

# Ueber den Bacillus xerosis und seine Sporenbildung.

Von

**Dr. Paul Ernst,**

I. Assist. des patholog. Instituts zu Heidelberg.

---

(Hierzu Taf. I).

---

Die mycotische Natur der Xerosis conjunctivae bedarf heute wohl kaum eines Fürsprechers mehr. Die Ueberzeugung, dass auch bei dieser Affection Mikroorganismen mit im Spiele seien, hat sich vor langer Hand vorbereitet. Vereinzelte Angaben über Batterienfunde bei der Xerosis, sei es der einfachen nicht ulcerirenden, mit Hemeralopie combinirten, sei es der zur Keratomalacie führenden, mit schweren Symptomen von Seiten anderer Organe einhergehenden Form, lassen sich bis vor die Mitte der 70er Jahre verfolgen. Seitdem Bezold<sup>1</sup> 1874 und Horner<sup>2</sup> 1877 auf diesen Zusammenhang aufmerksam gemacht haben — letzterer freilich nicht im Sinne eines ätiologischen Causalzusammenhanges — sind von Zeit zu Zeit Beobachtungen hinzugekommen. Aber neuen Impuls erhielt die einmal angeregte Frage erst in der neuen bacteriologischen Aera, in unserem Decennium. Von den Arbeiten Leber's, Kuschbert's und Neisser's, welche die Jahre 1883 und 1884 brachten, befriedigt Neisser's Arbeitsantheil die heute gestellten Anforderungen unstreitig am meisten.<sup>3</sup> Eine wirklich methodisch durchgeführte Darstellung der morphologischen und zum Theil auch der biologischen Verhältnisse an der Hand sorgfältiger und schulgerechter Züchtungen verdanken wir den Hamburger Autoren

---

<sup>1</sup> Friedr. Bezold, *Berliner klinische Wochenschrift*. 1874. Nr. 33.

<sup>2</sup> Friedr. Horner, *Sitzungsber. der ophthalmologischen Gesellschaft für 1877*. S. 131—133.

<sup>3</sup> Zehender's *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. Beilageheft: Bericht über die XV. Versammlung der ophth. Gesellschaft in Heidelberg. 1883. S. 195 bis 204.

Fraenkel und Franke.<sup>1</sup> Bei ihnen findet man eine klare, kritische, scharfe aber gerechte Sichtung des vorhandenen literarischen Materiales. Die exacte sachliche Arbeit überhebt mich der Verpflichtung, auf die früheren Literaturangaben zurückzugehen und gestattet mir, ausschliesslich auf ihr Fundament weiter zu bauen.<sup>2</sup> Bezüglich des ätiologischen Zusammenhanges des gefundenen Bacillus und der Xerosis kommen die Verfasser eher zu einem negativen, zum mindesten einem vorsichtig reservierten Resultat. Ihr zusammenfassender Schlusssatz<sup>3</sup> lautet:

„An der Hand der bisher vorgebrachten Thatsachen möchten wir uns — mit allem Vorbehalt — folgendermaassen äussern.

Man kann von vornherein leugnen, dass der uns beschäftigende Bacillus, sowohl mit dem schaumigen Conjunctivalsecret, als auch den xerotischen Massen in irgend welcher ätiologischen Beziehung steht. Für diese Auffassung würde bis zu einem gewissen Grade der völlig negative Ausfall unserer Uebertragungsversuche von Bacillenreinculturen<sup>4</sup> auf den menschlichen Bindehautsack (mit mehr als vierwöchentlicher Beobachtungsdauer) sprechen. Andererseits weist das constante Vorkommen der Bacillen bei den hier erörterten Affectionen mit grosser Wahrscheinlichkeit auf ein ursächliches Verhältniss dieser Bacillen zu dem Secrete, in welchem sie gefunden wurden, hin.

