



No. 8.

Donnerstag, den 22. Februar 1906.

32. Jahrgang.

Aus dem Hygienischen Institute der Universität
in Greifswald.

Der kulturelle Nachweis der Typhusbacillen in Faeces, Erde und Wasser mit Hilfe des Malachitgrüns

und die Verwendung von Malachitgrün-Nährböden zum
Nachweise und zur Differentialdiagnose der Typhus-
bacillen und verwandter Bakterienarten.

Von F. Loeffler.

In der Sitzung des Greifswalder Medizinischen Vereins vom 9. Mai 1903 habe ich mitgeteilt und demonstriert ein neues Verfahren zum kulturellen Nachweise der Typhusbacillen in Faeces, Erde und Wasser. Eine kurze Notiz hierüber ist erschienen in der Vereinsbeilage der No. 36 dieser Wochenschrift 1903, S. 286. In der Sitzung des Greifswalder Medizinischen Vereins vom 3. Dezember 1904 habe ich dann das Verfahren näher erläutert und zugleich auch die Verwendung von Malachitgrün-Nährböden zum Nachweise und zur differentiellen Diagnose der Typhusbacillen und verwandter Bakterienarten näher erörtert. Das Verfahren ist jetzt soweit ausgebaut, daß ich es für die praktische Verwendung brauchbar erachte. Aus diesem Grunde möchte ich nunmehr die Entwicklung des Verfahrens näher darlegen.

Seit dem Jahre 1888 habe ich in meinem Institute mit zahlreichen Assistenten, den Herren Dr. Holz, Dr. Gocht, Dr. Drewitz, Dr. Hofschläger, Dr. Deichsel, Dr. Miyairi, Dr. Dibbelt, Dr. Gehrke, Dr. Stickel, Totsuka und Dr. Zibell Methoden des für die Bekämpfung des Typhus so wichtigen Nachweises der Typhusbacillen aufzufinden mich bemüht. So leicht der kulturelle Nachweis der Typhusbacillen in den inneren Organen eines an Typhus Verstorbenen ist, so schwierig gestaltet er sich bekanntermaßen in dem Darminhalt und in den mit den Dejekten der Typhuskranken verunreinigten Medien in der Umgebung des Menschen, in dem Boden und dem Wasser. In den inneren Organen finden wir den Typhusbacillus meist rein, weil der menschliche Körper als elektiver Reinkultur-Apparat fungiert, in den Faeces dagegen, in den Medien der Umgebung vergesellschaftet mit allen möglichen Mikroorganismen, ganz besonders mit den ihm so ähnlichen Mikroorganismen der Coligruppe. Nur in den relativ seltenen Fällen, in welchen die Typhusbacillen in größerer Zahl in diesen Materialien enthalten sind, gelingt es mit Hilfe des gebräuchlichen Plattenverfahrens, sie aus dem Gemisch zu isolieren. In der Regel

aber versagt dieses, einmal, weil unter der Ueberzahl anderer, zum Teile sehr ähnlicher Kolonien, vereinzelt etwa aufgegangene Typhuskolonien nicht herauszufinden sind, und zweitens, weil die Entwicklung der Typhuskolonien durch die anderen, kräftiger wachsenden Organismen stark gehemmt und auch gänzlich unterdrückt wird. Zwei Möglichkeiten boten sich dar, um auch unter diesen schwierigen Verhältnissen zum Ziele zu gelangen: Entweder mußten Nährsubstrate gefunden werden, auf welchen die Typhusbacillen sich ebenso wie die andern konkomitierenden Organismen kräftig entwickelten, aber von den Kolonien aller andern Bakterien sich scharf unterscheidende, leicht erkennbare Kolonien bildeten, oder aber solche, auf welchen die konkomitierenden Mikroorganismen schlecht oder garnicht gediehen, die Typhusbacillen aber sehr kräftig sich entwickelten. Die besten Ergebnisse waren natürlich zu erwarten, wenn es gelang ein Substrat zu finden, welches beide Vorteile in sich vereinigte, die konkomitierenden Organismen am Wachstum verhinderte, die Typhusbacillen dagegen zu kräftiger, charakteristischer Entwicklung brachte. Die Ausschaltung der konkomitierenden Organismen war zunächst angestrebt worden.

Chantemesse und Widal hatten einen Karbolzusatz zur Nährgelatine empfohlen, Holz eine saure Kartoffelsaftgelatine mit einer Azidität, entsprechend 24–32 ccm Normalalkali, und einem weiteren Zusatz von 0,05 % Karbolsäure zu dieser Kartoffelgelatine. Uffelmann hatte durch Zusatz einer gewissen Menge Zitronensäure und außerdem durch einen weiteren Zusatz von Methylviolett im Verhältnis von 1:40 000, Kruse durch eine natursaurer oder aber mit 0,05–0,1 % Karbolsäure, bzw. Salzsäure versetzte Nährgelatine das gleiche Ergebnis zu erzielen gesucht. Am besten hat sich bewährt die Holz'sche Kartoffelgelatine unter gleichzeitigem Zusatz von 0,05 % Karbol. Der später von Elsner als besonders wertvoll angegebene Zusatz von 1 % Jodkalium zu dieser Gelatine hat sich als eine wesentliche Verbesserung der Holz'schen Gelatine nicht erwiesen. Durch diese verschiedenen, im wesentlichen auf der Wachstumsfähigkeit der Typhusbacillen in ziemlich stark sauren Nährsubstraten basierenden Gelatinen gelang es zwar, sehr zahlreiche konkomitierende Bakterien am Wachstum zu verhindern, nicht aber gelang es, die regelmäßigen Begleiter der Typhusbacillen in den äußeren Medien, die der Darmflora entstammenden und geradezu als typisch für diese anzusehenden Colibakterien, auszuschalten. Im Gegenteil, gerade diese Bakterien wuchsen auf allen den genannten Gelatinen schneller und üppiger als die Typhusbacillen. Der Untersucher war deshalb immer vor die Aufgabe gestellt, die Typhuskolonien aus der meist in gewaltiger Ueberzahl vorhandenen Schar der Colikolonien herauszufinden und zu identifizieren. Dieses ge-

lang wohl bei einiger Sorgfalt, da die Kolonien der Typhusbacillen klein und hell blieben und sich dadurch von den größeren und dunkleren Colibakterien unterschieden. Die Hauptschwierigkeit lag aber darin, daß die Kolonien der Typhusbacillen stets langsamer sich entwickelten als die der Colibakterien, und deshalb von Colikolonien, deren Entwicklung sich etwas verzögert hatte, kaum zu unterscheiden waren.

Es bedurfte mithin stets langwieriger und häufig vollkommen vergeblicher Untersuchungen zahlreicher, verdächtiger Kolonien, um die echten Typhuskolonien herauszufinden. Ueberaus wertvoll mußte es deshalb sein, ein Nährsubstrat zu finden, auf welchem die Typhuskolonien ein von dem der Colikolonien sehr auffallend verschiedenes Aussehen zeigten. In meiner Arbeit: „Das Wasser und die Mikroorganismen“, im Handbuch der Hygiene, herausgegeben von Th. Weyl, Bd. I, 2. Abt., S. 649 habe ich bei Besprechung der Holzschens Kartoffelgelatine darauf hingewiesen, daß es solche Substrate gäbe. „Das Ideal eines Nährsubstrates“, schrieb ich damals, „hat sie (die Holzschens Kartoffelgelatine) jedenfalls noch nicht erreicht, weil sie die Entwicklung des Typhusbacillus ohne Zweifel stark behindert. Solche Gelatine, in welchen der Typhusbacillus üppig und zugleich in deutlicher Weise verschieden von dem *Bacterium coli* wächst, werden sich aber herstellen lassen. Im hygienischen Institut in Greifswald wurde zufällig einmal eine gewöhnliche, schwach alkalische Nährgelatine gefunden, in welcher die Typhusbacillen auf das Ueppigste gediehen und zugleich ganz konstant eigentümliche, sofort in die Augen fallende Kolonien bildeten. Während sonst in der Nährgelatine die Typhuskolonien rund und glattrandig sind, zeigten in dieser Gelatine die Kolonien der verschiedensten Typhusstämme in ganz gleichmäßiger Weise nach allen Seiten hin ausstrahlende Fortsätze von ungleicher Länge, sodaß sie unter allen andern Bakterienkolonien sofort erkannt werden konnten.“

