

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ zu Berlin.)

Zur Frage der Veränderlichkeit von Vibrionen.

Von
Camilla Platz,
Med. Praktikantin.

In einer Sitzung der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft vom 5. Juni 1920 hat Ph. Kuhn Mitteilungen über „Morphologische Studien an Bakterien“ gemacht, die er später in der Berl. klin. Wochenschr. Nr. 13, 1921, veröffentlicht hat. Seine Untersuchungen an *Vibrio Metschnikoff* und *Mäuse typhus bacillen* und die weitgehenden Schlußfolgerungen daraus bauen sich auf einer ungewöhnlichen und etwas umständlichen Untersuchungsmethodik auf. Er verwendete eine Modifikation des von v. Wasielewski und Kühn für protozoologische Studien angegebenen Aufklebeverfahrens, bei dem der Kulturrasen mitsamt dem Agar am Deckglas fixiert und nach Entfernung des Agarstückchens mit Giemsa gefärbt wird. Mit Hilfe dieses Verfahrens hat Kuhn die Veränderungen im morphologischen Verhalten der oben genannten Bakterienstämme im Verlaufe eines länger dauernden Wachstums beobachtet, indem er von der Zeit des Ausstrichs auf der Platte an fortlaufende Agarabdrücke machte und mikroskopische Präparate herstellte.

Mit diesem Verfahren hatte Kuhn für den *Vibrio Metschnikoff*, von dem er hauptsächlich spricht, folgende Ergebnisse: Bei den Abdrücken aus den ersten Stunden sieht man regelrechte Vibrionen; später treten Fäden und aus mehreren Fäden gebildete Flechtwerke auf. Diese Gebilde nennt der Verfasser B-(Bakterien) Formen. In den B-Formen erscheinen mit der Zeit Körnchen, die im frischen Präparat lichtbrechend, nach Giemsa rotgefärbt sind. Eine zweite Form nennt Kuhn D- (dendritische) Form. Er versteht darunter Fadengebilde, die mehrfach dicker als die gewöhnlichen Fäden sind und häufig kolbenartige Anschwellungen oder Verzweigungen haben. Zwischen den Vibrionen und Fäden beobachtet er bereits in den frühesten Präparaten rötliche feinste Kügelchen. Drittens beschreibt Kuhn, ebenfalls in sehr frühen Präparaten, A- (amöboide) Formen, die er zunächst als blaurote, runde Gebilde kennzeichnet, und von denen er sagt: sie nehmen an Zahl und Größe mit der Zeit zu — mit zunehmender Größe erhalten sie eine blaue Färbung im Giemsa-Präparat. Ihr Bau ist