Folgt man dieser Anschauung — und auch wir sind geneigt, es zu thun — dann wird man consequenter Weise zu dem Schlusse gedrängt,

<sup>1</sup> Ueber den Xerosebacillus und seine ätiologische Bedeutung. *Archiv für Augenheilkunde*. 1887. Bd. XVII. Hft. 2. S. 176.

<sup>2</sup> Immerhin will ich, heutiger Uebung gemäss, die benützte Literatur hier anmerken: Leber, Die Xerosis der Conjunctiva und Cornea kleiner Kinder. Vorläufige Mittheilung. von Graefe's *Archiv für Ophthalmologie*. Bd. XXIX. Hft. 1. — Derselbe, Ueber die Xerosis der Bindehaut und die infantile Hornhautverschwärung. *Ebenda*. Bd. XXIX. Hft. 3. — Kuschbert und Neisser, *Deutsche medicinische Wochenschrift*. 1884. Nr. 21 u. 22: Die mir schwer zugängliche Arbeit in der *Breslauer ärztlichen Zeitschrift*. 1883. Nr. 4 glaubte ich übergehen zu dürfen, da die Verfasser (nach ihrer eigenen Aussage) die dort gebotenen Resultate in der späteren Arbeit recapituliren und verwerthen. Nur aus dem Referate habe ich die Arbeit von Reymond und Colomiati (1880) (*Compt. rend. du congrès périodique international. d'ophthalm.* VI. Session. Annexes p. 118. Milan 1881) kennen lernen können. — Die Arbeiten Schleich's, Schulz', Denk's, Weeks' Gouvéa's lehnen sich in zustimmendem oder modificirendem oder widersprechendem Sinne an diejenigen der Genannten und boten für meinen specielleren Zweck weniger Interesse. Sie sind bei Fraenkel und Franke ausführlich citirt.

<sup>3</sup> A. a. O. S. 191.

<sup>4</sup> Einige Versuche von Uebertragungen der Reinculturen auf das Kaninchenauge, die ich im Interesse einer exacteren Technik mit Hilfe meines Collegen Dr. St. Bernheimer, Assist. der Augenklinik, ausführte, hatten bislang keinen nennenswerthen Erfolg.

dass man es bei dem schaumigen Secrete einer- und den xerotischen Veränderungen der Conjunctiva andererseits nur mit klinisch differenten Zuständen einer und derselben, durch den beschriebenen Bacillus hervorgerufenen Erkrankung zu thun hat.“ —

Ich möchte nun von vornherein den Gesichtspunkt feststellen, von dem aus ich die vorliegende Arbeit zu beurtheilen bitte. Dass ich nicht befugt bin, über die pathogene Rolle und Bedeutung des Xerosisbacillus mitzusprechen, ist schon darum selbstverständlich, da mein Ausgangsmaterial nur von einem einzigen Falle stammt. Ferner ist diese Frage von einem Augenarzt, wiewohl mit streng bacteriologischen Methoden zu lösen. Dazu ist Heidelberg kein geeigneter Platz. Xerosis ist hier eine seltene Affection, wie übrigens nach Fraenkel und Franke auch in Hamburg. Ueber die klinische Seite der Affection werde ich kein Wort verlieren und bin dazu um so mehr berechtigt, als ich mich bezüglich der Diagnose auf die Vorstellung des Kranken in der medicinischen Section des naturwissenschaftlich-medicinischen Vereins am 14. Juni 1887 durch Dr. da Gama Pinto berufen kann. Da aber Herr Geheimrath Becker in liebenswürdiger und dankenswerther Weise zu öfteren Malen mein Augenmerk auf bacteriologisch interessante Punkte der Ophthalmologie gelenkt hatte, wollte ich die freundliche Anregung, auch diesen Fall der Augenklinik bacteriologisch auszubeuten, nicht unbenützt vorbeigehen lassen. Dass ich dabei einen Bacillus fand, den ich in allen Stücken mit dem von Fraenkel und Franke beschriebenen identificiren<sup>1</sup> konnte, wäre an und für sich nicht wunderbar, und jedenfalls nicht einer Mittheilung werth, wenn ich nicht im Verlauf der Untersuchungen zu einigen Resultaten rein bacteriologischer Natur gelangt wäre, die aus dem Rahmen des Krankheitsbildes der Xerosis heraustretend, allgemeineres Interesse beanspruchen dürften.