Die damals von Dr. Gocht angestellten Versuche, die Ursache dieser eigentümlichen und in der vorhandenen Gelatineprobe ganz konstanten Wachstumsweise aufzufinden, sind nicht von Erfolg gekrönt gewesen. Später hat Piorkowski seine aus alkalischem Harn, $\frac{1}{2}\%$ Pepton und 3,3% Gelatine hergestellte Harngelatine bekannt gegeben, in welcher die Typhusbacillen das damals von uns beobachtete, charakteristische Wachstum zeigten. Als eigentliche Ursache der Bildung dieser auffallenden Kolonien hat dann später Werner Rosenthal und nach ihm ganz besonders Joh. Klie eine gewisse weiche Konsistenz der Nährgelatine erkannt. In wenige (2,5–3,3) Prozente Gelatine enthaltender Nährgelatine bilden die Typhusbacillen bei niedriger Temperatur, bei 18–21 Grad, in höher prozentiger (5–10%) bei entsprechend höherer Temperatur solche charakteristischen, an die Gestalt von Knochenkörperschen oder auch von Milben erinnernden Kolonien. Auch andere Mikroorganismen bilden unter solchen Gelatine- und Temperaturbedingungen Kolonien mit Ausläufern, lassen sich aber, wenn man sich mit dem Studium dieser Kolonien vertraut gemacht hat, sehr wohl von den Typhuskolonien unterscheiden. Eine ausgedehntere praktische Verwendung hat diese auffallende Wachstumsweise des Typhusbacillus bisher nicht gefunden, besonders wohl deshalb nicht, weil inzwischen ein anderer Weg beschritten worden war, um charakteristische, von Colikolonien leicht zu unterscheidende Kolonien der Typhusbacillen zu erzielen. Wurtz empfahl mit Laktose versetzte und durch Lackmus blau gefärbte Nährböden zu diesem Zweck. Da die Colibakterien den Milchzucker unter Säurebildung vergären, die Typhusbakterien aber nicht, so werden die Kolonien der ersteren rot, die der letzteren aber haben einen bläulichen Ton und sind deshalb leicht von jenen zu unterscheiden. Weiter ausgebaut und vervollkommen wurden diese Methoden im Kochschen Institut von v. Drigalski und Conradi, die zur Erzielung zuverlässiger Unterschiede ein für das Wachstum der Typhusbacillen optimales Pepton-Nutrose-Milchzucker-Lackmus-Agar herstellten, dem sie dann noch Kristallviolett hinzugaben in der Menge von 1:100 000 (1% einer 0,1%igen Lösung, also 2,5mal weniger als Uffelmann genommen hatte), um durch diese Substanz die Entwicklung zahlreicher anderer Organismen auf dem Agar zu verhindern. Dieses Nähragar ist in zahlreichen Fällen der Praxis zum Nachweis der Typhusbacillen mit gutem Erfolge angewendet worden. Die Typhusbacillen gedeihen, wie bekannt, auf diesem Agar ebenso gut wie die Colibakterien und sind durch die Farbe ihrer Kolonien leicht erkennbar. Aber es gibt außerdem noch eine ganze Reihe von anderen Bakterien, die ebenso wie die Typhusbacillen blaue Kolonien bilden. Da nun die in der Menge fast immer bei weitem überwiegenden Colibakterien sehr üppig wachsen, so ist die Zahl der aus einem aliquoten Teile eines verdächtigen, bakterienreichen Materials sich entwickelnden Kolonien stets eine sehr große. Nur wenn die einzelnen Kolonien genügend isoliert voneinander liegen, kommt das charakteristische Wachstum der Alkalibildner zustande, und dann erst kann die nähere differential-diagnostische

Prüfung der blau gewachsenen Kolonien erfolgen. Es bedurfte deshalb, um stets richtig bewachsene Platten für die Untersuchung zur Verfügung zu haben, einer entsprechenden Verdünnung der auszusäenden Materialien. v. Drigalski und Conradi besäten daher mit demselben rechtwinklig gebogenen Glasstabe, der in die verdächtigen Faeces eingetaucht war, hintereinander eine Reihe von Platten, sodaß sie auf der zweiten, dritten oder auch auf der vierten Platte die in geeigneter Entfernung voneinander liegenden Kolonien erzielten. Bei diesem Verfahren erhält man aber wie bei allen Verdünnungsverfahren zuletzt nur Kolonien der Bakterienart, welche in der Uebersatz vorhanden war. Wenn also nur wenige Keime einer Bakterienart mit sehr zahlreichen Keimen anderer Bakterienarten vergesellschaftet sind, so wird man die in der Minderzahl vorhandenen Keime in den stärkeren Verdünnungen, auf den zuletzt besäten, schön isolierte Kolonien darbietenden Platten nicht mehr antreffen, oder mit anderen Worten: Der Nachweis bestimmter Keime wird nach diesem Verfahren nur dann gelingen, wenn diese in dem zu untersuchenden Material von vornherein in relativ größerer Zahl vorhanden sind. Ist aber die nachzuweisende Art nur in wenigen oder gar in vereinzelter Exemplaren in dem ursprünglichen, bakterienreichen Material vorhanden, so wird es lediglich von einem glücklichen Zufall abhängen, ob man auf den für die Untersuchung brauchbaren Platten unter den isolierten Kolonien eine Kolonie der gewünschten Art vorfinden wird oder nicht. Die Grenze für die Brauchbarkeit des Verfahrens ergibt sich damit von selbst. Die Aussaat geschieht auf die Oberfläche des Nähragaragars. Mehr als 600 Kolonien können auf einer Platte, auch von größeren Dimensionen, gut voneinander isoliert, kaum wachsen. Das Verfahren ist daher nur brauchbar für solche Fälle, in welchen mindestens ein entwicklungsfähiger Typhuskeim auf etwa 600 andere, auf dem Agar sich entwickelnde Keime kommt. Als das Ideal eines Verfahrens zum Nachweise von Typhusbacillen in Bakteriengemischen konnte daher auch das Verfahren von v. Drigalski und Conradi keineswegs angesehen werden. Gegen alle Methoden, die allein auf einem verschiedenen Aussehen der Kolonien der Typhusbacillen von denen der *Bacterium coli*-Gruppe und der diesen verwandten Bakterien beruhen, — und deren sind, abgesehen von dem von v. Drigalski und Conradi angegebenen Nährboden, noch eine ganze Anzahl anderer, so besonders auch von Endo, angegeben worden — mußte der gleiche Einwand erhoben werden.

Einen wesentlichen Fortschritt mußte es daher bedeuten, wenn es gelang, die Hauptkonkurrenten der Typhusbacillen, die gewöhnlichen Colibakterien, am Wachstum zu verhindern, ohne jene selbst zu schädigen. Dieses Ziel haben auch seit den von Holz in meinem Institute ausgeführten Untersuchungen zahllose weitere Untersuchungen stets im Auge gehabt. Alle diese Bestrebungen waren jedoch vergeblich gewesen. Wenn eine dem Nährsubstrat zugesetzte Substanz die Colibakterien in ihrer Entwicklung verhinderte, so schädigte sie die Typhusbacillen erst recht. Es schien so, als ob es eine nur die Colibakterien, nicht aber die Typhusbacillen schädigende Substanz nicht gäbe. Bei dem Studium von Holz über Zusätze von Farbstoffen zu den Nährsubstraten hatten sich unter Umständen lebhaft gefärbte Kolonien gebildet. Ich hatte deshalb von mehreren meiner Schüler zahlreiche verschiedenartige Farbstoffe prüfen lassen, um eventuell für die Differentialdiagnose der Typhusbakterien verwertbare biologische Farbreaktionen zu erhalten. Bei den bezüglichen, von Deichsel ausgeführten Versuchen kam auch ein von den Höchster Farwerken bezogenes Malachitgrün zur Verwendung. Bei einem Zusatz gewisser Mengen dieses Malachitgrüns zu einer bestimmten Nährbouillon zeigte es sich, daß von einer bestimmten Konzentration des Grüns an die Röhrchen, die mit aus Faeces gewonnenen Colibakterien besät waren, vollkommen klar blieben, während die gleichen, mit Typhusbacillen besäten Röhrchen sich trübten und eine kräftige Kultur der Typhusbacillen darboten.

