser	niemals Umschlag	Kreuder	desgl.
Lehrbücher	niemals Umschlag	Lehrbücher	leicht rot, dann blau
Paratyphus B- und Enteritidisbacillus		Bacillus suispestifer	
Schottmüller	leicht rot, dann blau	Th. Smith	rot, dann blau
Hünemann	Trübung ohne Farbenänderung	Joest	dauernd rot
v. Ermengem	desgl.	Boeder	desgl.
v. Drigalski	Paratyphusbazillen rot, klar	Koske	rot, dann blau
v. Drigalski	Enter. Brügge rot, klar	v. Drigalski	rot, klar
Lehrbücher	leicht rot, dann blau	Kolle-Hetsch	dauernd rot
		Lehrbücher	rot, dann blau

Ursprünglich nahm Petruschky an, daß sich die Bakterien ganz allgemein in Alkali- und Säurebildner einteilen ließen, und daß diese Eigenschaft ein vom Nährboden unabhängiges Charakteristikum des betreffenden Bacteriums sei. Auch Löffler (45) glaubte damals diese Anschauung für seine Geißelfärbungsmethode verwerten zu können, indem er, je nachdem es sich um säure- oder alkalibildende Bakterien handele, eine Beize von verschiedener Reaktion für erforderlich erklärte. Diese Ansicht dürfte heute wohl allgemein aufgegeben sein, und zwar ist es das große Verdienst von Th. Smith (37), zuerst scharf betont zu haben,

daß die Frage, ob ein Bacterium Säure oder Alkali produziere, in erster Linie vom Nährboden abhängt. Wenn man von dieser jetzt allseitig anerkannten Tatsache ausgeht, so bietet die Reaktion des Bacterium coli in der Lackmusmolke, welcher die Milchzuckerzersetzung das charakteristische Gepräge verleiht, zu Schwierigkeiten der Erklärung ebensowenig Anlaß, wie die der Gruppe des Faecalis alcaligenes, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er keines der in der Molke vorhandenen Kohlenhydrate zu zersetzen vermag.

Dagegen ist die Frage, die für die Beurteilung des Wertes und der Wirkungsweise der Lackmusmolke die wichtigste ist, die Frage, warum der Typhusbacillus soviel weniger Säure in der Molke bildet als das Bacterium coli, in der Literatur sehr verschieden beantwortet worden. Proskauer und Capaldi (4) erklären die Unterschiede der Säurebildung in der Molke für rein quantitativer Natur, sie nehmen also wohl an, daß auch die vom Typhus gebildete Säure aus dem Milchzucker stamme. Auch Heim (2) gibt in seinem Lehrbuche der Bakteriologie an, der Typhusbacillus bilde in der Lackmusmolke aus dem darin enthaltenen Milchzucker nicht mehr Säure, als zur Neutralisation von 2 bis 3 Prozent Normalkalilauge erforderlich sei. Heim scheint also ebenfalls eine Zersetzung des Milchzuckers selbst durch den Typhusbacillus anzunehmen, eine Auffassung, die auch in dem Lehmann-Neumannschen Buche vertreten wird. Diese Autoren erklären die Tatsache, daß eine Reihe von Mikroorganismen, welche die Lackmusmolke schwach säuern, blaue Drigalskikolonien liefern, damit, daß die sehr geringe Säuremenge, die aus dem Milchzucker gebildet wird, nicht ausreicht, um auf dem stark alkalischen Drigalskiagar eine Rötung herbeizuführen, wohl aber in der neutralen Lackmusmolke. Damit wird also die leichte Rötung dieses Nährbodens durch den Typhusbacillus auf eine geringgradige Milchzuckerzersetzung zurückgeführt.

In jüngster Zeit ist dieser Anschauung Ausdruck verliehen worden von Kruse (52): Der Typhusbacillus säuert Milchzucker überhaupt nicht oder höchstens ganz unbedeutend. Daraus erklärt sich auch das Verhalten zur Milch und Lackmusmolke.

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Autoren vertrat Th. Smith (51) als erster die Ansicht, daß der Typhusbacillus nicht imstande sei, Milchzucker zu zersetzen; die schwache Säurebildung in der Molke erklärte er mit der Anwesenheit eines zweiten Kohlenhydrates. Die Menge dieser Substanz, welche sich Bakterien gegenüber wie Dextrose verhalte, betrage in der Milch 0.1 Prozent.

Das Ergebnis der Smithschen Arbeit steht im Widerspruch zu einer 3 Jahre vorher von Loesener (53) verfochtenen Anschauung, der über

den Chemismus der Säurebildung annimmt, daß bei der Herstellung der Molke der größte Teil des Milchzuckers in Dextrose und Galaktose übergeführt worden sei, welche beide vom Typhusbacillus zersetzt werden könnten. Hiermit könnte aber nur die Säurebildung an sich und nicht der große Unterschied zwischen *Bacterium coli* und Typhus erklärt werden.

Einen vermittelnden Standpunkt bezüglich der Art des vom Typhusbacillus angreifbaren Kohlenhydrates nimmt Neufeld (54) ein. Nach seiner Ansicht enthält die Milch von vornherein eine kleine Menge, etwa 0.1 Prozent einer anderen Zuckerart, die sich wie Dextrose verhält. Auf der Zersetzung dieser und anderer Zuckerarten, die bei der Sterilisation der Molke vom Milchzucker abgespalten würden, beruhe die Säurebildung durch den Typhusbacillus.

Auf Grund dieser Widersprüche in der Literatur ergibt sich also als Ziel für eigene Versuche die Beantwortung folgender Fragen:

Entsteht die leichte Säuerung der Molke durch den Typhusbacillus infolge der Zersetzung kleiner Mengen des Milchzuckers, oder enthält die Molke ein zweites durch den Typhusbacillus zersetzbares Kohlenhydrat? Und wenn das der Fall ist, ist es entstanden infolge der Spaltungsprozesse des Milchzuckers bei der Herstellung der Molke, oder ist es bereits in der Milch präformiert vorhanden? Als dritte Möglichkeit endlich war die Anwesenheit beider letzteren Substanzen gemeinsam in der Molke in Betracht zu ziehen.

Eigene Versuche.

Impft man ein Röhrchen der käuflichen sterilisierten Milch¹ mit Typhus, so zeigt sich am nächsten Tage nach Lackmuszusatz eine deutliche Rötung. Es würde aber nicht richtig sein, hieraus auf eine Zersetzung des Milchzuckers zu schließen, weil sich durch den Vorgang der Sterilisation alle möglichen chemischen Veränderungen mit dem Milchzucker vollzogen haben können.

Andererseits ist aber auch eine Lösung von Milchzucker in der gewöhnlichen zuckerfreien Bouillon für die Entscheidung der in Betracht kommenden Fragen nicht geeignet; denn es muß bei ihr, wie bei allen komplizierter zusammengesetzten guten Nährböden, mit der Möglichkeit der Alkalibildung gerechnet werden. Wenn also, wie es tatsächlich der Fall ist, eine solche Lösung keine Säurebildung zeigt, so könnte das immer auf die Neutralisation einer entstandenen geringen Säuremenge durch gleichzeitig gebildetes Alkali zurückgeführt werden.

¹ Natura-Milch Exportgesellschaft. Waren i. M.
Zeitschr. f. Hygiene. LXXI

Ich verwandte daher zur Entscheidung der Frage, ob der Typhusbacillus imstande ist, kleine Mengen des Milchzuckers zu zersetzen, zunächst eine Lösung von 2 Prozent chemisch reinem Milchzucker in destilliertem Wasser, der nach der Sterilisation 0.02 Prozent Dinatriumphosphat und als Indikator Azolithmin, beides ebenfalls steril, hinzugesetzt waren. Wurde diese Lösung mit Typhus geimpft, so zeigte sich trotz ihres geringen Nährwertes am nächsten Tage eine deutliche Rötung, zu deren Neutralisation ich auf 10^{ccm} allerdings nur die außerordentlich geringe Menge von 0.1^{ccm} $\frac{1}{50}$ -Normalnatronlauge gebrauchte. War diese geringfügige Säuerung durch eine teilweise Zersetzung des Milchzuckers hervorgerufen, so war anzunehmen, daß sie schwächer würde mit dem Sinken des Milchzuckergehaltes, und sie mußte verschwinden in einer Lösung von Azolithmin und Phosphat ohne Milchzucker. Der Versuch lehrte, daß in einer Lösung von Azolithmin, Phosphat und 0.5 Prozent Milchzucker und auch bei völligem Fehlen des Milchzuckers die Rötung denselben Wert zeigte wie in der 2prozentigen Milchzuckerlösung. Die Säurebildung stammt also nicht aus dem Milchzucker.