Ueber das morphologische und culturelle Verhalten der gefundenen Bacillen gedenke ich hier nur so viel aus meinem Protocoll wiederzugeben, als zum Beweis der Identität<sup>1</sup> derselben mit dem der Hamburger Autoren unbedingt nöthig ist, da uns bald ein Interesse ganz anderer Art fesseln wird.

Bei einem 12jährigen Jungen mit ausgeprägter Xerosis mit Hemeralopie werden den 16. Juni 1887 von den xerosischen dreieckigen Partien kleine Spuren abgekratzt und auf Rinderblutserum sowohl als erstarrter, schräg gelegter Hydrocelenflüssigkeit ausgesät und zwar im Interesse eines

<sup>1</sup> Herr Dr. Eugen Fraenkel in Hamburg gewährte in liebenswürdigster Weise meine Bitte, ihm zur Prüfung meine Culturen zusenden zu dürfen und schrieb unter dem 27. November, dass er an der Identität des von mir gefundenen Bacillus und des seinigen nicht zweifle. Es ist mir eine sehr angenehme Pflicht, Herrn Dr. Fraenkel für diesen mir so werthvollen Dienst meinen besten Dank auszusprechen.

möglichst getrennten Wachstums einzelner Keime über einen möglichst grossen Theil der Oberfläche zerrieben. In dem einen Röhrchen entwickeln sich drei trockene weissliche, rosetten- oder sternförmige Schüppchen mit dünner auslaufendem, etwas durchscheinendem Rande und dickerem undurchsichtigem weissen Centrum. Ein etwas grösserer Stern wächst im anderen Röhrchen um ein kleines durch den Impfstich zurückgebliebenes Gewebeklümpchen. Im Condensationswasser<sup>1</sup> schwimmt eine ansehnliche Menge kleiner graulichweisser Schüppchen. So, wie am 4. Tage die Culturen erscheinen, so bleiben sie denn in der Folge ohne bemerkbares Wachstum.<sup>2</sup> Durch mehrfache Entnahme von Proben werden zahlreiche Keime auf der Oberfläche verschleppt und wachsen an Ort und Stelle zu minimalen trocknen, discreten, selten confluirenden Pünktchen.<sup>3</sup>

Den 4. Juli (also 19 Tage nach der primären Aussaat) werden secundäre Culturen angelegt, je eine auf Hydrocelenserum, eine auf Rinderblutserum. Letzteres erweist sich als ungleich viel fruchtbarer<sup>4</sup> als das erstere. Schon in 24 Stunden sind Culturen aufgeblüht, die aber auf Rinderblutserum üppiger gediehen sind. Die Höhe der Colonieen ist eine winzige, kaum zu schätzende, immerhin auf Rinderblutserum etwas beträchtlicher; sodann fällt ein eigenthümlicher, theils trockener, theils fettiger<sup>5</sup> Glanz der Oberfläche auf, stärker ausgeprägt auf dem Hydrocelenserum. Die untersten Partien des Nährbodens, vom Condensationswasser bespült, sind dichter bewachsen, im Condensationswasser selbst haben sich abgelöste grauliche Schüppchen zu Boden gesenkt.

Es ist noch nachzuholen, dass den 20. Juni (4 Tage nach der ersten Impfung) eine Impfung auf Agar-Agar vorgenommen wurde. Es wuchsen weit auseinander winzige trockne Schüppchen, am dichtesten wohl im Condensationswasser, beziehungsweise an dem von ihm bespülten Rande, wo wiederum viele abgelöste Schüppchen flottiren.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Fr. und Fr., a. a. O. S. 179.

<sup>2</sup> In Uebereinstimmung mit Kuschbert und Neisser, a. a. O. S. 322.