Es war somit in dem Malachitgrün die bis dahin vergebens gesuchte Substanz gefunden, die, in bestimmter Menge dem Nährboden zugesetzt, Colibakterien an der Entwicklung verhinderte, Typhusbacillen aber nicht. Es fragte sich nun weiterhin, ob es möglich sein würde, diese Substanz für den Nachweis der Typhusbacillen zunächst in Faeces mit Erfolg zu verwenden. Die eingehenden, von mir mit Dr. Miyairi unternommenen diesbezüglichen Untersuchungen erstreckten sich nach zwei Richtungen hin: einmal war die Verwendbarkeit des Malachitgrüns im Plattenverfahren und zweitens in flüssigen Medien zu prüfen. Als bestes Nährsubstrat wurde zunächst ein nach der Vorschrift von v. Drigalski und Conradi her-

gestelltes Nähragar verwendet, auf welchem ja Coli- und Typhusbakterien gleichmäßig üppig gedeihen. Statt mit Lackmuspflösung und Kristallviolett wurde dieses Agar mit verschiedenen Mengen von Malachitgrün versetzt, in Schalen ausgegossen und mit Typhusbakterien, Colibakterien und einem Gemisch von Typhus- und Colibakterien besät. Von einer 2%igen Lösung des Malachitgrüns wurden zu je 100 ccm des Agars steigende Mengen von 1—7,5 ccm hinzugegeben. Von einem Zusatz von 2,5 ccm an wuchsen die Colibakterien nicht mehr, die Typhusbakterien dagegen ungehindert. Bei höheren Zusätzen wuchsen die Typhusbakterien zwar auch noch, aber die Zahl der Kolonien wurde geringer. Bei 7,5 ccm Zusatz war die Behinderung bereits eine so starke, daß nur vereinzelte Kolonien aufgingen. Die aufgesehenen Kolonien wuchsen dann aber noch sehr kräftig und erreichten bald einen Durchmesser von 5—8 mm. Mit der Verminderung in der Zahl der Kolonien ging Hand in Hand eine Verzögerung des Wachstums. Während bei 2,5 ccm Zusatz bereits nach 14—16 Stunden deutliche Kolonien zu erkennen waren, zeigten sich bei 5 ccm Zusatz die Kolonien erst nach 24—36 Stunden, bei 7,5 ccm Zusatz sogar erst nach 48 Stunden. Die höheren Zusätze hatten mithin einen unzweifelhaft schädigenden Einfluß auch auf Typhusbakterien. Es mußte daher der Zusatz möglichst niedrig gewählt werden, sodaß die Colibakterien gerade mit Sicherheit unterdrückt, die Typhusbakterien aber nicht geschädigt wurden. Als der geeignete Zusatz wurde ein solcher von 2,5 ccm der 2%igen Grünlösung zu 100 ccm des Nähragars erkannt, d. h. ein solcher von 1 Teil Malachitgrün zu 2000 Teilen Nähragar. Bei Aussaat einer Mischung von Coli- und Typhusbakterien auf solche Grünplatten wuchs eine kräftige Reinkultur von Typhusbakterien. Damit war, wie es schien, die Grundlage für ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbakterien in Faeces gewonnen. Die auf den Grünplatten sich entwickelnden Typhuskolonien erschienen bei durchfallendem Lichte sehr durchsichtig. Sie boten, bei schwacher Vergrößerung untersucht, die charakteristische, besonders auf den Kartoffelgelatineplatten, stark hervortretende Furchenbildung dar. Außerdem aber zerstörten sie an der Stelle, wo sie wuchsen, die grüne Farbe, sodaß die Kolonien von einer Zone hellgelblichen Agars umgeben erschienen. Sie boten also eine ganze Anzahl sehr charakteristischer Merkmale dar, welche gestatten mußten, sie stets leicht zu identifizieren. Es wurden nun Fäkalien, Aufschwemmungen von Gartenerde und Wasser aus dem stark verunreinigten, bakterienreichen Greifswalder Stadtgraben mit Aufschwemmungen von Typhusbakterien versetzt, sodaß in einem Tropfen der Mischung nur eine geringe Anzahl von Typhuskeimen enthalten war, und davon 1—2 Tropfen auf Grünplatten ausgesät. Während aus den auf gewöhnlichem Nähragar und auf Drigalskiagar ausgesäten Proben unzählige Kolonien der verschiedensten Arten sich entwickelten, unter welchen Typhusbakterien nicht erkennbar waren, wuchsen auf den Grünplatten relativ wenige, ganz isolierte Kolonien, unter denen die Typhuskolonien ohne weiteres bereits makroskopisch zu erkennen waren. Aus den mit Typhusbakterien versetzten Aufschwemmungen von Gartenerde und normalen Faeces wuchsen auf dem Grünagar nur wenige fremde Kolonien, dagegen kamen aus dem stark verunreinigten Grabenwasser noch recht zahlreiche Kolonien anderer Bakterienarten zur Entwicklung. Ihre Zahl war doch noch eine so große, daß bei der Einsaat vereinzelter Bacillen in größere Mengen Wassers, z. B. von 50—100 Keimen pro Liter, der Nachweis auch mit Hilfe der Grünplatten nicht gelang, da nur ein, höchstens zwei Tropfen des Wassers pro Platte ausgesät werden konnten, wenn noch isolierte Kolonien erzielt werden sollten. Es hätte also einer großen Zahl von Platten bedurft, um auch nur eine Typhuskolonie zu erhalten; und diese unter den zahlreich gewachsenen fremden Kolonien herauszufinden, war einfach unmöglich. In diesem Falle versagte das Verfahren, weil die Zahl der fremden Kolonien, die auf einer das Wachstum der Typhusbacillen noch gestattenden Grünplatte wuchsen, eine zu große war.

Bevor ich auf die Ueberwindung der durch das Wachsen anderer Bakterien auf den Grünplatten bedingten Schwierigkeiten des Nachweises der Typhusbakterien näher eingehe, möchte ich zunächst über die das Grün selbst und die geeignete

Zusammensetzung der Nährböden betreffenden, eingehenden Ermittlungen etwas näher berichten.

Was zunächst das Grün anlangt, so wurden verschiedene, im Institut vorhandene Malachitgrün-Proben einer vergleichenden Prüfung mit dem Höchster Grün unterzogen. Es ergab sich, daß diese Malachitgrüne sich sehr verschieden verhielten. Eine Probe, welche sich durch ihre große Färbkraft schon ganz auffällig von dem Höchster Grün unterschied, war etwa 30mal so stark in ihrer Wirkung, d. h., es durfte nur der 30. Teil als Zusatz zu dem Agar verwendet werden, um ein annähernd gleiches Ergebnis zu erzielen wie mit dem Höchster Grün. Um nun ein stets gleichmäßiges Präparat empfehlen zu können, wandte ich mich an die Höchster Farbwerke mit der Bitte, mir nähere Angaben über das seinerzeit von ihnen bezogene Präparat zu machen. Nach Einsendung einer Probe teilten mir die Farbwerke mit, daß das Präparat ihre, mit einem gewissen Dextrinzusatz versehene, Marke „Malachitgrün 120“ sei und unter dieser Angabe jederzeit von ihnen bezogen werden könne. Eine vergleichende Prüfung des alten Präparates und einer Probe des übersandten Malachitgrüns 120 ergab, daß das Malachitgrün 120 etwas stärker wirkte als das alte Präparat, insofern, als ein Zusatz von 2,5 ccm einer 2%igen Lösung zu 100 ccm Agar die Entwicklung der Typhusbacillen bereits etwas behinderte, sodaß die Kolonien erst nach 24—30 Stunden die Größe hatten, welche sie bei Zusatz der gleichen Menge des alten Präparates schon nach 16—20 Stunden darboten, und daß ein Zusatz von 5 ccm des neuen Präparates eine erheblich geringere Zahl von Kolonien zur Entwicklung gelangen ließ als der gleiche Zusatz der alten Lösung.

Nachdem die Qualität des Grüns geklärt war, wurden die Zusammensetzung des Nähragars und der Einfluß der verschiedenen, für die Entwicklung der Typhusbacillen in den Grünährböden wichtigen Faktoren näher studiert.