Wenn nun auch unter den Bedingungen dieses Versuches der Milchzucker vom Typhusbacillus nicht zersetzt worden war, so ließe sich noch der Einwand erheben, daß infolge schlechter Wachstumsbedingungen in der ungünstigen Nährlösung die Bakterien ihn nicht mehr zu zersetzen vermöchten, während sie unter besseren Bedingungen dazu imstande seien. Ganz sicher wird sich diese Frage für den Typhusbacillus überhaupt nicht entscheiden lassen, weil man in allen besseren Nährlösungen mit der Bildung von Alkali rechnen muß. Gegen die Annahme, daß das spärliche Wachstum der Grund für das Ausbleiben der Zuckerzersetzung sei, spricht indessen das Verhalten eines Paratyphusstammes, der in der angegebenen Lösung noch ein ziemlich lebhaftes Wachstum zeigte. Auch dieser brachte keine höheren Säurewerte hervor als der Typhusbacillus.

Woher stammt aber die Säurebildung? Vielleicht aus dem Azolithmin? Ich setzte also der Lösung das Azolithmin nachträglich, lediglich als Indikator zu, es zeigte sich jedoch dieselbe Rötung. Nun konnte man noch an Reste des Nährbodens aus der Agarkultur als Ursache der Säurebildung denken. Ich verwandte daher auch Bakterien, die vorher wiederholt in steriler NaCl-Lösung ausgewaschen waren, aber auch hier fiel die Reaktion ganz gleichartig aus. Es müssen also wohl geringfügige organische Bestandteile des destillierten Wassers für die Säurebildung verantwortlich gemacht werden, oder sie wird hervorgerufen durch saure Ausscheidungsprodukte der Bakterien selber. Das letztere ist das

wahrscheinlichere; denn auch der *Bacillus faecalis alcaligenes* Petruschky, der aus Kohlenhydraten keine Säure bildet, säuerte steriles destilliertes Wasser im Verlaufe von 24 Stunden bei 37° in derselben Weise wie Typhus und Paratyphus. Auf den gleichen Vorgängen beruht wohl auch die von Petruschky gemachte Beobachtung betreffs der Säurebildung durch den Typhusbacillus in destilliertem Wasser.

Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß der Typhusbacillus ganz geringe Säuremengen zu bilden vermag, daß diese aber nicht aus dem Milchzucker stammen und auch nicht entfernt ausreichen zur Erklärung der Reaktion in der Petruschkyschen Lackmusmolke, weil sie nur einen geringen Bruchteil der in diesem Nährboden zu erzielenden Säuerung bilden.

Wenn es nun also der Milchzucker nicht ist, der die Säurebildung durch den Typhusbacillus in der Lackmusmolke veranlaßt, so müssen andere Bestandteile dieses Nährbodens dafür verantwortlich gemacht werden. Es galt daher, zunächst die Frage zu prüfen, ob ein solcher Bestandteil bereits präformiert in der Milch vorhanden ist. Auch hierüber herrscht in der Literatur alles andere als Übereinstimmung. Ritthausen (55) extrahierte die bei der quantitativen Bestimmung der Eiweißsubstanzen in der Milch erhaltenen Kupferniederschläge mit Alkohol und Äther und erhielt so einen kohlenhydratartigen Körper, jedoch in so geringer Menge, daß es nicht möglich war, weitere Untersuchungen damit auszuführen, um die Eigenschaften und die Natur der Materie, die mehr Ähnlichkeit mit dem Dextrin als dem Milchzucker hat, genauer festzustellen. Diese Beobachtung Ritthausens wurde in den siebziger Jahren als vorläufige Mitteilung veröffentlicht, eine ausführliche Arbeit ist ihr nicht gefolgt. Später gelangten dann zu ähnlichen Resultaten Schmöger (56), Béchamp (57) und v. Raumer und Späth (58).

Die Existenz des zweiten Kohlenhydrates in der Milch ist nach Scheibes (59) Ansicht hypothetisch geblieben, da keiner dieser Autoren mit näheren Angaben über die Beschaffenheit desselben an die Öffentlichkeit getreten ist. Scheibe leugnet vielmehr auf Grund seiner Untersuchungen, deren Veröffentlichung im Tone abschließender Arbeit gehalten ist, die Anwesenheit eines zweiten Kohlenhydrates in der Milch und schreibt die Ergebnisse der übrigen Autoren unzulänglichen Methoden zu, ebenso bestreitet er die von anderen Untersuchern behauptete Anwesenheit eines Kohlenhydrates, der „Muttersubstanz des Milchzuckers“, im Colostrum und in der Milch neumelkender Kühe. In einem Referate über die Scheibesche Arbeit erklärt Leichmann (60), das fragliche dextroseartige Kohlenhydrat könne in der Milch nicht vorhanden sein, da der Bacillus

Delbrückii, der den Milchzucker gar nicht angreift, wohl aber Dextrose, Lävulose, Maltose, Rohrzucker, Dextrin vergäre, in Milch keinerlei Gärungserscheinungen hervorrufe. Immerhin empfiehlt er, Milch verschiedener Herkunft nach dieser Methode zu prüfen, da das Kohlenhydrat nicht in jeder Kuhmilch vorhanden sein sollte. Schließlich möge noch eine Angabe Sebeliens (61) erwähnt werden, der in Übereinstimmung mit den Angaben Söldners in der Milch das Vorhandensein eines Kohlenhydrates festgestellt hat, welches in der Menge von etwa 0.03 Prozent auftritt und von ihm für Arabinose gehalten wird.¹

Da also die Ergebnisse der chemischen Literatur ebenso widerspruchsvoll sind wie die der bakteriologischen Forschung, so versuchte ich mir auf dem Wege eigener Experimente Klarheit über das in Frage kommende Kohlenhydrat zu verschaffen. Zu diesem Zwecke fällte ich, dem Vorschlage von Durham (62) entsprechend, aus frischer Kuhmilch das Kasein durch Labferment aus und schickte die Molke, zu gleichen Teilen mit Wasser verdünnt durch ein Berkefeldfilter. Ich erhielt so eine sterile Molke, in welcher sicher wegen der Vermeidung jeder Erhitzung keine Spaltungsprodukte des Milchzuckers vorhanden waren. 24 Stunden nach der Besäung mit Typhusbazillen zeigte sich nun eine Säuerung, zu deren Neutralisation auf 10^{cem} im Durchschnitt etwa 0.1^{cem} Zehntelnormallauge erforderlich waren. Diese Säuremenge, welche ungefähr das Fünffache des bereits erwähnten in reinen Milchzuckerlösungen erhaltenen Säurequantums beträgt, muß also herrühren aus der Zersetzung eines zweiten neben dem Milchzucker in der Milch vorhandenen Kohlenhydrates, an dessen Existenz im Gegensatz zu den Anschauungen Löseners, Scheibes u. a. hiernach festzuhalten ist.

Nun bleibt aber noch die Differenz zwischen den 0.1^{cem} 1/10-Normalsäure in der berkefeldfiltrierten und den 0.3^{cem} in der auf gewöhnliche Weise hergestellten Molke zu erklären. Hierfür können nur Spaltungsprodukte des Milchzuckers in Betracht kommen.

Schon seit langem ist es bekannt, daß sich der Milchzucker beim Kochen in saurerer Lösung in Dextrose und Galaktose spaltet. Da beide Zuckerarten vom Typhusbacillus unter Säurebildung zersetzt werden, könnte hierin die Erklärung für das Verhalten des Typhusbacillus gesucht werden, wenn man annehmen wollte, daß das Kochen der Molke immer in saurer Lösung vor sich ginge. Nun pflegt aber aus gleich zu erörternden Gründen beim Kochen der Molke die alkalische Reaktion zu überwiegen; es ist deshalb auch zu untersuchen, wie sich der Milchzucker beim Kochen in alkalischer Lösung verhält.

¹ Zit. nach W. Grimmer, *Chemie und Physiologie der Milch*.

Aus den Untersuchungen von Hoppe-Seyler (67), Kiliani (68), Beythien, Parcus und Toileus (69) u. a. wissen wir, daß durch Alkalien aus dem Milchzucker Milchsäure gebildet wird. Über die sonst noch auftretenden Spaltungsprodukte ist wenig bekannt. Hoppe-Seyler erwähnt Brenzkatechin, Ameisensäure u. a.: das Auftreten von Kohlenhydraten oder kohlenhydratähnlichen Körpern scheint bislang nicht näher untersucht zu sein. Und doch läßt sich durch einen einfachen Versuch nachweisen, daß auch in alkalischer Lösung und zwar schon bei sehr geringen Alkalimengen aus dem Milchzucker Körper entstehen, die durch den Typhusbacillus unter Säurebildung zersetzt werden. Ob das allerdings wirklich Kohlenhydrate sind, muß ich dahin gestellt sein lassen.