<sup>3</sup> Fraenkel und Franke, a. a. O. S. 179: „Isolirte, bisweilen confluirende Herde“.

<sup>4</sup> Auch die Gélose Glycerinée nach Nocard und Roux (*Annales de l'Institut Pasteur*. 1887. Nr. 1. p. 19 und *Société de biologie*, Séance du 11. December 1886: *Gazette hebdomad. de méd. et de chirurg.* 1886. Nr. 52) wurde als Nährboden geprüft. Ob ein Wachstum darauf stattfindet, ist mir fraglich; jedenfalls ist dasselbe so kümmerlich, dass eine Beurtheilung desselben nicht wohl möglich ist.

<sup>5</sup> Fraenkel und Franke, a. a. O. S. 180.

<sup>6</sup> Gegenüber Fr. und Fr., a. a. O. S. 180 ist hervorzuheben, dass eine primäre Agar-Cultur angegangen ist, was jenen Autoren nicht geglückt ist, da sie nur Secundär-Culturen durch Uebertragung von Blutserum auf Agar erhalten konnten. Für den Kenner liegt darin selbstverständlich kein Widerspruch!

Eine etwa 12 Tage alte Cultur auf Agar-Agar als Trockenpräparat untersucht, bietet ein Bild zusammengeknäuelter Häufchen fast unentwirrbarer Organismen dar. Auf den ersten Blick ist man versucht, sie für Kokken zu halten. Bald klärt sich der Irrthum und namentlich an Fuchsinpräparaten löst sich das Bild auf in vielfach gekrümmte Bacillen, in denen aber eine durch Fuchsin intensiver gefärbte Masse in Form von Körnern eingelagert erscheint.

In etwas älteren Blutserumculturen (16. Juni bis 3. Juli) findet sich eine Menge Fädchen und Knäuel solcher, die, mit stärkeren Trockenlinsen untersucht, den Eindruck von Streptokokkenmassen machen können. Die einzelnen sind im Durchschnitt  $6-8\mu$  lang, leicht wellig und geschlängelt, selten einmal schleifenförmig. Aus der Reihe der annähernd gleich dicken Körner ragt hin und wieder ein grösseres Kügelchen hervor. Nicht selten schwillt das Fädchen am Ende leicht kolbig an, dadurch dass allmählich die Körner grösser werden. Sehr zutreffend bezeichnen Fraenkel und Franke die Fädchen als „hornartig gebogen.“<sup>1</sup> Wenn oben die Bezeichnung „Körner“ gebraucht wurde für jene stärker gefärbten eingelagerten Körper, so ist das dahin zu modificiren, dass diese Wesen nicht immer runde Gestalt, sondern oft eckige kantige Formen haben können. Sie bilden oft Scheiben, durch blasse Septen getrennt, an krummen Bacillen keilförmig, so dass Bilder resultiren, die an die Gewölbeconstruction erinnern, auch gekrümmten Raupen nicht unähnlich wegen der keilförmigen aneinander gelagerten Einzelglieder. Nicht selten ist der breiteste Leibring, — um die letztere Metapher weiter zu benutzen — in der Mitte und von ihm aus nehmen nach beiden Seiten die Glieder an Grösse ab. An frischen Culturen (24 Stunden alt), die auf Blutserum gewachsen, beträgt die Grösse der einzelnen Bacillen, in Canadabalsam eingeschlossen, in Gentianaviolett gefärbt,  $1.5-2\mu$  im Durchschnitt, doch kommen kleinste Formen von  $1\mu$  Länge auch ausnahmsweise vor und mit dem zunehmenden Alter der Culturen überwiegen längere. Die Dicke mag  $\frac{2}{3}\mu$  betragen, soweit sich dieselbe auf diese Weise abschätzen lässt. Jedes einzelne Individuum ist leicht gebogen, die Enden abgerundet und zwar eher konisch sich verjüngend; wenn man die Choleraspirillen wohl gelegentlich mit Wiener Würstchen verglichen hat, so passt dieser Vergleich trotz mancher sonstiger Aehnlichkeiten eben wegen dieser etwas zulaufenden Enden für unsere Bacillen nicht. Das Einzelindividuum zeigt keine Abtheilungen, keine Fächerungen, aber schon in so früher Phase begegnet man sehr zahlreichen längeren Formen von  $6-8\mu$  Ausmaass, mit fächeriger Theilung und kolbigen Enden, die im Gegensatz zu den gracil aus-