Zunächst wurde ermittelt, daß eine saure Reaktion des Nähragars für das Grün nicht von Vorteil ist. Die charakteristische Entfärbung des Agars durch die Typhusbacillenkolonien wird dadurch verhindert. Die Entfärbung ist bedingt durch die Erzeugung eines alkalischen Stoffwechselproduktes. Durch Zusatz von Ammoniak kann man die Grünlösung entfärben. Ist der Nährboden sauer, so wird das von den Typhusbacillen gebildete Alkali durch die in dem Nährboden vorhandene Säure neutralisiert und die für die Diagnose willkommene Entfärbung beeinträchtigt. Weitere Versuchsreihen wurden angestellt, um zu ermitteln, ob die Art des zur Neutralisierung zu verwendenden Alkalis von wesentlicher Bedeutung war. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß im allgemeinen auf den Platten, deren Substrat mit Kalilauge für Phenolphthalein neutralisiert war, die Typhusbacillenkolonien etwas größer und vielleicht auch deutlicher gefurcht waren als auf den mit Soda neutralisierten. Indessen dürfte es doch wohl vorteilhafter sein, Soda zur Neutralisierung zu nehmen, weil schon ein geringer, etwa vorhandener Ueberschuß von Kali entwicklungshemmend wirkt, während ein Ueberschuß von Soda einen derartigen schädlichen Einfluß nicht erkennen läßt. Um die Herstellung des Agars möglichst einfach und konstant zu gestalten, wurde neben der Bouillon auch Fleischextrakt versucht. In allen Versuchen zeigte sich indessen die Bouillon der Fleischextraktlösung weit überlegen. Weiterhin wurde der Einfluß der Menge der stickstofffreien und der stickstoffhaltigen Komponenten des Nährbodens geprüft, des Milchsuckers, des Peptons und der Nutrose. Die Mengen des zugesetzten Milchsuckers wurden variiert von 0,1—5,0%. Ein wesentlicher Einfluß der Menge ließ sich nicht erkennen. Ebenso wurden Pepton und Nutrose variiert von 0,5—5,0%, zusammen und jeder Körper allein für sich. Die Peptonmenge zeigte sich hierbei von wesentlicher Bedeutung; je mehr Pepton zugesetzt wurde, um so kräftiger wuchsen die Typhusbacillen, aber zugleich wurde auch ihr Aussehen um so weniger charakteristisch. Sie entfärbten wohl das Nähragar, aber sie wurden dick und saftig. Zugleich war zu bemerken, daß die Zahl der fremden Kolonien mit dem Peptongehalte des Nähragars zunahm. Es war mithin der Gehalt an stickstoffhaltigem Pepton von Einfluß auf die Wirkung des Malachitgrüns. Stärkere Konzentrationen des ersteren schwächten die Wirkung ab. Als optimal wurde ein Gehalt von 1—2% Pepton ermittelt. Die Nutrose, in größerer Menge als 1% dem Agar zugesetzt, lieferte beim Kochen starke und voluminöse Niederschläge. Im übrigen wurde die gleiche Beobachtung gemacht wie bei den Peptonzusätzen. Die Zahl der auf den Grünplatten wachsenden Mikroorganismen stieg an mit der Zunahme des Nutrosegehalts. Es erschien deshalb nicht vorteilhaft, dem Agar mehr als 1% Nutrose zuzusetzen. Bei einem Gehalt des Agars von 0,75—1% Nutrose ohne gleichzeitigen Peptonzusatz wuchsen die Typhusbacillenkolonien auf dem, 2—2½ ccm einer 2%igen Grünlösung auf 100 ccm enthaltenden Agar in sehr charakteristischer Weise. Sie

waren ganz flach, glattrandig, in der Mitte ein wenig dicker als am Rande und sehr durchsichtig, wie Wassertröpfchen, sodaß sie sich von allen andern Kolonien leicht unterscheiden ließen.

Da die Herstellung des Agars von besonderer Wichtigkeit ist, so möchte ich sie etwas näher angeben.

In einem Liter Bouillon aus einem Pfund Fleisch (am besten Rindfleisch, aber auch Schweine- oder Pferdefleisch kann genommen werden) auf 2 Liter Wasser werden 3% = 30 Gramm Agar eingeweicht, dann wird 1‰ Salzsäure, entsprechend 7,5 ccm Normal-salzsäure, hinzugegeben und eine halbe Stunde gekocht. In der Salzsäurebouillon löst sich das Agar sehr schnell auf. Bei der gelegentlichen Herstellung von Äpfelagar hatte sich früher ergeben, daß das Agar sich außerordentlich schnell löste, aber nach längerem Sterilisieren seine Erstarrungsfähigkeit vollkommen eingebüßt hatte. Diese Beobachtung hatte dazu Anlaß gegeben, die Einwirkung zahlreicher Säuren, Apfelsäure, Essigsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Salzsäure auf das Agar näher zu studieren. Je größer der Säuregehalt, um so schneller löste sich das Agar, aber bei starker Konzentration der Säuren verlor es dann auch schnell seine Erstarrungsfähigkeit. Bei niedriger Konzentration der Säuren blieb sie indessen erhalten, wenn nach vollständiger Lösung die Säure sofort abgestumpft wurde. Als geeignetster Zusatz erwies sich ein solcher von 1 ccm der offiziellen, 25% HCl enthaltenden Salzsäure pro Liter 3%igen Agars. Der Zusatz geschah dann in der Form der Normalsalzsäure, weil nach der Lösung die Neutralisation der Säure schnell durch eine gleiche Menge Normalalkalis, in der Regel wurde Normal-Kaliumhydratlösung genommen, sich bewirken ließ. Das Salzsäurebouillonagar wurde nach halbstündigem Kochen, das zur vollständigen Lösung des Agars genügt, mit 7 ccm Normal-kalihydrat versetzt, alsdann wurde mit Natriumkarbonat für Lackmus neutralisiert und weiter ein Zusatz von 5 ccm Normalnatrium-karbonatlösung gemacht, um die Reaktion alkalisch zu machen und alsdann 1% Nutrose in der Form einer vorrätig gehaltenen 10%igen Lösung hinzugegeben. Nunmehr wurde nochmals aufgekocht und das Agar in halbe Literflaschen mit Patentverschluß eingefüllt. Seit einigen Jahren werden in meinem Institut sämtliche Nährsubstrate in solchen Flaschen mit abnehmbarem Patentverschluß von der Firma Carl Raupert in Magdeburg hergestellt. Die Flaschen und die Verschlüsse haben sich ganz ausgezeichnet bewährt. In diesen Flaschen wird das Agar an zwei aufeinander folgenden Tagen mehrere Stunden lang im Dampfstrom gekocht. Es bleibt dann in dem warmen Apparat stehen. In dem flüssigen, heißen Agar setzen sich die unlöslichen Bestandteile zu Boden. Von dem Bodensatz wird das ganz klare Agar abgossen, jede Filtration mithin vermieden. Zu 100 ccm des flüssigen Agars werden 2–2½ ccm einer 2%igen, mit sterilisiertem Wasser hergestellten, aber nicht gekochten Grünlösung hinzugesetzt und davon je 15–20 ccm in Petrische Schalen ausgegossen. Die Schalen bleiben offen, bis das Agar abgekühlt und erstarrt ist, dann werden sie besät, zugedeckt und umgekehrt, mit dem Deckel nach unten, in den Brütapparat gestellt.

Es wurden nun auch Versuche angestellt, Nährböden zu erzielen ohne Bouillon, da diese ja, wie bekannt, trotz gleicher Herstellungsweise eine je nach der Beschaffenheit des verwandten Fleisches verschiedene Zusammensetzung hat. Bei den Versuchen mit flüssigen Nährböden hatte sich ergeben, daß Typhusbacillen in dem aus Grundwasser gewonnenen Greifswalder Leitungswasser unter Zusatz von ½% Pepton ganz ausgezeichnet wuchsen. Es wurde deshalb ein Wasserleitungs-Peptonagar hergestellt. Auf diesem, ½% Pepton und 2 ccm einer 2%igen Grünlösung auf 100 ccm enthaltenden Agar wuchsen die Typhusbacillen ebenfalls sehr kräftig in Form von runden, durchscheinenden Kolonien, die aber keine charakteristische Furchenbildung darboten. Dieses Agar ist für viele andere Mikroorganismen kein geeigneter Nährboden. Ich kann daher für den Nachweis der Typhusbakterien in Bakteriengemischen die beiden angegebenen Agarsorten, das 1% Nutrose enthaltende Bouillon-Grünagar und das ½% Pepton enthaltende Wasser-Grünagar als besonders geeignet empfehlen.

Die Grenze für die Leistungsfähigkeit der Grünagarmethoden bei dem Nachweise der Typhusbakterien ist gegeben durch die Zahl der gleichzeitig auf diesem Agar wachsenden fremden Kolonien. Wenn unter 3–600 solcher Kolonien auch nur eine Typhuskolonie vorhanden ist, so kann man sie bei einiger Uebung herausfinden. Da nun, wie bereits betont, die Zahl dieser Keime in den typhusverdächtigen Materialien in der Regel keine sehr erhebliche ist, so kann man größere Mengen der Substrate aussäen als auf allen übrigen Nährböden und

hat deshalb sehr viel bessere Aussicht, auch wenige Typhuskeime darin zu finden.