Zu je 50^{cem} einer 2prozentigen Milchzuckerlösung wurden 0.25, 0.5, 1.0 und 5^{cem} Normalnatronlauge hinzugesetzt, und die Mischung 2 Stunden gekocht. Die Lösungen entsprachen also etwa einer $\frac{1}{200}$ bis $\frac{1}{10}$ normalen Natronlauge: trotzdem waren nach dem Kochen die schwächeren Konzentrationen neutral, die stärkeren sogar deutlich sauer geworden. Sämtliche Lösungen waren deutlich gefärbt: vom leichten Gelb bei dem schwächsten bis zum deutlichen Braun bei dem stärksten Alkalizusatz. Von diesen Lösungen wurde nun je 1^{cem} mit 9^{cem} einer Nährlösung vermischt, die 0.5 Prozent Kochsalz, 0.25 Prozent Pepton und 0.25 Prozent Dinatriumphosphat enthielt. In dieser Lösung wächst der Typhusbacillus ziemlich üppig, natürlich ohne Säure zu bilden. Durch Zusatz der mit Alkali gekochten Milchzuckerlösung tritt aber Säurebildung auf, und zwar im allgemeinen um so mehr, je größer der Alkaligehalt der Milchzuckerlösung war. Nur in der Lösung mit dem stärksten Alkaligehalt ist die Säurebildung wieder schwächer; das liegt wohl daran, daß hier durch andere Spaltungsprodukte das Wachstum stark gehemmt war. Die näheren Resultate gibt die folgende Tabelle II.

Tabelle II.

Nummer	Alkalizusatz zu 50 ^{cem} 2prozentiger Milchzuckerlösung cem Normallauge	Reaktion nach dem Kochen	Reaktion der Mischung mit der Nährlösung		Säure- bildung $\frac{1}{10}$ Norm.- Lösung
			vor d. Wachstum des Typhusbazillus	nach	
1	0	neutral	blau	blau	0
2	0.25	schwach sauer	„	leicht rot	0.05
3	0.5	sauer	„	„ „	0.05
4	1.0	„	leicht rötlich	rot	0.5
5	2.0	„	rötlich	„	0.5
6	5.0	„	rötlich, verfärbt	unverändert, nicht gewachsen	0

Der Versuch wurde in verschiedener Anordnung mit verschiedenen Konzentrationen immer mit demselben Resultate wiederholt. Tabelle III gibt noch einen Versuch wieder, bei dem Milchzucker und Alkali von vornherein der Nährlösung hinzugefügt wurden; die Nährlösung war dieselbe, wie die zu dem vorigen Versuch benutzte, und das Resultat deckt sich fast genau mit dem des ersten Versuches.

Tabelle III.

Nr.	Alkalizusatz zu 50 ^{ccm} der Nährlösung	Reaktion nach dem Kochen	Reaktion nach dem Wachstum des Typhusbacillus
1	0	blau	blau
2	0.05	„	rötlich
3	0.10	etwas rötlich	rot
4	0.20	rötlich	„
5.	0.5	„	unverändert, nicht gewachsen

Wir sehen also aus diesen Versuchen zweierlei: Einmal, daß innerhalb der Grenzen des Versuches der **Säuregrad** der Nährlösung nach dem Kochen um so stärker wird, je mehr **Alkali** vor dem Kochen zugesetzt war, und zweitens, daß die durch den Typhusbacillus produzierte Säuremenge ebenfalls mit der Größe des vorherigen Alkalizusatzes zunimmt.

In diesen beiden Tatsachen liegt die Erklärung für das Verhalten des Typhusbacillus in der Lackmusmolke und für die Schwierigkeiten ihrer Bereitung. Wenn schon eine so geringe Alkaleszenz, wie sie im Versuche verwandt wurde, zu einer deutlichen Zersetzung des Milchzuckers führt, so ist bei der Herstellung der Molke die Zersetzung des Milchzuckers und damit die Abspaltung eines durch den Typhusbacillus unter Säurebildung angreifbaren Körpers nicht zu vermeiden, und da die Menge dieses Körpers von der Größe des Alkalizusatzes und, wie in besonderen Versuchen festgestellt wurde, auch von der Kochdauer abhängig ist, muß die Säurebildung durch den Typhusbacillus von diesen beiden Faktoren abhängig sein. Es wird sich also eine Lackmusmolke, in welcher der Typhusbacillus eine bestimmte Säuremenge bildet, nur dann sicher herstellen lassen, wenn Alkalizusatz und Kochdauer in denselben engen Grenzen gehalten werden.

Tatsächlich beherrscht man aber, wenn man nicht sehr große Übung besitzt, diese beiden Faktoren bei der Herstellung nicht. Hier kommt die zweite Tatsache, die Säurebildung aus Milchzucker in alkalischer Lösung, in Betracht. Jeder, der einmal selbst Lackmusmolke hergestellt hat, weiß, daß nach dem Kochen die Reaktion saurer zu werden pflegt. Wenn

man sich dann verleiten läßt, Alkali in größerem Überschuße hinzuzufügen, so wird dadurch ein *Circulus vitiosus* geschaffen, der zu immer größerem Alkalizusatz, zu immer längerem Kochen und zur Abspaltung immer größerer Mengen des durch den Typhusbacillus angreifbaren Körpers führt. Es kann dann eine Nährlösung entstehen, die diesen Körper in so großen Mengen enthält, daß sich Typhus und Paratyphus kaum noch in ihrer Säurebildung von *Bacterium coli* unterscheiden.

Nach dem Gesagten ist es verständlich, daß auch ein so sorgfältig hergestelltes Präparat, wie es zweifellos die Kahlbaumsche Lackmusmolke ist, nicht immer die gleiche Zusammensetzung aufweisen kann. Auch in ihr schwankt die Säurebildung des Typhusbacillus etwas, und die Differenzen lassen sich noch wesentlich vergrößern durch längeres Kochen der Molke. In einer Kahlbaumschen Molke, in der nach $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen der Typhusbacillus 3 Prozent Zehntelnormalsäure bildet, stieg die Säurebildung durch 2stündiges Kochen auf 5 Prozent. Die Petruschky'sche Forderung, daß der Typhusbacillus in der Lackmusmolke nicht mehr als 3 Prozent Zehntelnormalsäure bilden dürfe, läßt sich also in dieser Strenge wohl nicht aufrecht erhalten. Unter 6 von Kahlbaum bezogenen Präparaten entsprachen nur 2 dieser Forderung, und auch diese nur dann, wenn sie nicht länger als $\frac{1}{2}$ Stunde sterilisiert wurden.

Die Frage der Säurebildung in der Molke dürfte damit wohl hinreichend geklärt ein. Wie verhält es sich nun mit der Alkalibildung? Mit Ausnahme einer kurzen Bemerkung Boits, der die Proteine der Molke als Muttersubstanz des gebildeten Alkalis auffaßt, habe ich nirgends einen Erklärungsversuch für die durch den Typhusbacillus in der Lackmusmolke hervorgerufene alkalische Reaktion gefunden. Es erscheint mir daher zweckmäßig, mit einigen Worten auf den Vorgang der Alkalibildung im allgemeinen einzugehen. Während für die Säureproduktion in den meisten Fällen die Anwesenheit von Kohlenhydraten erforderlich ist, kommen für die Alkalibildung in erster Linie verschiedene Eiweißkörper in Betracht, ferner noch unter anderem Harnstoff, Asparagin und die Alkalisalze organischer Säuren. Natürlich können sich auch beide Prozesse nebeneinander abwickeln, so daß die Endreaktion nur das Überwiegen der gebildeten Säure bzw. Alkalimenge anzeigt. Bedingung für das Zustandekommen der Alkalibildung ist der Zutritt von Sauerstoff, worauf zuerst im Jahre 1894 Hellin (63), darauf 1 Jahr später auch Th. Smith (64) hingewiesen hat.