<sup>1</sup> Fr. und Fr., a. a. O. S. 181.

laufenden Polen der kleinen Fädchen um so mehr auffallen. Die Färbung mit Fuchsin lässt die Bacillen etwas plumper, dicker (bis fast  $1\ \mu$  breit) erscheinen als die Tinction mit Gentianaviolett. Färbung nach Gram liefert Bilder, die in keinem Punkte von der Gentianaviolettfärbung differiren. 5 Minuten langes Verweilen in Jodjodkalium und langes Auswaschen in absolutem Alkohol thun der Färbung keinen Eintrag. Es fällt regelmässig auf, dass sich die Kolbenendglieder nach Gram gefärbt, ganz besonders dunkel und intensiv hervorheben. Darin kann ich Fraenkel und Franke wiederum zustimmen, dass sich die Bacillen wässeriger concentrirter Methylenblaulösung gegenüber ablehnend verhalten; dabei kam ich auf den Gedanken, die genannte Farbe in einer Weise einwirken zu lassen, die das Tinctionsvermögen wesentlich zu erhöhen geeignet ist. Es wurde starke alkalische Löffler'sche Lösung verwendet, wiederum ohne allen Erfolg. Ich nahm die Wärme zu Hülfe; das Resultat befremdete auf den ersten Blick. Mit mittleren Trockensystemen, die das Bild ungenügend auflösen, glaubte ich Mikrokokken zu sehen. Nimmt man aber stärkere Vergrösserungen zu Hülfe und färbt in sorgfältiger und discreter Weise mit schwachen Fuchsinlösungen oder Bismarckbraun nach, so erscheinen die Bacillen in ihrer ganzen Länge röthlich bez. gelblich gefärbt und enthalten in ihrem Innern 1—2—3, selten ganze Reihen von 6 bis 8 tiefblau gefärbte Kügelchen. Nicht alle dieser Dinge sind in Stäbchen eingebettet. Eine verschwindend kleine Zahl ist frei im Gesichtsfeld zerstreut.

Ich gebe in Folgendem die sicherste Vorschrift für das Verfahren:

Auf die 3 Mal in üblicher Weise durch die Flamme gezogenen, noch warmen Deckgläschen wird starke alkalische Löffler'sche<sup>1</sup> Methylenblaulösung<sup>2</sup> geträufelt und zwar ziemlich reichlich. Dann an einer Ecke mit

<sup>1</sup> Scrupulös genau nach Löffler's Vorschrift hergestellt: 30<sup>ccm</sup> conc. Alkohol-lösung von Methylenblau auf 100<sup>ccm</sup> Kalilauge, 1:10000. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt.* 1884. Bd. II. S. 439.

<sup>2</sup> Den 17. November wurde versucht, mit anderen Farbstoffen, aber nach denselben chemischen Gesichtspunkten, die Färbung zu vollziehen, eingedenk der Möglichkeit, die Tub.-Bacillen z. B. mit allen möglichen Farbstoffen zu tingiren, wenn man nur sich strenge an die von Ehrlich gegebene Richtschnur hält. (Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. *Charité-Annalen*, XI. Jahrg.). Es wurde eine Lösung genau nach dem Löffler'schen Recept gemacht, nur Methylenblau durch Fuchsin substituirt. Die ganze übrige Technik der Reaction blieb dieselbe. Das Resultat war aber eine Färbung, die vollkommen dem Bilde der Fig. 5 entsprach. Daraus geht wohl hervor, dass dem Methylenblau insbesondere eine Affinität zu jenen Kügelchen innewohnt, dass es sich mehr um eine ganz spezifische Farbstoffreaction handelt und nicht um eine Färbung, die an Hand allgemein chemischer Betrachtungen zu übersehen ist.