wabig; hier und da sieht man in ihnen ein feines, rotes Körnchen. Die Vibrionenfäden in ihrer Nähe sind vielfach zwirnsfadenartig dünn. Durch Zusammenlagerung von mehreren dieser rundlichen Gebilde entstehen auch längliche Formen, die oft an Flaschenkürbisse erinnern. Die Körnchen in ihnen werden zahlreicher. Schließlich treten diese Gebilde in großen Massen auf und wachsen bis zu $9\ \mu$ Durchmesser heran. Häufig sieht man eine oder zwei Vakuolen. In manchen Präparaten erkennt man deutlich, daß die rundlichen Gebilde aus einer äußeren hüllenartigen Schicht und einer inneren Masse bestehen, die sich in der Giemsa-Färbung voneinander abheben. Noch später zerfallen die großen Gebilde, und die Körnchen in ihnen werden frei. Als vierte Form beschreibt Kuhn endlich eine kokkenähnliche, die er C-(coccoide) Form nennt. Von dieser sagt der Autor: Je älter eine Agarkultur ist, desto mehr neigt sie zur Bildung der kokkoiden Formen. Durch bestimmte äußere Einflüsse, die noch näher zu erforschen sind, wird ihr Erscheinen begünstigt. Die kokkoiden Formen entstehen durch das Wachstum der lichtbrechenden Körnchen in den Vibrionen. Die Körnchen wachsen zur Größe von Kokken aus. Die C-Formen vermehren sich in der Weise, daß aus einer Form zwei entstehen. Ihr Aussehen erinnert stark an Sarcine. Diese C-Formen hat der Verfasser weiterhin, wie unten noch zu erwähnen, in Reinkultur gezüchtet. Die gewonnenen Bilder deutet Kuhn in folgender Weise: Bei den D-Formen handelt es sich um engverschlungene und dicht aneinandergelagerte Fäden; wenn aus deren Geflecht sich einzelne Fäden oder Fadenpaare ablösen, so kommt das Bild der Verzweigungen zustande. Bei den A-Formen hat Kuhn den Eindruck wohlcharakterisierter, feingebauter Lebewesen mit einem ganz bestimmten Entwicklungsgang. Sie wachsen aus feinsten Kügelchen zu rundlichen Gebilden an; es treten feinste Körnchen in ihnen auf, die nach Zerfall der großen Formen frei werden. Kuhn meint, der Gedanke liege nahe, daß es sich um ein besonderes Entwicklungsstadium der Bakterien handle; die Vorbedingung, daß die von Kuhn als amöboide Formen bezeichneten Gebilde aus den Bakterien hervorgehen, ist aber, wie der Verfasser sagt, nicht mit Sicherheit beobachtet. Es führt auch umgekehrt von den A-Formen kein Weg zu den Bakterien. Von den C-Formen sagt Kuhn: Sie sind wohlgeformte, widerstandsfähige Lebewesen. Sie lassen sich in Sonderkulturen, besonders auf Serumagar und Maltoseagar züchten. Sie entstehen aus den Körnchen der Bakterien, aber es führt auch von ihnen kein Weg zu den Bakterien zurück. Als Schlußfolgerung aus seinen Beobachtungen läßt Kuhn die Möglichkeit offen, daß bei den A- und C-Formen Entwicklungsstufen der Bakterien, vielleicht im Rahmen eines Generationswechsels, vorliegen. Da aber eine Rückzüchtung in Vibrionen stets unmöglich war, auch das sero-

logische Verhalten nicht für eine Verwandtschaft der A- und C-Formen mit den B-Formen spricht, so hält Kuhn eine andere Erklärung für wahrscheinlicher. Er hält nämlich die A- und C-Formen für besondere Parasiten, die mit den Bakterien in einer Art von Symbiose leben und die Bakterien zu ihrem Aufbau brauchen. Kuhn sagt: er habe Grund zu der Annahme, daß die von ihm beschriebenen Formen bei allen Bacillen vorkommen.

Die Beobachtungen Kuhns sind nach Ansicht des Autors der oben angeführten Herstellungstechnik der mikroskopischen Präparate zu verdanken, die wesentlich schonender sei, als die gewöhnlichen Färbe- und Fixationsmethoden. Im Hinblick auf die weitgehenden allgemeinen Schlußfolgerungen erschien es wünschenswert, die Mitteilungen Kuhns nachzuprüfen, insbesondere festzustellen, ob der Teil seiner Beobachtungen, der über den Rahmen des seit langer Zeit Bekannten hinausgeht, als ein Erfolg der neuen Methode dieser Nachprüfung standhält.