Der Typhusbacillus könnte also in der Lackmusmolke Alkali bilden, wenn für ihn die drei Bedingungen, Möglichkeit des Wachstums, Anwesenheit geeigneten Nährmaterials und genügende Zufuhr

des Luftsauerstoffes gegeben sind. Was zunächst das Vorhandensein zersetzbarer Substanz anbelangt, so hat, wie bereits erwähnt, Boit die Proteine der Molke als Quelle des vom Typhus gebildeten Alkalis bezeichnet. Im gleichen Sinne schreibt ganz allgemein Kruse, daß für die Alkalibildung aus Milch oder Molke wohl ausschließlich der Zerfall des Milcheiweißes in Ammoniak und ähnliche Stoffe verantwortlich zu machen sei. Die Rolle, die den Eiweißsubstanzen für die Alkalibildung zweifellos zukommt, schwankt indes mit der Quantität ihres Vorhandenseins in der Molke, und es ist, da ein geringer Überschuß von Säure oder Alkali sofort eine nicht vollständige Ausfüllung des Eiweißes zur Folge hat, recht schwierig, eine in dieser Beziehung stets gleichwertige Molke herzustellen. Auch Petruschky (1) rechnet mit solchen Verschiedenheiten, wenn er in seiner Originalmitteilung davon spricht, daß größerer Eiweißgehalt der Molke stärkere Säuerung zur Folge habe.

Im allgemeinen wird man aber, wenn die Neutralisation vorschriftsmäßig ausgeführt ist, damit rechnen können, daß nur noch Spuren von Eiweiß in der Molke vorhanden sind. Es ist deshalb nicht sehr wahrscheinlich, daß es allein die Eiweißkörper sind, die als Quelle der Alkalibildung in Betracht kommen.

Von anderen Körpern könnte noch der Harnstoff in Frage kommen, der, wie ich mich experimentell überzeigte, vom Typhus zu Alkali zersetzt wird. Seine Menge beträgt aber in der Milch nur etwa 0.01 Prozent, ist also für die Alkalibildung in der Molke nicht von Bedeutung.

Wohl aber sind die Alkalisalze der Zitronensäure in der Milch in solcher Menge vorhanden, etwa 0.1 bis 0.15 Prozent, daß durch ihre Zersetzung die alkalische Reaktion der Lackmusmolke zustande kommen kann. Die Kenntnis über das Verhalten des Typhusbacillus zur Zitronensäure verdanken wir Maaßen (65). Dieser Autor untersuchte im Jahre 1896 eine Reihe von Bakterien auf ihre Fähigkeit hin, die Alkalisalze verschiedener organischer Säuren zu Alkalikarbonat zu oxydieren. Für den Typhusbacillus ergab sich dabei eine Umwandlung des zitronensauren Natriums in Alkalikarbonat bis zur Hälfte des verwendeten Salzes.

Hiernach besitzt also auch die mit einer gleichen Menge Wasser verdünnte Lackmusmolke allein in ihren zitronensauren Salzen eine ausgiebige Quelle für die Alkalibildung.

Zieht man schließlich noch die beim Kochen vom Milchzucker in geringer Menge abgespaltene Milchsäure in Betracht, deren Alkalisalz der Typhusbacillus gleichfalls, wie Maaßen zeigte, zu Karbonat zu oxydieren vermag, so dürfte damit die Zahl der hierfür geeigneten Stoffe in der Molke im wesentlichen erschöpft sein.

An Material für die Alkalibildung fehlt es dem Typhusbacillus also nicht. Wie erklärt sich nun das verschiedene Verhalten des Typhus- und des Paratyphus B-Bacillus in der Lackmusmolke? Der Umschlag der sauren in die alkalische Reaktion der Molke muß abhängig sein einmal von der vorhandenen Säuremenge, ferner von der Menge des produzierten Alkalis. Diese letztere wird parallel gehen der Intensität des Wachstums. Nun ist die Säurebildung beim Paratyphus B-Bacillus, wie sich durch Titration nach 24 Stunden leicht nachweisen läßt, eher größer als die des Typhusbacillus, es ist also anzunehmen, daß der Unterschied in dem Verhalten beider Bakterien auf der verschiedenen Stärke des Wachstums beruhe. Die in der ersten Petruschkyschen Veröffentlichung enthaltene Angabe, der Typhusbacillus lasse die Molke fast vollkommen klar, läßt schon darauf schließen, daß das Wachstum des Typhusbacillus in diesem Nährboden nicht sehr üppig ist. So berichtet auch Boit, daß es ihm des öfteren bei nicht sehr reichlicher Einsaat bereits nach mehrtägigem Aufenthalt des Röhrchens im Brütöfen nicht mehr gelungen sei, die Typhusbazillen aus der Molke zu züchten, weshalb er sich zu der Annahme gezwungen sah, daß sie infolge Mangels an Nährstoffen abgestorben seien.

Das Fehlen des Umschlages in der Lackmusmolke beim Typhusbacillus läßt sich also damit erklären, daß er in der Molke sich nicht genügend vermehrt. Wenn diese Anschauung richtig ist, müßten Typhusstämmen, die in der Molke ausreichend zu wachsen vermögen, auch den Umschlag in Blau herbeiführen.

Nun gibt es in der Tat, wie sich mir im Laufe meiner Untersuchungen zeigte, solche Stämme, die die Fähigkeit besitzen, in der Lackmusmolke ein ziemlich reichliches Wachstum zu entfalten, wie es in der nach einigen Tagen sich zeigenden deutlichen Trübung zutage tritt. Tatsächlich lassen diese Stämme denn auch etwa am 7. Tage die zunächst rötliche Farbe der Lackmusmolke in Blau umschlagen und zwar mit einer solchen Regelmäßigkeit, daß sie dadurch mit Sicherheit von der Mehrzahl der Typhusstämmen zu trennen sind. Die Häufigkeit ihres Vorkommens scheint nicht sehr groß zu sein, und ihre Abzweigung zu einer besonderen Gruppe halte ich, da sich auch agglutinatorisch keine Unterschiede feststellen ließen, nicht für berechtigt. Zwischen den Reaktionen beider Typhusarten gibt es ferner auch zahlreiche Übergänge, welche je nach der Nährfähigkeit der Molke bald häufiger, bald seltener auftreten werden. So konnte ich unter 100 geprüften Stämmen in einer Kahlbaumschen Molke nach 4wöchentlichem Aufenthalt im Brütöfen bei etwa einem Drittel der Kulturen den Umschlag feststellen, während bei einem anderen Kahlbaumschen Präparat nur in einem Fünftel

der Fälle unter denselben Bedingungen eine alkalische Endreaktion zu beobachten war.

Auf Grund dieser Tatsachen also halte ich die Resultate Altschülers, der bei 30 geprüften Typhusstämmen 5 mal Alkalibildung nach 3 Tagen sah, für durchaus im Bereiche des Möglichen liegend. Man braucht daher nicht, wie Boit es will, zur Erklärung der Altschülerschen Befunde an eine Verunreinigung der Kulturen zu denken, und auch bei den eigenen Versuchen von Boit braucht der von ihm in einigen Fällen beobachtete Umschlag nicht notwendig auf einer Verunreinigung zu beruhen.

Auch die von Kutscher und Meinicke gegebene Erklärung, nach der das Blauwerden der Molke auf der durch den langen Aufenthalt im Brütöfen hervorgerufenen Konzentration des Nährbodens beruhe, wird danach unnötig. Und wenn Kutscher und Meinicke an 200 untersuchten Typhusstämmen niemals eine alkalische Reaktion beobachten konnten, so beruht das wohl darauf, daß sie mit einer Molke gearbeitet haben, in welcher das Verhältnis der Alkaliquellen zum zersetzlichen Zucker, vielleicht vereint mit geringem Nährwert der Molke, die Herbeiführung einer alkalischen Endreaktion durch den Typhusbacillus nicht mehr ermöglichte. Nach denselben Gesichtspunkten sind endlich die Angaben der Lehrbücher zu berichtigen, sowohl bezüglich der Quantität der gebildeten Säure, als auch bezüglich der Einheitlichkeit der Endreaktion:

Einzelne Typhusstämmen sind imstande, die Reaktion der Molke nach anfänglicher verschieden starker Säuerung alkalisch zu machen, wenn die Molke nicht durch langes Kochen zuviel zersetzlichen Zucker enthält, und wenn ihre Nährstoffe die Möglichkeit ausreichenden Wachstums gewähren.