Handelt es sich nun aber um Materialien, welche in großer Zahl die Keime enthalten, die auf dem Grünagar gedeihen, aber nur wenige Typhuskeime, wie z. B. sehr stark zersetzte Stuhlentleerungen von Typhuskranken oder hochgradig verunreinigte Schmutzwässer, dann werden die Chancen, spärliche Typhuskeime darin aufzufinden, sehr gering. Wie bekannt, gelingt es, die Cholerabakterien auch in solchen Fällen noch nachzuweisen dadurch, daß man die in geringer Zahl vorhandenen Cholerakeime zur starken Vermehrung bringt in einem Substrat, welches den konkultierenden Organismen ungleich weniger günstige Bedingungen für ihre Vermehrung darbietet. Es wurden deshalb überaus zahlreiche Versuche unternommen, die Typhusbacillen bei Gegenwart ihrer gefährlichsten Konkurrenten auf dem Grünagarnährboden zur Anreicherung zu bringen. Auf den Grünagar-Nährböden wachsen zwar sehr viele Organismen nicht; so wachsen nicht darauf die meisten Coccenarten, die Vibrionen und auch viele Mitglieder der großen natürlichen Familie, zu welcher die Colibakterien und die Typhusbakterien gehören. Außer den typischen Colibakterien entwickeln sich z. B. auch nicht die Ruhrbacillen. Aber es bleiben doch immer noch zahlreiche Arten von Bacillen übrig, welche sogar einen höheren Grünzusatz vertragen als die Typhusbakterien. Dahin gehören die Paratyphusbacillen. der Mäuse typhusbacillus, der Gärtnerische Bacillus und ganz allgemein alle die bei Fleischvergiftungen gefundenen Bacillen. Da diese Organismen jedoch regelmäßige oder häufige Begleiter der Typhusbacillen nicht sind, so kamen deren Kolonien als störend bei dem Typhusbakteriennachweise kaum in Betracht. Dagegen konzentrierte sich das Interesse hauptsächlich auf gewisse, in den normalen und namentlich in den zersetzten Faeces vorkommende Stäbchenarten, die auf dem Grünagarnährboden außerordentlich üppig gedeihen und teils saftige, schleimige, grünlich sich färbende, teils aber auch den Typhuskolonien ähnliche, gefurchte, den Nährboden entfärbende Kolonien bilden. Vor allem war es eine im hängenden Tropfen lebhaft bewegliche Stäbchenart, vermutlich der von den Autoren als *Bacillus faecalis alcaligenes* bezeichnete Organismus, der sich als der gefährlichste Konkurrent des Typhusbacillus in allen Nährböden, in Flüssigkeiten wie auch auf dem Agar, erwies. Bei Aussaaten von Gemischen dieser Bacillen und Typhusbacillen wurden die letzteren, auch wenn sie anfänglich in Uebersahl vorhanden waren, stets niedergewuchert, sodaß es nicht möglich war, sie aus der Mischkultur durch das Kulturverfahren auf Grünagarnährböden zu isolieren. Alle Versuche, diese für den Nachweis der Typhusbacillen so lästigen Organismen auszuschalten, waren vergeblich. So wurden Kaninchen mit diesen verschiedenen, auf den Grünplatten üppig wachsenden Bakterienarten vorbehandelt und auf diese Weise Sera gewonnen, welche die einzelnen Arten stark agglutinierten. Von diesen Seris wurden gewisse, für eine kräftige Agglutinierung ausreichende Mengen zu den zu untersuchenden Materialien hinzugesetzt. Nach gehöriger Durchmischung wurden sie dann einige Stunden bei 37° stehen gelassen, dann wurde zentrifugiert, und nur von den obersten Schichten das Material zur Aussaat auf den Grünplatten entnommen. Aber ein wesentlicher Vorteil wurde durch dieses Verfahren nicht erzielt, ebenso wenig auch durch das umgekehrte Verfahren, die Typhusbacillen durch Typhusserum zu agglutinieren, zu zentrifugieren und von dem Bodensatz auszusäen. Dieses letztere Verfahren ist von verschiedenen Seiten zum Nachweise der Typhusbacillen im Wasser empfohlen worden. In relativ reinen, keimarmen Wässern mag es mit Erfolg angewendet werden, in stark bakteriell verunreinigten Flüssigkeiten führt es nicht zum gewünschten Ziel; wenigstens gelang es im Greifswalder Stadtgrabenwasser nicht, vereinzelt zugesetzte Typhusbacillen mit Hilfe dieses Verfahrens nachzuweisen, und noch viel weniger gelang es, mit seiner Hilfe aus den Mischungen von Typhusbacillen und den oben genannten Bakterien die Typhusbacillen heraus zu bekommen. Alle Anreicherungsversuche in den auf die allerverschiedenartigste Weise, sowohl was den Gehalt an Nährsubstraten, Nutrose, Pepton, Zucker etc. als auch was die Reaktion anlangt,

zusammengesetzten Substraten führten zu keinem positiven Ergebnis.

Um nun zu sehen, wie sich überhaupt die Möglichkeit des Nachweises vereinzelter Typhusbacillen bei Anwendung eines Vorkulturverfahrens gestalten würde, wurden zahlreiche Versuche angestellt.

Ausgezeichnet wuchsen die Typhusbacillen in Wasser mit 2% Pepton- und 1% Nutrosezusatz. Es wurden deshalb zu 70 ccm sterilisierten Stadtgrabenwassers 20 ccm einer 10%igen Peptonlösung und 10 ccm einer 10%igen Nutroselösung hinzugesetzt und darauf eine Oese neunstündiger Typhusbouillonkultur hinzugegeben. Nach gründlicher Durchmischung dieser Aufschwemmung (A) wurde ein Tropfen, bzw. eine Oese davon zu 100 ccm der gleichen Flüssigkeit hinzugesetzt und von diesen beiden Flüssigkeiten (B 1 und B 2) sofort und nach 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 und 24 stündiger Bebrütung bei 37 Grad je ein Tropfen auf Nähragar ausgesät. Aus einem Tropfen der Aufschwemmung A wuchsen im Durchschnitt von vier Platten 68 Keime; mithin waren in die Flüssigkeit B 1 68 Keime und in die Flüssigkeit B 2, da eine Oese = etwa $\frac{1}{60}$ Tropfen, ein bis zwei Keime eingebracht worden. Aus einem Tropfen, d. h. dem 2000. Teil der Flüssigkeit B 1, wenn man 1 ccm = 20 Tropfen setzt, war nach vierstündiger Bebrütung noch nicht eine Kolonie gewachsen. Erst nach sechs Stunden waren überhaupt Kolonien in den Platten aufgegangen, und zwar

aus 1 Tropfen B 1	17
„ 1 „ B 2	2.
Nach 8 Stunden war die Zahl der Kolonien in B 1 auf	37
gewachsen, aus B 2 wuchs nur	1 Kolonie.
Nach 10 Stunden betrug die Zahl der Kolonien aus B 1	608,
„ B 2	20.
Nach 12 Stunden B 1	1283
„ B 2	58.
Nach 14 Stunden B 1	∞
„ B 2	211.
nach 16 Stunden in B 2	815,
nach 18 Stunden erst war die Zahl in B 2	∞ .

Der Versuch ergab mithin, daß man unter den günstigsten Verhältnissen bei Gegenwart von 10–700 Keimen pro Liter Wasser oder Aufschwemmung erst nach sechs bis achtstündiger Vorkultur ein Ergebnis wird erwarten dürfen. Bei Aussaat von einem Tropfen der Vorkultur pro Platte bei Gegenwart anderer Organismen werden natürlich die Chancen noch außerordentlich viel ungünstiger sein für die Auffindung der Typhusbacillen, weil diese andern Organismen sich auch und eventuell sogar stärker noch vermehren als die Typhusbakterien. Man wird daher eine überaus bakterienreiche Flüssigkeit schon nach zehnstündiger Vorkultur erhalten und dann nicht etwa davon einen Tropfen, sondern höchstens den Bruchteil einer Oese aussäen dürfen, weil andernfalls die Kolonien zu dicht liegen. Wenn optimal in einem Tropfen der Flüssigkeit

B 2 nach 10 Stunden	20
„ 12 „	58
„ 14 „	211
„ 16 „	815
Typhuskeime enthalten waren, so enthält dann die als Aussaatmaterial zulässige Menge von etwa $\frac{1}{10}$ Oese	
nach 10 Stunden	$\frac{2}{60}$.
„ 12 „	$\frac{1}{10}$.
„ 14 „	$\frac{2}{5}$.
„ 16 „	1,6

Typhuskeime, oder mit anderen Worten, man würde dann einen Typhuskeim erst erwarten können

nach 10 Stunden auf 25 Platten,	
„ 12 „ „ 10 „ „	
„ 14 „ „ 3 „ „	
„ 16 „ „ einer Platte.	