Ich habe daher auf Anregung von Herrn Geheimrat Prof. Dr. F. K. Kleine im Untersuchungsamt des Instituts „Robert Koch“ nach dem von Kuhn angewandten und in seiner Arbeit von ihm in allen Einzelheiten beschriebenen Verfahren mikroskopische Präparate in Giemsa-färbung angelegt. Zur Ausführung der Untersuchungen, bei denen Herr Dr. Levinthal mir mit seinem Rat zur Seite stand, hatte ich eine im Institut „Robert Koch“ vorhandene Kultur von *Vibrio Metschnikoff* zur Verfügung; dieselbe ist übrigens seinerzeit auch an Herrn Prof. Kuhn abgegeben worden. Es wurden Präparate angefertigt von der ganz frischen Kultur bis zu 14 Tage alten Agarabdrücken, indem in gewissen Zeitabständen von den zu Beginn auf der Agarplatte gleichzeitig beimpften Bezirken nacheinander Klatschpräparate gemacht wurden. Nun zeigten sich bei einem frischen oder erst wenige Stunden alten Abdruck der Agarkultur von *Vibrio Metschnikoff* die einzelnen Formelemente als typische Vibrionen. Wurde die Kultur etwas älter, so kamen Gebilde hinzu, die von der typischen Form abwichen. Es traten zunächst leicht gebogene oder ziemlich gerade gestreckte Fäden auf. Die Fäden wurden allmählich sehr lang, teils erschienen sie in manchen Abschnitten ihres Verlaufes, besonders aber nach einem oder beiden Enden hin, sehr dünn. Außer den Bakterien und Fäden und zwischen ihnen freiliegend fanden sich auch kleine Kügelchen. Diese zeigten in ihrer Färbbarkeit wohl kaum einen Unterschied gegenüber den Vibrionen, zum Teil waren sie kräftig dunkellila gefärbt, zum Teil mehr rötlich. Auch in den Vibrionen waren intensiv gefärbte Körnchen, besonders an den Enden wahrzunehmen, in etwas älteren Präparaten deutlicher als in den frischen. Allmählich wurden die zwischen den Vibrionen und Fäden gelegenen Kügelchen sehr zahlreich;

sie lagen ziemlich gleichmäßig verteilt, ohne Anhäufungen oder Ketten zu bilden. Die Fäden wurden sehr lang und zart. Bei noch älteren Kulturen war kaum noch die typische Vibrionenform zu finden. Es erschienen längere, schwach gebogene Stäbchen, gerade gestreckte Stäbchen und solche, die segmentiert aussahen, auch spirillenartige zarte Formen und ovoide Stäbchen, daneben Fäden, Kügelchen und geblähte kugelige Formen, die im Innern häufig eine Lücke hatten. Andere Formen als die bisher beschriebenen habe ich bei der mir zur Verfügung stehenden Kultur von *Vibrio Metschnikoff* nicht finden können. Alle diese von mir beobachteten Gebilde sind längst in älteren Vibrionenkulturen nachgewiesen worden. Bekannt ist seit langem das Auftreten von Fäden und Spirillen, das Erscheinen von kleinen Kügelchen oder aufgequollenen kugeligen Formen mit einer Lücke im Innern. Diese Gebilde werden von den Autoren als Involutionsformen oder Degenerationsformen aufgefaßt. Als Involutionsformen beschreiben sie van Ermengem¹⁾ und Kitasato²⁾. Die Anschauung Hüppes³⁾, daß die bei Erschöpfung des Nährbodens auftretenden Kügelchen, die er als Arthrosporen bezeichnet, als Dauerformen der Vibrionen aufzufassen seien, ist nach den Untersuchungen von Kitasato nicht aufrechtzuerhalten. Nach Gotschlich⁴⁾ stellen Scheinfäden und unregelmäßige kokkenähnliche Gebilde echte Degenerationsformen dar. Bärthlein⁵⁾ beschreibt als Mutationsformen der Vibrionen kurze, dicke, plumpe, bipolar gefärbte, gut gekrümmte Bacillen oder lange, dicke, ebenfalls gut gekrümmte, segmentiert gefärbte Bakterien, die in trüben Kolonien wachsen. Maassen⁶⁾ bezeichnet als teratologische Wuchsformen verschlungene Fäden und Fadengeflechte, wie auch Verzweigungen und Kugeln oder hefezellenartige Formen bei Vibrionen. Diese Bildungen treten besonders bei gewissen Zusätzen, z. B. Lithiumchlorid, zum Nährboden auf.