Die allgemein anerkannte Tatsache, daß der Paratyphus A und der Ruhrbacillus sich in der Lackmusmolke genau so verhalten wie der Typhusbacillus, läßt die Anwendung des dort zur Erklärung Gesagten auch auf diese Bazillen gerechtfertigt erscheinen. Auch sie finden eben im allgemeinen in der Molke nicht die Bedingungen zu stärkerer Vermehrung, die Kulturröhrchen bleiben infolgedessen gewöhnlich ebenso klar wie beim Typhus. Vier von mir untersuchte Paratyphus A-Stämme schlugen in einer Kahlbaumschen Lackmusmolke mit leichter Trübung nach 8 bis 14 Tagen um, während sie ein anderes Kahlbaumsches Präparat nach 14 Tagen noch klar und rot gelassen hatten. Zur Neutralisation waren erforderlich nach 48 Stunden das erstemal 0·3 prozentige, das zweitemal 0·5 prozentige Normallauge. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen gelangte ich bei vier untersuchten Ruhr- und sechs

Pseudoruhrstämmen mit Ausnahme eines der letzteren, welcher die Lackmusmolke von vornherein blau färbte.

Im Gegensatze zu dem Typhus-, Paratyphus A- und Ruhrbacillus bietet die Lackmusmolke dem Paratyphus B-Bacillus die Möglichkeit ziemlich üppigen Wachstums, wie es ja auch schon durch die nach kurzer Zeit sich einstellende ziemlich intensive Trübung in die Erscheinung tritt. Der Unterschied in der Vermehrung einer Typhus- und Paratyphus B-Kultur ist schon makroskopisch so ausgesprochen, daß sich dadurch ihr verschiedenes Verhalten bezüglich des Umschlagens zwanglos erklären läßt.

Auf Grund unserer Kenntnisse über die Ursachen der Säurebildung lassen sich auch die erheblichen Schwankungen der Zeit des Umschlagens in den Angaben der einzelnen Autoren erklären.

In erster Linie ist dafür verantwortlich zu machen die Benutzung ungleichen Molkenmaterials, und zwar wird der Umschlag des Paratyphus B-Bacillus um so später eintreten, je mehr von dem zersetzbaren Kohlenhydrat die Molke enthält, je stärker also die Säurebildung zu Anfang gewesen ist. Die Molke kann sogar infolge von unvorsichtiger Neutralisation bei der Herstellung so große Mengen dieses Kohlenhydrates enthalten, daß ein Umschlag des Paratyphus B-Bacillus überhaupt nicht mehr erfolgt. Auch durch den Gehalt der Molke an Eiweiß und organischen Salzen muß die Zeit des Umschlagens beeinflusst werden. Typisch für die Resultate bei Verwendung verschiedener Molken sind die Angaben Böhmcs, verglichen mit Bonhoffs Ergebnissen. Beide Autoren beobachteten, wie erwähnt, ein im ganzen sehr ähnliches Verhalten für die einzelnen zur Untersuchung gelangten Vertreter der Paratyphus B-Gruppe, ein Unterschied bestand nur hinsichtlich der zum Umschlagen erforderlichen Zeit, die sich bei allen Stämmen Bonhoffs über einige Tage mehr erstreckte.

Auch das Kahlbaumsche Präparat ist, wie ich bereits an anderer Stelle ausgeführt habe, Verschiedenheiten der Zusammensetzung unterworfen, die sich steigern lassen, wenn man die Molke verschieden lange kocht. Die Verzögerung des Umschlagens durch verlängertes Kochen zeigt sehr schön folgende Tabelle IV:

Tabelle IV.

L. M. Kahlbaum	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
gekocht $\frac{1}{2}$ Std.	rot	rötlich	violett	blau	blau	—
„ 1 „	„	rot	rötlich	violett	„	—
„ 2 „	„	„	rot	rötlich	violett	blau

Ein großer Teil der Differenzen in den Angaben der Autoren über den Zeitpunkt des Umschlagens beruht danach wahrscheinlich auf solchen Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der Molke.

Nun sind aber auch Differenzen in der Zeit des Umschlagens beobachtet bei demselben Untersucher und demselben Molkenmaterial. Diese sind wohl zu erklären durch die verschiedene Wachstumsenergie der Stämme. Daß diese sich auch künstlich beeinflussen läßt, lehren die Versuche von Lentz (66), welcher durch fortwährendes Überimpfen von Molke zu Molke bei einzelnen Stämmen eine Beschleunigung des Umschlagens von mehreren Wochen bis zu mehreren Tagen erzielen konnte. Ganz beweisend würden diese Versuche allerdings erst sein, wenn immer dieselbe Molke verwandt wäre, was nicht erwähnt wird.

Die Zeit des Umschlagens der einzelnen Stämme wird endlich beeinflußt durch verschiedene Versuchsbedingungen, und zwar wird der Umschlag um so eher eintreten, je mehr dem Sauerstoff der Luft die Zutrittsmöglichkeit zur Flüssigkeit gegeben ist. Eine wie wichtige Rolle für den Zeitpunkt des Eintretens der alkalischen Reaktion der Sauerstoff spielt, das haben für den Choleraerreger zuerst Hellins Versuche erwiesen. Hellin züchtete Choleravibrionen in Lackmusmolke zu je 10^{cem} in gewöhnlichen Reagenzgläsern. Dabei zeigte sich, daß nach 5- bis 8 tägigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37° auf der Oberfläche der Lackmusmolke sich ein blaues Häutchen gebildet hatte, während die darunter befindliche Flüssigkeit rot geblieben war. Dieser durch die verschiedene Reaktion hervorgerufene Farbenunterschied ließ sich verhindern, wenn die Züchtung im Buchnerschen Röhrchen (mit alkalischer Pyrogallussäure, also bei Sauerstoffabschluß) erfolgte. Die Lackmusmolke zeigte dann eine gleichmäßig rote Farbe. Das umgekehrte Resultat stellte sich ein, wenn die mit Choleravibrionen beimpfte Lackmusmolke in eine Petrischale ausgegossen wurde. Infolge der so vergrößerten Berührungsfläche der Molke mit der Luft zeigte sich bereits 5 Stunden nach der Einsaat eine violette Verfärbung des Nährbodens, welche nach 26 Stunden einer blauen Farbe gewichen war.

Auch für den Paratyphus B konnte ich ein ähnliches Verhalten feststellen, und zwar trat bei Einsaat der gleichen Menge der Umschlag in kleinen Kölbchen volle 24 Stunden früher ein, als in den gleichzeitig mitbesäten Reagenzgläsern zu 10^{cem} Inhalt.

Für die differentialdiagnostische Beurteilung der Lackmusmolke erscheint mir als das Wesentlichste die Feststellung der Tatsache, daß der Unterschied zwischen der Reaktion des Typhus, des Paratyphus A und der Ruhr einerseits und der des Paratyphus B andererseits rein quantitativ und in hohem Grade von der Beschaffenheit der Molke

abhängig ist. Wenn im Gegensatz hierzu einzelne Autoren von qualitativen Unterschieden innerhalb der Paratyphus B-Gruppe berichten, wenn z. B. wiederholt angegeben worden ist, der Mäusetyphus mache die Molke von vornherein blau, so ist man meines Erachtens gezwungen, anzunehmen, daß unter dem Namen Mäusetyphus verschiedenartige Kulturen geprüft worden sind.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem Schweinepestbacillus. Jedenfalls lassen sich Unterschiede, wie die bei Kolle und Hetsch angegebene dauernde Rotfärbung im Gegensatz zu dem raschen Umschlag bei andern Autoren, wohl kaum auf Rechnung der Molke setzen, da die Verschiedenheiten teilweise in dem Kahlbaumschen, relativ gleichmäßigen, Präparat beobachtet wurden. Ob es sich hier um verschiedene Arten desselben Bacillus handelt, etwa analog dem Paratyphus A- und B-Bacillus, deren Verhalten in der Molke ja diese Unterschiede etwa entsprechen würden, das müssen weitere Untersuchungen entscheiden. Der Aufklärung bedürften schließlich noch die Angaben von Hünemann bei dem von ihm isolierten Paratyphus B-Stamm und von van Ermenghem bezüglich des Bacterium enteritidis Gärtner, daß diese Stämme die Reaktion der Molke trotz lebhaften Wachstums unverändert gelassen hätten. Ob hier eine Verwechslung der Stämme vorgelegen hat, oder ob die Schuld an der Unzulänglichkeit der Lackmusmolke lag, wird sich schwerlich noch entscheiden lassen.