der Pincette gefasst, wird das Gläschen eine halbe Minute über der lichtlos brennenden Bunsen'schen Flamme hin und her bewegt. Nur so weit darf die Erwärmung getrieben werden, als leichte Nebel von der Färbeflüssigkeit aufsteigen; sowie letztere in's Sieden kommt, ist das Präparat unrettbar verloren. Mit einer grossen Sorgfalt habe ich daher die Gläschen der Flammenspitze nur auf 15—20<sup>cm</sup> genähert. In Wasser tüchtig abgespült, kommt nun das Präparat auf Bismarckbraunlösung zu schwimmen. Hierfür genügen 1—2 Minuten, doch auch eine längere Einwirkung vermag der vorausgegangenen Blaufärbung nichts anzuhaben; Ueberfärbung ist nicht zu fürchten. Es ist dies die schonendste Nachfärbung. Wegen des grösseren Farbencontrastes elegantere Bilder liefert eine Nachfärbung mittelst Fuchsinlösung, die aber so schwach genommen werden muss, dass 3—4 Tropfen der gewöhnlichen, üblichen (nicht concentrirten) Lösung auf ein Uhrglas mit Wasser geträufelt werden. Nimmt man die übliche Lösung,<sup>1</sup> so färben sich die Bacillen so intensiv, dass die blauen Kügelchen verdeckt werden. Der Endeffect ist dann derselbe, wie nach einfacher Färbung der Bacillen mit Fuchsinlösungen. Fig. 5 zeigt möglichst getreu ein solches Bild. Wie kommen nun aber plötzlich die kolbigen Endglieder zum Vorschein, Dinge, die bei der oben angegebenen Färbemethode vollständig vermisst werden, Dinge, die aber Fraenkel und Franke ganz klar und deutlich beschreiben und die Neisser auch entschieden schon gesehen hat! Um mir diese Discrepanz der Bilder No. 1, 2, 3, 6 einer- und Fig. 5 andererseits befriedigend zu erklären, bin ich zu der Annahme genöthigt, es gehe eine Bacillenmembran, welche die stärkeren Anilinfarben auch aufnimmt, vom Bacillus auf das endständige Kügelchen über, dasselbe umfassend, einkleidend.<sup>2</sup> Die Farbe der Membrankappe nun maskirt das Kügelchen. Aus dem Gesagten erhellt, dass die Bismarckbraunlösung sich für die Nachfärbung mehr empfiehlt wegen ihrer absoluten Sicherheit, während die Fuchsinfärbung manchmal im Stiche lässt und zum Gelingen eine gewisse Uebung, einen gewissen instinctiven Takt voraussetzt. Nach wenigen Versuchen hatte ich das erstere Verfahren so in der Hand, dass mir kaum ein einziges Präparat misslang, während ich für das Fuchsinverfahren nicht dasselbe behaupten kann. Ich habe ferner in Nachahmung der Versuche Birch-Hirschfeld's<sup>3</sup> Rinderblutserum mit 10 bis 20 Tropfen concentrirter wässriger Lösungen

<sup>1</sup> Ich verstehe darunter eine solche, die durch Zuträufeln concentr. alkohol. Fuchsinlösung zu Wasser bis zum Entstehen leichter Trübung gewonnen wird.

<sup>2</sup> Jener Theil der Bacillenmembran, die nachher zur äusseren Sporenhaut wird. (Vergl. Hüppe, *Formen der Bacterien*. S. 131.)

<sup>3</sup> *Tageblatt der 60. Naturforscherversammlung in Wiesbaden 1887.*

von Phloxinroth und Benzopurpurin<sup>1</sup> versetzt und durch Erstarren prachtvoll durchsichtige Nährböden erhalten.