Demnach würden die Chancen für den Nachweis sehr ungünstig sein. Erst nach 18 stündiger Bebrütung, wenn die Vermehrung der Typhuskeime = ∞ geworden ist, würde eine einigermaßen genügende Wahrscheinlichkeit oder Möglichkeit gegeben sein, mit Hilfe der Vorkultur vereinzelter Typhuskeime nachzuweisen. Die ganze Frage spitzte sich mithin daraufhin zu: Wird es möglich sein, die Typhusbakterien in Bakteriengemischen 18 Stunden lang zur Vermehrung zu bringen und ihr Niedergewuchertwerden durch andere Organismen zu verhüten?

Ich muß an dieser Stelle davon Abstand nehmen, alle die Versuche mitzuteilen, welche ich in den letzten Jahren mit

den Herren Dr. Miyairi, Dr. Dibbelt und Dr. Zibell zur Lösung dieses Problems angestellt habe. Endlich ist es mir aber doch gelungen, das geeignete Substrat zu finden, und zwar in einer Rindfleisch-Bouillon-Pepton-Gelatine mit Zusatz gewisser Mengen von Phosphorsäure und von Malachitgrün 120. Die Herstellung dieser Gelatine geschieht in folgender Weise:

Vier Pfund reinen, gehackten Rindfleisches werden mit fünf Liter Leitungswasser in einem Kochtopf angesetzt; sofort werden dazu gegeben 15% = 750 g Gelatine, 1% = 50 g Peptonum siccum Witte und 0,5% = 5 g Kochsalz. Das Ganze wird langsam erwärmt bis zur vollständigen Lösung der Nährgelatine und alsdann drei Viertelstunden gekocht. Die heiße Masse wird mit kohlensaurem Natron für Lackmus neutralisiert, alsdann wird nochmals aufgekocht und filtriert. Man erhält dann stets eine klare, goldgelbe Nährgelatine. Zu je 100 ccm dieser Nährgelatine werden hinzugefügt 3 ccm einer doppelt normalen Phosphorsäure und 2 ccm einer 2%igen Malachit-Grünlösung.

Von dem zu untersuchenden Material, z. B. von einem Typhusstuhl, wird je ein Tropfen zu zwei Röhrchen mit je etwa 20 ccm dieser flüssig gemachten Nährgelatine hinzugesetzt. Nach gründlicher Durchmischung wird das eine Röhrchen zur Herstellung einer Plattenkultur verwendet, das zweite aber zur Vorkultur in den Brutschrank bei 37 Grad gestellt. Hat man Wasser auf Typhusbacillen zu untersuchen, so kann man auch größere Mengen davon, 10, 20, 50, 100 und mehr ccm, zur Vorkultur verwenden, indem man die gewählte Wassermenge mit der vier- bis fünffachen Menge Grün gelatine vermischt. Von den 12, 18 und 24 Stunden bebrüteten Vorkulturen wird je ein Tropfen in ein Röhrchen mit etwa 20 ccm der gleichen Grün gelatine ausgesät, und von diesen Röhrchen werden dann, je nach der Dauer der Bebrütung, drei, zwei oder ein Tropfen in neue Röhrchen mit etwa 20 ccm Grün gelatine übertragen. Der Inhalt der besäten Röhrchen wird in Schalen ausgegossen. Die Schalen kommen, nachdem die Gelatine gut fest geworden ist, in einen Brutapparat von 25 Grad Celsius. Nach 20–24 Stunden können die Platten untersucht werden. Die Typhusbacillenkolonien sind in den Grün gelatineplatten leicht aufzufinden. Sie erscheinen nach 24 Stunden als etwa stecknadelkopfgroße, wasserhelle, stark glänzende, hellgraue, gekörnte, rundliche, häufiger längliche Kolonien. Die Mehrzahl dieser Kolonien zeigt außerdem die so sehr charakteristischen Fortsätze, sodaß sie ein knochenkörperchen- oder milbenähnliches Aussehen darbieten. Nach 36–48 Stunden sind die Kolonien erheblich größer, ihr Farbenton ist ein graugelblicher. Die Fortsätze sind in der Regel sehr viel zahlreicher geworden. Sie erscheinen als feine, borstenartige, bisweilen auch spiralförmig gewundene Fädchen, sodaß die Typhuskolonien auf den ersten Blick von den Kolonien aller andern Bacillen unterschieden werden können. Sind in dem zu untersuchenden Material zahlreiche Typhuskeime vorhanden, so werden bereits in den ohne Vorkultur, d. h. in den direkt aus dem zu untersuchenden Material angelegten Grün gelatineplatten die charakteristischen Kolonien sich erkennen lassen. Ist ihre Zahl aber spärlich, so können sie natürlich erst in den aus der 12 und 18 Stunden bebrüteten Vorkultur besäten Platten erwartet werden. Auf den direkt aus der 12, 18 und 24 Stunden bebrüteten Vorkulturgelatine besäten ersten Platten liegen die Kolonien in der Regel so dicht, daß sie kaum zu zählen sind. Zwischen den zahllosen hellgrauen oder graubraunen Kolonien anderer Bakterienarten sieht man hier und da kleine, stark lichtbrechende, ovaläre Gebilde, bisweilen kurze Fortsätze tragend. Das sind die Typhuskolonien, von denen man natürlich Proben zur weiteren Untersuchung nicht entnehmen kann. In den angelegten Verdünnungsplatten dagegen, in denen meist nur wenige, zwei bis vier Kolonien pro Gesichtsfeld liegen, findet man mit Leichtigkeit die das geschilderte Aussehen darbietenden, isoliert liegenden Typhuskolonien heraus. Man kann sie mit einem von mir konstruierten Apparate¹⁾ unter der Kontrolle des Auges bequem abstechen. Das entnommene Material wird für die weitere Prüfung in die später zu beschreibende Grünlösung und auf Nähragaragar ohne Grün-

¹⁾ Der Apparat wird von der Firma Carl Zeiss in Jena hergestellt. Seine Beschreibung wird an anderer Stelle erfolgen.

zusatz ausgesät. Das prinzipielle Neue des Verfahrens liegt erstlich in der Anwendung der phosphorsauren Grüngelatine als Substrat für die Anreicherung und zweitens in der Anwendung der phosphorsauren Grüngelatine als Substrat für die Plattenkultur unter gleichzeitiger Innehaltung bestimmter Temperaturen.