Ein Teil der Beobachtungen Kuhns deckt sich mit den obenstehenden Befunden der erwähnten Verfasser, nämlich soweit sie die Kügelchen und fädigen Gebilde in alten Vibrionenkulturen angehen. Um etwas ganz anderes handelt es sich aber bei den sarcineartigen Gebilden, die Kuhn aus seinen Vibrionenkulturen herauszüchten konnte, und die man, wie er selbst sagt, immer wieder versucht war, für verunreinigende Kokken zu halten. Während Kuhn angibt, daß

¹⁾ van Ermengem, *La sem. méd.* 1893.

²⁾ Kitasato, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh.* 3. 1888.

³⁾ Hüppe, *Fortschr. d. Med.* 1885.

⁴⁾ Gotschlich, *Handbuch von Kolle und Wassermann Bd. I: Allgemeine Morphologie und Biologie.*

⁵⁾ Bärthlein, *Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte* 40. 1912.

⁶⁾ Maassen, *Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte* 21. 1904.

er diese in Reinkultur züchtbaren, nicht mehr in die typische Vibrionenform zurückzuführenden C-Formen in allen Kulturen, bei dem einen Stamm früher, bei dem anderen später, gefunden hat, habe ich etwas Derartiges in keinem meiner Versuche beobachtet. Nur in einem Präparat von einem 14 Tage alten Agarabdruck habe ich einmal Kokken von Sarcinestalt gefunden, an deren Charakter als Luftkeimen nach Form und Lagerung nicht der geringste Zweifel aufkommen konnte. Da das vorgeschriebene Verfahren ein wiederholtes Öffnen der Agarplatte bedingt, so ist ein gelegentliches Hinauffallen von Luftkeimen fast unvermeidlich. Freilich ließe sich diese Gefahr vermeiden, wenn die Klatschpräparate nicht von verschiedenen Bezirken ein und derselben großen Agarplatte, sondern von verschiedenen kleinen, nur einmal zu verwendenden Platten einer gleichzeitig beimpften Reihe gewonnen würden.

Ebensowenig habe ich Formen entdeckt, die an die A-Form von Kuhn erinnern. Kuhns Beschreibung der amöboiden Formen läßt auch gar nicht erkennen, weshalb man den Eindruck „wohlcharakterisierter, feingebauter Lebewesen mit einem bestimmten Entwicklungsgang“ oder gar den Eindruck von Amöben erhalten sollte. In der Beschreibung Kuhns fehlen eigentlich alle wesentlichen Merkmale der Amöben. Offenbar stützt sich Kuhn bei seinen Beobachtungen nur auf gefärbte Präparate, nicht auf frische. Daß in alten Vibrionenkulturen eigentümliche, sehr große, kugelige Gebilde auftreten können, ist aus den von Kuhn angeführten Arbeiten bekannt und besonders von Maassen hervorgehoben worden.

Die Nachprüfung führte demnach zu keiner Erweiterung unserer Kenntnisse über die Wuchsformen der Vibrionen. Das Auftreten von Scheinfäden einerseits, von kleinen Körnchen und gequollenen kugligen Gebilden andererseits wird auch heute wohl noch am besten mit den Einflüssen des Bakterienstoffwechsels, also im Sinne einer Involution zu erklären sein. So hat auch die Verwendung einer originellen Untersuchungsmethode unsere bisherigen Kenntnisse über morphologische Variationen bei Vibrionen nicht zu erweitern vermocht. Die über den Rahmen älterer Untersuchungen hinausgehenden Beobachtungen Kuhns hielten der Nachprüfung nicht stand. Somit wird für die weitgehenden spekulativen Folgerungen des Autors der solide Unterbau noch vermißt.

Nachtrag bei der Korrektur. Während der Drucklegung erschien im Zentralbl. f. Bakteriol., I. Abt., Orig., 87, 1921, H. 4, von E. Gildemeister eine Arbeit „Über die Kuhnschen Variationsformen des *Vibrio Metschnikoff*“, nach welcher der Verfasser auf Grund eingehender Untersuchungen die Beobachtungen Kuhns, soweit sie über die früheren Befunde anderer Untersucher hinausgehen, nicht bestätigen und die hypothetischen Schlußfolgerungen Kuhns nicht als genügend begründet ansehen kann.