Ob die Körnchen bei Färbungen in viro eine von den Bacillen verschiedene Election den Farbstoffen gegenüber verrathen, musste eruiert werden. Birch-Hirschfeld<sup>2</sup> hat Aehnliches für die Typhussporen angegeben: Wiewohl nun innerhalb 20 Stunden die Culturen auf diesen Nährböden gedeihlich sprossen, so war weder von den Körnchen noch von den Bacillen auch nur die geringste Menge des Farbstoffes aufgenommen worden, obschon der ganze Culturstreifen roth erschien. Das letztere freilich erklärt sich durch die schon oben erwähnte minimale Dicke der Colonieen, die den Farbstoff des Untergrundes durchscheinen liess. Und dass der Bacillus sich in viro nicht färbte, erklärte sich durch die geringe Affinität (s. v. v.) des Bacillus gerade mit diesen Farbstoffen. Trockenpräparate färben sich nur schwach mit Phloxinroth, ganz und gar nicht mit Benzopurpurin. Gleichzeitig zeigte sich aber, dass Bismarckbraun oder Fuchsin als Contrastfarben in der oben beschriebenen Methode mit Vortheil durch Phloxinroth zu substituiren seien, da diese Farbe in angenehmster Weise einerseits den hübschen Contrast<sup>3</sup> gegenüber Blau, andererseits die schonende discrete Wirkung des Bismarckbraun vereinigt. Die so behandelten Präparate sind an Sauberkeit und Eleganz den anderen überlegen; ich habe mich sofort zu dieser Modification des obigen Verfahrens bekehrt.

Sind nun die Kügelchen wohl präexistente, im Aufbau des Bacillus eine wesentliche Rolle spielende Dinge, oder sind sie Artefacte, am Ende gar nur Farbstoffkörnchen? Das ist die erste Frage. Es leuchtet ein, dass vor Allem die Bacillen im möglichst natürlichen Zustand betrachtet werden mussten. Eine 48 Stunden alte Cultur wird im hängenden Wassertropfen aufgeschwemmt und untersucht. Ich kann auch hier die Beschreibung der Hamburger Autoren nur mit Wenigem ergänzen: Die Grössenverhältnisse sind ungefähr dieselben wie die der Fuchsinpräparate: Leicht gebogene Stäbchen von 2—3  $\mu$  Länge,  $\frac{2}{3}$ —1  $\mu$  Breite. Die längeren Stäbchen zeigen schon ohne alle Färbung eine Gliederung in helllichtbrechende, stark leuchtende Kügelchen, die in eine mattere Grundsubstanz eingebettet liegen. Eine Eigenbewegung kommt den Stäbchen nicht zu. Ein Theil der hellleuchtenden Kügelchen entspricht gewiss den blauen

<sup>1</sup> Beide Präparate bezogen von Dr. Grübler, Leipzig.

<sup>2</sup> *Tageblatt der 60. Naturforscherversammlung in Wiesbaden*. 1887. S. 276.

<sup>3</sup> Ob Roth oder Braun als Contrastfarbe des Blau zu wählen sei, das ist freilich Geschmackssache. Bismarckbraun färbt so zart, dass der Effect mehr ein gelber Farbenton ist, und somit hätten wir ja doch in der Complementärfarbe die natürlichere Folie.



Körnchen; ob aber alle, bezweifle ich. Es wurden dieselben Präparate zuerst ungefärbt, dann nach dem von mir oben angegebenen Verfahren gefärbt untersucht und nun die Anzahl der einen und der anderen Kügelchen gegen einander abgeschätzt. Ich gewann den Eindruck, dass die blauen Kügelchen minder zahlreich seien, d. h. dass nur ein Theil der hellen Körnchen, allerdings der grössere, jene Farbstoffreaction gebe.

Nachdem der erste Einwand, den übrigens wohl Niemand ernstlich erhoben hätte, zu Gunsten einer Annahme präexistenter Gebilde abgethan ist, musste die Frage nach dem Wesen dieser Dinge, nach ihrer biologischen Bedeutung zunächst auftauchen. Es ist unendlich schwer, eine präzise positive Antwort darauf zu geben und ich werde mich bescheiden müssen, mit Gründen der Wahrscheinlichkeit, der Analogie und der Exclusion einer befriedigenden Antwort möglichst nahe zu kommen.