Der weitaus größte Teil der Widersprüche über die einzelnen Reaktionen in der Lackmusmolke läßt sich aber sicher erklären durch die verschiedenartige Zusammensetzung der verwendeten Molke, so daß eigentlich alle Autoren mit ihren Angaben Recht haben, da jeder mit seiner eigenen Molke arbeitete. Typisch hierfür ist es ja, daß vielfach die Möglichkeit eines andern Ausfalls der Reaktion direkt bestritten wird. Gerade angesichts der Bestimmtheit mancher dieser Äußerungen drängt sich aber noch eine Frage auf: Wenn wirklich, wie von mehreren Autoren berichtet wird, bezüglich des Mäusetyphusbacillus oder des Bacillus suipestifer einerseits und der übrigen Vertreter der Paratyphus B-Gruppe andererseits qualitative Unterschiede in der Molke beobachtet worden sind, warum schreiben dann dieselben Autoren an anderer Stelle derselben Arbeit, es gebe keine kulturellen Differenzen in der ganzen Gruppe? Es wäre doch ein sehr wichtiges Unterscheidungsmerkmal, das man angesichts der zahllosen Untersuchungen, die vergeblich nach differential-diagnostischen Merkmalen innerhalb der Paratyphus B-Gruppe gesucht haben, mit Freude begrüßen müßte, wenn tatsächlich „der“ Schweinepestbacillus im Gegensatz zum eigentlichen Paratyphus B die Molke dauernd rot ließe?

Zusammenfassend läßt sich über den Wert der Lackmusmolke sagen:

Der Vorzug der Lackmusmolke beruht darauf, daß sie uns positive Merkmale gibt zur Erkennung des *Bacterium coli* und seiner atypischen Varietäten, daß sie sicher und deutlich Typhus- und Ruhrbacillus von der Paratyphus B-Gruppe zu trennen erlaubt, endlich, daß sie die einzige Möglichkeit bietet, kulturell die Gruppe des *Bacillus faecalis alcaligenes* abzusondern und den Paratyphus A vom Paratyphus B zu unterscheiden.

Ihr Nachteil liegt in der Schwierigkeit ihrer Herstellung und der daraus sich ergebenden Ungleichheit ihrer Zusammensetzung. Die Verschiedenheiten derselben sind so groß, daß dadurch die Verwendbarkeit der Molke in Frage gestellt wird.

Versuche zur Herstellung einer künstlichen Lösung.

Die bisherigen Ausführungen bedeuteten einen Versuch, die Reaktionen, welche die Bakterien der Typhus-Coligruppe in der Lackmusmolke hervorrufen, zu erklären auf Grund der chemischen Zusammensetzung dieses Nährbodens. War die Erklärung richtig, so mußte es aussichtsvoll erscheinen, durch künstliche Zusammenfügung der als wesentlich gefundenen Bestandteile der Molke eine Nährflüssigkeit herzustellen, in welcher sich die gleichen Veränderungen durch die Typhus-Coligruppe erzeugen ließen, die aber zugleich den Hauptnachteil der natürlichen Molke, die Ungleichmäßigkeit der Zusammensetzung, auszuschalten geeignet war. Maßgebend mußte sein das Bestreben größtmöglicher Einfachheit der künstlichen Nährlösung und als Ziel die Eigenschaften einer guten Kahlbaumschen Lackmusmolke.

Als Säurequelle für das *Bacterium coli* konnte nur der Milchzucker in Betracht kommen. Ich habe ihn in einer dem Gehalte der Molke ungefähr entsprechenden Quantität von 2 Prozent verwandt, obwohl schon mit 0.2 Prozent durch ein typisches *Bacterium coli* nach derselben Zeit gleiche Säuerung erreicht wurde. Es gibt aber andere — atypische — Colistämme, bei denen in schwachen Milchzuckerlösungen die Säurebildung erst sehr spät — nach 8 bis 14 Tagen — einsetzt, während sie in 2prozentigen erheblich früher, wenn auch noch immer später als beim typischen *Bacterium coli*, beginnt. Eine noch konzentriertere Lösung zu nehmen, ist deswegen nicht ratsam, weil dadurch unter Umständen das Wachstum des Typhusbacillus zu sehr gehemmt werden könnte.

Sehr viel schwieriger war die Wahl des zweiten, durch den Typhusbacillus zersetzbaren Kohlenhydrates, das also in der künstlichen Lösung die in der Molke enthaltenen Spaltungsprodukte des Milchzuckers und

das präformierte Kohlenhydrat ersetzen sollte. Als letzteres ist, wie erwähnt, von Sebelien die Arabinose in der Milch angenommen worden. Ich habe dieses Kohlenhydrat versuchsweise in die Lösung eingeführt, es zeigte sich aber keine Spur einer Rotfärbung durch den Typhusbacillus. Der Paratyphus A erzeugte ein leichtes Rot, vielleicht etwas schwächer als in der Molke, während der Paratyphus B in der typischen Weise am 3. Tage umschlug, wenn die Menge der verwendeten Substanz 0.04 Prozent betrug. Dieselben Resultate ergaben sich bei der Benutzung von Rhamnose. Die Annahme der Arabinose in der Milch halte ich also nicht für begründet.

Ebensowenig läßt sich aber auch annehmen, daß nur Dextrose oder Lävulose als Spaltungsprodukte des Milchzuckers in der Molke auftreten. Denn wenn diese auch durch den Typhus-, Paratyphus- und Ruhrbacillus unter Säurebildung zersetzt werden, so fand sich doch unter unsern als Pseudoruhr bezeichneten Stämmen einer, der die Lackmusmolke von vornherein bläute, sich also hierin nicht von dem Bacillus faecalis alcaligenes unterscheiden ließ, gleichwohl aber in der künstlichen Lösung, wenn man ihr Traubenzucker zusetzte, deutliche Säurebildung zeigte. Lävulose zu spalten, war dieser Stamm nicht befähigt, die Annahme schien also berechtigt, daß man es mit diesem Körper als zweitem Kohlenhydrat in der Molke zu tun habe. Daß aber auch diese Annahme nicht richtig ist, geht aus den Untersuchungen von Klimenko hervor. Dieser Autor fand nämlich bei seinen Prüfungen einer Anzahl von Alkaligenesstämmen, daß zwei von ihnen die Lävulose unter Säurebildung zu zersetzen vermochten, während sie die Molke nicht röteten. Mehrere andere spalteten, wie der von mir beobachtete Pseudoruhrstamm, Dextrose, ohne die Molke zu säuern. Die einzige unter den von Klimenko seinen Nährlösungen zugefügten Substanzen, welche von allen Alkaligenesarten nicht zur Säurebildung verwandt wurde, war der Mannit. Dieser Körper kann aber für die Molke deswegen nicht in Frage kommen, weil der Krusesche Ruhrbacillus, der ja die Lackmusmolke rötet, ihn nicht anzugreifen vermag. Es ist also anscheinend nicht möglich, ein Kohlenhydrat zu finden, welches allen Bakterien gegenüber genau dasselbe Verhalten zeigt wie die entsprechende Substanz in der Molke.

Für die künstliche Lösung habe ich die Dextrose, die noch die beste Übereinstimmung mit den Verhältnissen der Molke zeigt, benützt. Es werden sich vielleicht für einige Alkaligenesstämmen, welche dieses Kohlenhydrat zu spalten vermögen, Differenzen mit der Molke ergeben. Für einen Nachteil der künstlichen Lösung halte ich das aber nicht; denn die Festlegung des Begriffes „Alkaligenes“ für die Stämme, welche aus dem Traubenzucker keine Säure bilden, halte ich für besser, als die

Beurteilung nach ihrem Verhalten gegenüber den unbekannten Kohlenhydraten eines in seiner Zusammensetzung stets schwankenden Nährbodens.

Die Menge der zuzusetzenden Dextrose mußte sehr genau ausprobiert werden: am günstigsten erwies sich ein Gehalt von 0.04 Prozent. Wurde dieser nach oben überschritten, so verzögerte sich der Umschlag des Paratyphus B und die produzierte Säuremenge näherte sich zu sehr der des Bacterium coli. Bei ihrer Verminderung trat eine unerwünscht rasche Blaufärbung durch manche Typhusstämmen ein.

Als unbedingt nötig erwies sich für den Nährboden ein geringer Gehalt an Dinatriumphosphat, einmal, weil die Phosphorsäure als Nährstoff offenbar nicht entbehrt werden kann, und ferner, weil die Farbenreaktion in der Molke mit auf der Anwesenheit dieses Salzes beruht. Denn der typische Übergang vom neutralen Farbenton zum Rot oder zum Blau durch alle Nuancen des Violetts hindurch kommt dadurch zustande, daß infolge der Säure- bzw. Alkalibildung das zweibasische Salz allmählich in einbasisches oder dreibasisches übergeführt wird. Auch hier war die genaue Feststellung der erforderlichen Menge von großer Wichtigkeit: am günstigsten erwies sich ein Gehalt von 0.05 Prozent.

Für den Stickstoffbedarf der Bakterien wurde 0.1 Prozent Ammoniumsulfat, welches durch seinen Schwefelgehalt sich als besonders günstig zeigte, verwendet.