Was zunächst die Anreicherung anlangt, so ist wesentlich die Anwendung einer Nährgelatine, und nicht einer rein wässerigen Nährflüssigkeit, mit Grün- und Phosphorsäurezusatz zur Vorkultur. Der Grünzusatz verhindert zahlreiche Organismen, darunter auch die gewöhnlichen Colibakterien in der Entwicklung. Der Phosphorsäurezusatz von 3 ccm einer doppelt normalen Phosphorsäurelösung auf 100 ccm Gelatine ist durch umfangreiche Versuchsreihen als der für das Wachstum der Typhusbacillen in dieser Gelatine optimale gefunden worden. Die durch den Grünzusatz nicht an der Entwicklung verhinderten Organismen, welche, wie vorher betont, in allen wässerigen Nährlösungen die Typhusbakterien überwuchern, vermögen dies in der gelatinehaltigen Flüssigkeit nicht zu tun, wie ebenfalls durch zahlreiche Versuche sicher gestellt ist. Vermutlich erschwert der Gelatinegehalt des Substrates die Diffusion der von jenen Organismen erzeugten, die Typhusbacillen schädigenden Stoffwechselprodukte. Die Anwendung der Nährgelatine für die Plattenkultur bietet dem entsprechenden Nähragar gegenüber große Vorteile. Die Kolonienbildung ist ja in den Gelatinenährböden viel mannigfaltiger und charakteristischer als in und auf den Agarnährböden. Farbe, Korn und Form der Kolonien liefern eine Fülle von wertvollen Unterscheidungsmerkmalen. Im Interesse der Schnelligkeit des Wachstums der meisten Organismen bei höheren Temperaturen sind in den letzten Jahren die Gelatinenährböden von den Agarnährböden ganz in den Hintergrund gedrängt worden, sehr mit Unrecht. Der leichte Nachweis der Cholerabakterien mit Hilfe der alkalischen Choleragelatine zeigt uns in ganz eklatanter Weise die enormen Vorteile einer zweckmäßig gestalteten Nährgelatine. In ganz ähnlicher Weise bietet die phosphorsaure Grüngelatine eine Handhabe zur leichten Auffindung der Typhuskolonien. 15 %ige Nährgelatine gestattet die Anwendung einer Temperatur von 25 Grad, bei welcher das Wachstum der Typhusbacillen schon fast ebenso schnell wie bei Brüttemperatur von statten geht. Die Anwendung dieser höheren Temperaturen wiederum bewirkt, daß die Typhuskolonien in der so erwünschten charakteristischen Weise strahlige Fortsätze bilden und in der so eigentümlichen Milbenform wachsen. Der Grünzusatz verhindert mit Sicherheit das Wachsen aller Colibakterien und zahlreicher anderer Organismen, sodaß eine reichlichere Menge des Untersuchungsmaterials in der Nährgelatine zur Aussaat gelangen kann, und die Verteilung dieses Materials durch die ganze Masse der Gelatine gestattet wiederum, größere Mengen davon auszusäen, als auf der Oberfläche von Agarplatten ausgesät werden können. Was die Fortsatzbildung der Typhuskolonien in der Grüngelatine anlangt, so möchte ich betonen, daß ich gleiche Bilder wie bei den Typhuskolonien bei keiner anderen Bakterienart bisher beobachtet habe. Es kommen wohl Kolonien anderer Bacillen vor, die Fortsätze bilden, aber das Herauswachsen von so feinen, zarten Fädchen wie bei den Typhuskolonien habe ich bei keiner anderen Bakterienart bisher beobachtet. Sehr schöne, charakteristische Kolonien der Typhusbakterien erhält man auch, wenn man weniger hochprozentige Gelatine, von 3,5 % etwa, mit Grünzusatz verwendet. Indessen scheint dies nach den bisherigen Erfahrungen nicht zweckmäßig zu sein, denn einmal beansprucht die Entwicklung der Kolonien, weil die Platten bei höchstens 20 bis 21° gehalten werden können, eine längere Zeit, und zweitens muß der Grünzusatz dann niedriger gewählt werden, weil schon bei Zusatz von 2 ccm einer 2 %igen Grünlösung zu 100 ccm Gelatine mehrfach eine vollkommene Entwicklungshemmung der Typhusbacillen beobachtet worden ist. Es scheint daher die Höhe des Gelatinegehaltes von nicht unwesentlichem Einfluß zu sein auf die Wirkung des Grüns. Von Wichtigkeit ist drittens die Abimpfung der verdächtigen Kolonien in eine Grünlösung, in der eine charakteristische Veränderung durch die Typhusbacillen hervorgerufen wird. Die Grünlösung,

auf deren Zusammensetzung wir gleich näher eingehen werden, ist natürlich nicht unbedingt notwendig. Die abgestochenen Kolonien kann man auch direkt auf gewöhnliches Nähragar aussäen, um schnell Material für die Agglutinationsprobe zu erhalten. Ich ziehe es aber vor, die Aussaat in die Grünlösung zu machen, da einerseits durch die charakteristische, auf den ersten Blick erkennbare Veränderung, welche diese durch die Typhusbakterien erfährt, der Typhusverdacht sehr erheblich verstärkt wird, andererseits aber durch das Auftreten einer andersartigen Veränderung der Grünlösung dieser Verdacht sofort ausgeschlossen wird. Deshalb ist es bequemer, erst aus der charakteristisch veränderten Grünlösung die Agarreinkulturen zur Gewinnung des nötigen Materials für die Agglutination anzulegen. Um Zeit zu sparen, empfiehlt es sich, von derselben verdächtigen Kolonie gleichzeitig ein Röhrchen mit Grünlösung und ein Röhrchen mit Nähragar zu besäen. Bei genauer Befolgung des angegebenen Verfahrens gelingt es, die Diagnose auf Typhus ebenso schnell wie die Diagnose auf Cholera zu stellen. In manchen Fällen, bei der Anwesenheit vereinzelter Typhuskeime in Materialien, die sehr zahlreiche Bakterienarten beherbergen, in Schmutzwässern und stark zersetzten Dejekten, führt eine einmalige Vorkultur bisweilen nicht zum Ziel. Es empfiehlt sich dann, nach 12- bis 18stündiger Bebrütung der ersten Vorkultur aus dieser noch eine zweite Vorkultur anzulegen. Indessen ist das Auffinden der Typhusbakterien dann immer recht schwierig, weil nach den bisherigen Erfahrungen eine die Nährgelatine verflüssigende Proteusart, die auch in schnörkeligen Kolonien wächst, das Auffinden etwaiger Typhuskolonien in den aus dieser zweiten Vorkultur angelegten Gelatineplatten erschwert. Diese Verhältnisse bedürfen noch eines weiteren, eingehenden experimentellen Studiums. Als einen großen Vorteil der neuen Methode möchte ich den Umstand erachten, daß die dazu erforderlichen Nährsubstrate leicht und schnell in beliebiger Menge in jedem Laboratorium hergestellt und vorrätig gehalten werden können.

Ich komme nunmehr zu dem Verhalten der Typhusbakterien in flüssigen Grünnährböden. Orientierende Versuche mit verschiedenen nährstoffhaltigen, mit Malachitgrün versetzten Flüssigkeiten hatten zum Teil recht eklatante Verschiedenheiten in dem Verhalten der Typhusbacillen und anderer Glieder derselben Familie enthüllt, sodaß ich es für angezeigt erachtete, in eine nähere Prüfung dieser Verhältnisse einzutreten. Diese Versuche habe ich mit Herrn Dr. Stickel ausgeführt. Die Versuche lehrten, daß es wesentlich war, ob Bouillon oder Wasser als Basis für die Lösung genommen wurde, ob Nutrose oder Pepton, beide kombiniert oder jedes allein für sich, ob gleichzeitig verschiedene Zuckerzusätze angewendet wurden oder nicht; ja, es ergab sich, daß das Verhalten der Organismen ein verschiedenes war, je nachdem, ob Leitungswasser oder destilliertes Wasser für die Lösung genommen wurde, und namentlich, ob die Reaktion sauer, neutral oder alkalisch war. Auch die Art des zur Neutralisierung verwendeten Alkalis erwies sich von Bedeutung, kurz es zeigte sich, daß die Mikroorganismen aus der Typhusfamilie auf die aller verschiedensten, kleinsten chemischen Aenderungen ihrer Nährsubstrate sehr verschieden reagierten. Besonders schön und deutlich traten aber Unterschiede zutage, wenn Malachitgrün in gewissen Mengen zu den Lösungen hinzugegeben wurde, insofern, als durch das Malachitgrün nicht nur manche dafür empfindliche Arten wie die Colibakterien unwirksam gemacht und ausgeschaltet werden konnten, sondern auch insofern, als sehr auffallende Verschiedenheiten in dem makroskopischen Aussehen der besäten Lösungen erkennbar wurden. Ich kann unmöglich die ganzen Versuchserien hier ausführlicher erörtern. Ich muß mich darauf beschränken, nur einige Lösungen, die sich als praktisch brauchbar erwiesen haben für die Differenzierung, etwas näher zu charakterisieren.

So wurde z. B. eine Stammlösung VIII derartig variiert, daß wir bei Verwendung des griechischen Buchstabenalphabetes zur Bezeichnung der verschiedenen Varianten bald zu einer VIII- η -Lösung gelangten. Diese Lösung, welche ich als Grünlösung 1 bezeichnen

möchte, enthält 2% Pepton und 1% Nutrose in 100 ccm destillierten Wassers und ist mit 1,06 ccm Normalkalilauge neutralisiert. Als dann erhält sie einen Zusatz von 5% Milhzucker und 1% Traubenzucker. Nach kurzem Aufkochen werden ihr, sobald sie bis auf Handwärme abgekühlt ist, 3 ccm einer 2%igen Grünlösung hinzugegeben.