Als Alkaliquelle hat sich nur das zitronensaure Natrium bewährt und zwar zur Erreichung des Umschlages in der gewünschten Zeit am besten in der Menge von 0.2 Prozent. Da ja aber auch in manchen Fällen der Typhus nach längerer Zeit noch eine alkalische Endreaktion durch Zersetzung des zitronensauren Natriums hervorrief, so erschien es natürlich sehr verlockend, zu prüfen, ob sich nicht in der Zersetzung von Alkalisalzen anderer organischer Säuren ein qualitativer Unterschied zwischen Typhus und Paratyphus finden ließe. In dieser Absicht habe ich folgende Substanzen einer Prüfung unterzogen:

Neutrales zitronensaures	Kalium
„	Calcium
„ weinsaures	Natrium
„	Kalium
„	Natrium-Ammonium
milchsaures	Natrium
„	Ammonium
„	Natrium-Magnesium
bernsteinsaures	Natrium
„	Ammonium

asparaginsaures Natrium
essigsaures Natrium
oxalsaures Natrium
ameisensaures Natrium
salpetrigsaures Natrium.

Bei allen diesen Stoffen zeigten sich ebenfalls nur quantitative Unterschiede zwischen Typhus und Paratyphus mit Ausnahme des Natriumsalzes der Oxalsäure, aus welchem von beiden kein Alkali gebildet wurde. Zur Differentialdiagnose eignete sich am vorteilhaftesten das Natrium citricum, da bei ihm die quantitativen Unterschiede am ausgesprochensten hervortraten.

Zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen habe ich der Lösung 0.5 Prozent NaCl zugefügt. Es läßt sich dann für das Bacterium coli und den Paratyphus B ein in jedem Falle mit der Lackmusmolke übereinstimmendes Wachstum erzielen, für den Typhus, Paratyphus A und die Ruhr aber nur dann, wenn man eine ganze Öse einimpfen kann. Hat man dagegen, wie es bei Anwesenheit nur vereinzelter Kolonien auf der Drigalskiplatte öfter der Fall ist, nur einen Bruchteil einer Normalöse zur Verfügung, so gibt es für die letzteren Bakterien eine Grenze, bei der die Lackmusmolke am nächsten Tage noch deutliche Rötung zeigt, während die künstliche eiweißfreie Lösung unverändert geblieben ist. Um auch unter diesen Bedingungen die Reaktion der Lackmusmolke gleichwertig zu machen, habe ich der Lösung noch 0.005 Prozent Pepton zugesetzt, wodurch in beiden Nährböden das Wachstum dieselbe Intensität erreicht.

Als Indikator benutzte ich Azolithmin und habe es, entgegen der von Proskauer und Capaldi geäußerten Ansicht der Lackmustinktur für absolut gleichwertig befunden. Dem Kahlbaumschen Präparat gab ich den Vorzug, weil dieses in geringerer Quantität die gleiche Intensität der Färbung und einen schöneren Ton erzeugte, als das Mercksche.

Auch die übrigen Chemikalien wurden chemisch rein von Kahlbaum bezogen, mit Ausnahme des Peptonum siccum von Witte, Rostock und des in der Soxhletschen Herstellung überall käuflichen reinen Milchezuckers.

Es könnte nun der Einwand erhoben werden, daß infolge des Milchezuckergehaltes der künstlichen Lösung sich beim Sterilisieren dieselben Abspaltungsprozesse störend bemerkbar machen müßten, welche die Ungleichheit der Lackmusmolke verschulden. In der Tat ließ sich denn auch das Umschlagen der Paratyphusstämmen deutlich beeinflussen, je nach der Zeit, welche die Lösung gekocht wurde, und zwar schlugen sie 1 bis 2 Tage später um, wenn statt einer halben eine ganze Stunde bei 100° im Dampf sterilisiert wurde. Der Unterschied gegen die Lackmus-

molke ist aber der, daß man es bei der künstlichen Lösung in der Hand hat, wie lange man sie kochen will, während das bei der Molke sich nie voraussagen läßt. Außerdem ist die künstliche Lösung mit Sicherheit annähernd neutral zu machen, während bei der Herstellung der natürlichen Molke eine genaue Neutralisation viel schwieriger ist. Je mehr sich aber die Lösung vom Neutralpunkte entfernt, desto stärker werden, wie wir gesehen haben, die Zersetzungsprozesse. Das Zweckmäßigste ist, die künstliche Lösung nicht länger als $\frac{1}{2}$ Stunde bei 100° zu sterilisieren, wodurch sichere Keimfreiheit erzielt wird, ohne daß merkliche Abspaltungsvorgänge am Milchzucker eingetreten sind. Die Farbe soll ein bläuliches Violett sein.

Die definitive Zusammensetzung der Lösung ist also folgende:

20	grm	Milchzucker
0.4	„	Traubenzucker
0.5	„	Dinatriumphosphat
1.0	„	Ammoniumsulfat
2.0	„	Natriumzitrat (3 basisch)
5.0	„	Kochsalz
0.05	„	Pepton. siccum Witte
0.25	„	Azolithmin Kahlbaum
1000	„	destilliertes Wasser.

In dieser Lösung läßt sich in allen wesentlichen Punkten derselbe Erfolg erzielen wie mit einer guten Kahlbaumschen Lackmusmolke.

Die differentialdiagnostische Entscheidung über das Verhalten einer fraglichen Kultur in der künstlichen Lösung muß nach folgenden Merkmalen getroffen werden:

Das typische *Bacterium coli* erzeugt nach etwa 5stündigem Aufenthalt im Brutofen bei 37° eine leichte Rötung, welche im Verlaufe der ersten 24 Stunden in ein helles gelbliches Rot übergeht. Titrimetrisch werden nach 48 Stunden durchschnittlich 15 Prozent Zehntelnormallauge zur Neutralisation verbraucht, die Röhrchen sind infolge lebhaften Wachstums intensiv getrübt, beim Schütteln entweichen kleine Gasbläschen.

Eine Ausnahme machen einzelne atypische Colistämme, die nach 24 Stunden gleichfalls unter starker Trübung nur ein leichtes Rot, entsprechend etwa 5 Prozent Zehntelnormallauge, zeigen. Am 2. Tage pflegt durch beginnende Alkalibildung der Farbenton zum Violett oder leichtem Blau zurückzugehen, um gewöhnlich am 3. und 4. Tage durch das helle Rot der Milchzuckerzersetzung abgelöst zu werden. Titrimetrisch sind dann im Durchschnitt 10 bis 12 Prozent Zehntelnormallauge zur Neutralisation erforderlich.

Der Typhusbacillus ruft nach 24 Stunden bei fast vollkommener Klarheit der Lösung eine leichte Säuerung durch Traubenzuckerzersetzung hervor, deren Intensität von ganz geringen Graden bis zu 5 Prozent Zehntelnormalsäure schwankt. Manchmal tritt nach etwa 8 bis 14 Tagen eine leicht alkalische Endreaktion ein. Regelmäßig schlagen um eine kleine Gruppe von Stämmen, anscheinend solchen, die schon lange im Laboratorium fortgezüchtet sind, aber frühestens nach Ablauf einer Woche. Bei frisch aus dem Körper isolierten Typhusstämmen wurde ein Umschlag innerhalb der ersten 14 Tage nicht beobachtet.

Dasselbe Verhalten wie der Typhusbacillus zeigt der Paratyphus A und der Ruhrbacillus.

Die Rötung durch die Vertreter der Paratyphus B- und Gärtnergruppe beginnt nach etwa 5 Stunden, erreicht entsprechend etwa 5 Prozent Zehntelnormallauge ihren Höhepunkt am ersten Tage nach der Impfung. Bei manchen Stämmen beginnt das Rot bereits am ersten Tage einen bläulichen Schimmer zu zeigen und ist am zweiten Tage durch ein regelrechtes Blau ersetzt. Eine Anzahl anderer Stämme, und zwar scheinen das diejenigen zu sein, welche die Tendenz zur Schleimbildung besitzen, erzeugt im allgemeinen am ersten Tage ein reineres Rot, dieses ist am zweiten Tage einem violetten Ton gewichen, und erst mit vollendetem dritten Tage in ein deutliches Blau verwandelt. Das gebildete Alkali erfordert zur Neutralisation etwa 3 Prozent Zehntelnormalsäure nach 4 Tagen. Bei allen Stämmen der Gruppe sind die Reagenzröhrchen schon nach 24 Stunden deutlich getrübt. Diese Trübung, welche etwa in der Mitte zwischen Typhus und Coli steht, halte ich, weil sie schon am ersten Tage eine sichere Unterscheidung zwischen Typhus, Paratyphus A, Ruhr einerseits und Paratyphus B andererseits ermöglicht, für das wichtigste differentialdiagnostische Merkmal der Paratyphus B-Gruppe. An der Oberfläche der Flüssigkeit wird manchmal eine Kahlhaut gebildet. Ein gleiches Verhalten wie die Paratyphus B- und die Gärtnerstämmen zeigen die Bazillen des Ratten- und Mäusetyphus, der Bacillus suipestifer und die Kälberruhrbazillen.

Der Bacillus faecalis alcaligenes wird charakterisiert durch das Fehlen jeder Säurebildung und durch eine mehr oder minder rasch sich einstellende Alkaliproduktion.

Bedingung für die Erzielung gleichmäßiger Resultate ist die Einimpfung einer nicht zu kleinen Menge aus einer 24stündigen Kultur in 10^{cem} Flüssigkeit und Züchtung bei 37°.

Ebensowenig wie durch irgend eine andere Kulturmethode läßt sich die Natur eines Bacteriums allein auf Grund seines Verhaltens in der beschriebenen Lösung erkennen. Natürlich kann und soll sie auch nicht

etwa die Untersuchung auf Gasbildung in der Traubenzuckeragarstichkultur verdrängen, aber als eine Ergänzung dieser Methode glaube ich sie empfehlen zu können. Durch die Gasbildung im Traubenzuckeragar oder deren Verbindung mit Fluoreszenz in Neutralrotagar wird die Grenze gezogen zwischen Alkaligenes, Ruhr, Typhus einerseits und Paratyphus A, Paratyphus B, Bacterium coli andererseits; eine gleichzeitig mit der beschriebenen Lösung unternommene Prüfung ist geeignet, Klarheit zu bringen über die einzelnen Vertreter dieser beiden Gruppen nach Abtrennung der Ruhr durch ihre absolute Unbeweglichkeit.

Die Lösung ist mit dem Preise von etwa 35 Pfennigen pro Liter bei weitem der billigste aller zur Typhusdiagnose verwandten Nährböden, ihre Zusammenfügung das Werk weniger Minuten.

Allen denen, welche mir durch Übersendung von Kulturen meine Arbeit erleichterten, danke ich verbindlichst. Die Anregung zu dieser Arbeit ging aus von meinem hochverehrten Lehrer, Hrn. Prof. Reichenbach, sie wurde stetig gefördert durch seine erfahrenen Ratschläge. Ich spreche ihm meinen herzlichsten Dank aus.

Literatur-Verzeichnis.

1. Petruschky, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1889. Bd. VI. S. 657 ff.
2. Heim, *Lehrbuch der Bakteriologie*. 3. Aufl.
3. Hübener, *Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen*. Jena 1910.
4. Proskauer u. Capaldi, *Diese Zeitschrift*. Bd. XXIII. S. 452.
5. Barsiekow, *Wiener klin. Rundschau*. 1901. Nr. 44.
6. Sternberg, zit. nach Kolle u. Wassermann. Bd. II. S. 351.
7. Neufeld, *Ebenda*. Bd. II.
8. Buchholz, *Diese Zeitschrift*. Bd. LVI. S. 220.
9. Lehmann-Neumann, *Bakteriolog. Diagnostik*.
10. A. Fischer, *Diese Zeitschrift*. 1899. Bd. XXXII. S. 407.
11. Kolle-Hetsch, *Experimentelle Pathologie*. 1911. 3. Aufl.
12. Pribřam, *Diese Zeitschrift*. Bd. LIV. S. 37.
13. Zupnik, *Ebenda*. Bd. LII. S. 513.
14. Boit, Einfache und sichere Identifizierung des Typhusbacillus. *Dissertation*. Jena 1905.
15. Altschüler, *Münchener med. Wochenschrift*. 1904. S. 864.
16. Derselbe, *Ebenda*. 1904. Nr. 20.
17. Kutscher, Kolle-Wassermann. I. Ergänzt.-Bd.
18. Weichardt, *Diese Zeitschrift*. 1901. Bd. XXXVI. S. 447.
19. Lentz, Kolle-Wassermann. Bd. II.
20. Derselbe, *Diese Zeitschrift*. Bd. XLI. S. 563.
21. Lehmann-Neumann, *Spez. bakteriolog. Diagnostik*. 5. Aufl.
22. Doerr, *Centralblatt f. Bakteriologie*. Orig. Bd. XXXIV. S. 385.
23. Kolle-Hetsch, *Die experim. Bakteriologie*. 3. Aufl.
24. Schottmüller, *Diese Zeitschrift*. 1901. Bd. XXXIX.
25. Brion u. Kayser, *Münchener med. Wochenschrift*. 1902. Nr. 15.
26. Bonhoff, *Archiv für Hygiene*. Bd. L.
27. v. Drigalski, Conradi, Jürgens, *Diese Zeitschrift*. Bd. XLII. S. 141.
28. Hünemann, *Ebenda*. Bd. XL. S. 522.
29. Krahnepuhl, *Münchener med. Wochenschrift*. 1905. Nr. 28.
30. Poggenpohl, *Diese Zeitschrift*. Bd. LVII. S. 276.
31. Kutscher, Kolle-Wassermann. I. Ergänzt.-Bd. Paratyphus.
32. Lentz, Kongreß für Mikrobiologie. — Zitiert nach Kutscher, Kolle-Wassermann. I. Ergänzt.-Bd. Paratyphus.

33. Kiskalt, *Praktikum der Bakteriologie*. Jena 1910.
 34. Tiberti, *Diese Zeitschrift*. Bd. LX. 41.
 35. B. Fischer, *Ebenda*. Bd. XXXIX. S. 447.
 36. van Ermengem, Kolle-Wassermann. Bd. III.
 37. Th. Smith, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1890. Bd. VIII. S. 389 ff.
 38. Joest, Kolle-Wassermann. Bd. III.
 39. Boeder, *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt*. 1899. Bd. XV.
 40. Koske, *Ebenda*. 1906. Bd. XXIV. S. 305.
 41. Loeffler, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1892. Bd. XI. Nr. 5.
 42. Bongert, Kolle-Wassermann. Bd. III.
 43. Jensen, *Ebenda*. Bd. III.
 44. Boehme, *Diese Zeitschrift*. Bd. LII. S. 100.
 45. Loeffler, *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VII. S. 625.
 46. Kreuder, *Ebenda*. 1905. Bd. XXXIX. S. 17.
 47. Kutscher u. Meinicke, *Diese Zeitschrift*. 1906.
 48. v. Drigalski, *Festschrift für Koch*. 1903.
 49. Trautmann, *Diese Zeitschrift*. 1903. Bd. XLV.
 50. Klimenko, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1907. Bd. XLIII. S. 755.
 51. Smith, *Ebenda*. Ref. Bd. XXVI. S. 95.
 52. Kruse, *Allgemeine Mikrobiologie*. Leipzig 1910.
 53. Lösenner, *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*. 1895. S. 207.
 54. Neufeld, Kolle-Wassermann. Bd. II.
 55. Ritthausen, *Journal für prakt. Chemie*. 1877. S. 329.
 56. Schmöger, *Bericht über die Tätigkeit des milchw. Instituts*. Proskau 1883 bis 1884. S. 22.
 57. Béchamp, *Chemikerzeitung*. 1891. S. 1126, 1319.
 58. v. Raumer u. Späth, *Zeitschr. f. angewandte Chemie*. 1896. S. 70.
 59. Scheibe, *Zeitschr. f. analyt. Chemie*. 1901. Bd. XL. S. 1.
 60. Leichmann, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1904. Bd. XII. Abt. II. S. 328.
 61. Sebelien, zit. nach Grimmer, *Chemie und Physiologie der Milch*.
 62. Durham, zit. nach Kolle-Wassermann. Bd. I. Gottschlich.
 63. Hellin, *Archiv für Hygiene*. Bd. XXI. S. 308.
 64. Th. Smith, *Centralblatt für Bakteriologie*. 1895. Bd. XVIII. Abt. I. S. 1.
 65. Maaßen, *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*. Bd. XII. S. 340.
 66. Lentz, *Kongreß für Mikrobiologie*. 1906. Nach Kolle-Wassermann. Ergänz.-Bd. I. Kutscher, Paratyphus.
 67. Hoppe-Seyler, *Berichte der deutschen chem. Gesellschaft*. 1871. 4. S. 346.
 68. Kiliani, *Ebenda*. 1882. XV. 1. S. 136.
 69. Beythien, Parcus, B. Tollens, Liebigs *Annalen*, 1889. S. 255.
-