Impft man nun in Röhrchen, die man mit 5—10 ccm dieser Lösung beschickt hat, Typhus- und zur Typhusfamilie gehörige Bakterien und stellt die so geimpften Röhrchen in den Brütapparat, so bemerkt man am folgenden Tage ganz eklatante Unterschiede. In den mit Typhus besäten Röhrchen ist die Nutrose in ganz eigenartiger Weise ausgefällt. Die Flüssigkeit ist in toto wie eine saure Milch geronnen, und darüber steht eine klare, grüne Flüssigkeit. Die Mehrzahl der mit typhusähnlichen Bakterien besäten Röhrchen dagegen, wie z. B. die mit den Coliarten, dem Gärtnerischen Bacillus, dem Paratyphus A und B, dem Mäusetyphusbacillus und den verschiedenen von Fleischvergiftungen herrührenden Bacillen beschickten, bietet folgenden Anblick: Sie zeigen sich in lebhafter Gärung begriffen; die Nutrose ist ausgefällt und klebt zum Teil in schmutziggrünen Streifen an der Wand des Glases, zum Teil ist sie durch die Gasentwicklung nach oben gerissen und schwimmt als schmutziggrüne Schicht auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Es beruht dieses verschiedene Verhalten der Typhusbacillen und Nichttyphusbacillen darauf, daß der Typhusbacillus weder Milch- noch Traubenzucker zu vergären imstande ist, während die Mehrzahl der Organismen wenigstens eine der beiden Zuckerarten vergärt, und daß ferner der Typhusbacillus außerdem eine die Nutrose zur Gerinnung bringende Substanz erzeugt. Nur einzelne, wenige unter den zahlreichen geprüften pathogenen und nichtpathogenen Organismen vergären diese Lösung nicht, so z. B. ein dem Typhusbacillus ähnlicher Bacillus, der aber auf Agar einen gelblichen Rasen bildet, ferner ein dem roten Kieler Bacillus wohl analoger, aus Stadtgrabenwasser gezüchteter Bacillus, außerdem aber noch der Pestbacillus und der Bacillus der Meisenpest von Gehrke. In dieser Grünlösung 1 vertragen die meisten Organismen einen sehr hohen Grünzusatz. Erst bei einem Zusatz von 8—8,5% der 2%igen Grünlösung scheiden die Colibakterien und zahlreiche typhusähnliche Wasserbakterien aus. Sie lassen die Lösung dann unverändert, während der Typhusbacillus bis zu einem 10%igen Grünzusatz die Lösung noch typisch koaguliert.

Die zweite Lösung, auf welche ich die Aufmerksamkeit lenken möchte, ist eine damals mit der Bezeichnung A 1 versehene Lösung, die ich weiterhin als Grünlösung 2 bezeichnen möchte. Sie unterscheidet sich von der Grünlösung 1 nur durch das Fehlen des Traubenzuckers. Sät man in die mit dieser Lösung beschickten Röhrchen alle die genannten Organismen ein, so treten sofort andere auffallende Unterschiede zutage. Nur die Colibakterien und einige diesen ganz nahe verwandte Organismen vermögen diese Lösung ebenso wie die Lösung 1 zu vergären. Man kann daher sofort die Coligruppe heraus erkennen. Eine große Gruppe von Bacillen, welcher die gesamten Fleischvergiftungsbacillen und auch der Mäusetyphusbacillus angehören, vergären die Lösung nicht. Sie reduzieren aber das Grün, sodaß die grüne Lösung allmählich blaßgelblich wird. Die Reduktion des Grüns geht bei etwas stärkerer alkalischer Reaktion schneller vor sich. Es empfiehlt sich deshalb, statt 1,06 ccm normaler Kalilauge 1,5 ccm dieser Lauge der Pepton-Nutroselösung zuzusetzen. Der Typhusbacillus verändert die Lösung fast garnicht, nur allmählich reduziert er das Grün etwas. Der Paratyphus A dagegen macht die Lösung schwach blau. Mit Hilfe der beiden Grünlösungen 1 und 2 kann man daher mit ziemlicher Sicherheit nachweisen, ob in einem gegebenen Falle Typhus, Paratyphus A oder ein Organismus aus der Fleischvergiftergruppe vorliegt.

Noch eine dritte Lösung ist von Interesse, die ich als Grünlösung 3 bezeichnen möchte. Sie enthält in 100 ccm destillierten Wassers 1% Nutrose, 2% Milhzucker und 5% einer 2%igen Grünlösung. Bringt man alle die genannten Organismen in diese Lösung, so wachsen fast alle darin, lassen sie aber ganz unverändert. Nur ein Organismus ver-

ändert sie ganz auffällig, das kleine, lebhaft bewegliche, typhusähnliche Stäbchen, welches die höchsten Grünzusätze verträgt und in Faeces wie in Schmutzwässern gefunden wird, der vermutliche *Bacillus faecalis alcaligenes*; er verwandelt das Grün der Lösung 3 in ein prächtiges Blau.

Endlich möchte ich noch eine vierte Lösung erwähnen. Diese Lösung 4 wird hergestellt aus Rindfleischbouillon, 1 Pfund auf 1 Liter, die mit Kaliumhydrat neutralisiert wird und einen Zusatz von 2% Pepton, 5% Milhzucker, 1% Traubenzucker, 0,5% Natriumsulfat, 2% Kaliumnitrat, 1% Kaliumnitrit und 3% der 2%igen Grünlösung erhält. In dieser Grünlösung 4 gärt keiner der eingebrachten Organismen, weil der Zusatz von Kaliumnitrat und Kaliumnitrit, wie eingehende Versuche ergeben haben, die Gärung verhindert. Alle genannten Organismen wachsen aber in der Lösung und bewirken eine starke, gleichmäßige Trübung derselben, mit Ausnahme des Paratyphus B und des Gärtnerischen Bacillus, die die Lösung klar lassen, aber einen starken Bodensatz bilden. Bei vielfachen Wiederholungen dieses Versuches hat sich stets dasselbe Ergebnis gezeigt. Der Mäusetyphusbacillus trübt wie alle anderen die Lösung, der Gärtnerische Bacillus und der Paratyphus B lassen sie klar, ein Beweis dafür, daß diese Organismen nicht identisch sind, wie man neuerdings unter Nichtbeachtung ihrer ganz verschiedenen pathogenen Dignität mit Unrecht angenommen hat.

Mit diesen Beispielen möchte ich mich begnügen. Sie lehren, wie man mit Hilfe von biologisch-chemischen Reaktionen anscheinend identische Organismen mit Leichtigkeit unterscheiden kann. Diese Lösungen haben auch ihren Wert für die Differentialdiagnose ebenso gut wie die Agglutinationsprüfungen mit spezifischem Serum; enthüllen sie doch wichtige biologische Eigentümlichkeiten der betreffenden Organismen. Daß sie für die Diagnostik von großem Wert sein können, möge ein Beispiel beweisen.

Vor einiger Zeit kamen eine Anzahl von Erkrankungen in der hiesigen Garnison vor, welche von Herrn Stabsarzt Prof. Dr. Uhlenhuth als Fleischvergiftungen gedeutet werden mußten. Von den diarrhoischen Entleerungen wurde auf Grünagarplatten ausgesät. Es wuchsen eine Anzahl von Kolonien auf ihnen. Davon wurden Proben in die Grünlösungen geimpft. Am nächsten Tage bereits war es sicher, daß diese Bacillen zur Gruppe der Fleischvergifter gehörten, da sie in der Grünlösung 1 Gärung und Fällung bewirkten, die Grünlösung 2 aber entfärbten. Herr Prof. Uhlenhuth hat die Fälle eingehend untersucht und ist dann mit Hilfe von Serumreaktionen zu dem gleichen Ergebnis gelangt. Die Reaktion auf spezifisches Serum wird natürlich für die endgültige Identifizierung immer ausschlaggebend sein. Herr Prof. Uhlenhuth, der eingehende, vergleichende serum-diagnostische Untersuchungen über diese ganze Gruppe von Organismen angestellt hat, wird darüber demnächst an anderem Orte Näheres berichten.

Ich hoffe, daß die Einführung der neuen Grünagar- und Grüngelatine- und Grünlösung-Nährböden in die Untersuchungstechnik sich nach den verschiedensten Richtungen hin, im besonderen aber für die praktisch so überaus wichtige Ermittlung und Diagnose des Typhusbacillus, sowie für die Diagnostik der bakteriellen Darminfektionen überhaupt wertvoll erweisen wird.