Wer die Zeichnungen<sup>1</sup> der Präparate (Figg. 1, 2, 3, 6) betrachtet, der wird gewiss mit mir zuerst an Sporen denken. Das grelle Missverhältniss aber der wenigen Organismen, bei denen Sporenbildung morphologisch und biologisch einwandfrei beobachtet und beschrieben ist und der Unsumme von Stellen in der Literatur, die keck und kühn von Sporen zu erzählen wissen, macht von vornherein gegen einen solchen Gedanken misstrauisch. Freilich sind wir mit der Beurtheilung unserer Xerosekügelchen besser daran als mit sporenähnlichen Dingen anderer Organismen. Handelt es sich doch hier um eine präzise, genaue Farbenreaction, welcher gegenüber sich anders die Kügelchen verhalten, anders die Bacillen. Wer sträubt sich nun, mit mir den Schluss zu ziehen, dass zwei Dinge, die sich chemisch differenten Agentien gegenüber verschieden verhalten, eben auch als zwei chemisch differente Körper angesehen werden müssen? Damit sind wir freilich nun nicht allein auf Sporen angewiesen. Involutionsformen, Producte regressiver Metamorphose sind ja gewiss in ihrer chemischen Constitution vollkräftigen Bacillen auch unähnlich, können ja, wie Jedermann weiss, auch in Gestalt von kügelchen- und körnchenartigen Einlagerungen im Bacillus auftreten.

Ich muss hier, namentlich um die Hamburger Autoren zu Worte kommen zu lassen, etwas weiter ausholen. Sie haben bereits die Bedeutung der Körner discutirt.<sup>2</sup> „Bei den auf Serum gewachsenen Bacillen zeigten sich, was gleichfalls Neisser hervorhebt, heller und dunkler ge-

<sup>1</sup> Die Zeichnungen sind nach den besten mir zu Gebote stehenden Vergrösserungen (Zeiss, hom. Imm.  $\frac{1}{18}$  mit Ocular 4) mit der peinlichsten Sorgfalt, wie ich versichern kann, angefertigt. Eine allfällige Voreingenommenheit suchte ich nach Kräften auszuschliessen durch Zeichnung einer grossen Anzahl von Präparaten, von denen ich natürlich nur wenige zum Abdruck bringe.

<sup>2</sup> Fraenkel und Franke, a. a. O. S. 181.

färbte Stellen, deren Deutung als Sporen wir indessen aus weiter unten zu erörternden Gründen als sehr fraglich ansehen möchten.“ Und weiter unten: „Die Stäbchen waren nicht oder nur ausnahmsweise gerade, meist hornartig gebogen und von ausgesprochener keulenähnlicher Gestalt. Weiter aber fiel an diesen Präparaten eine Zusammensetzung der Einzelindividuen aus zwei sich durch ihre verschieden starke Färbung differenzierenden Substanzen auf, so dass im Innern einer sich nur blass tingierenden, die Form des einzelnen Stäbchens bestimmenden Masse dunkler gefärbte, überwiegend rundliche, seltener ovale oder scheibenartige Partikelchen in verschiedenen grossen Abständen von einander gelagert waren und zwischen sich hellere, von Farbstoff freie Lücken liessen. Während nun an einzelnen dieser Gebilde die blassrothe, Form bestimmende Grundsubstanz überwiegt, prävaliren in anderen die in jene gelagerten dunkler colorirten Partikelchen, und es kommt dadurch eine so grosse Zahl von Uebergängen im Aussehen der Stäbchen zu Stande, dass eine erschöpfende Beschreibung derselben nicht gegeben werden kann.“

Fraenkel und Franke kommen zu dem Schluss, dass es sich wohl eher um degenerative Vorgänge handle als um Sporen und stützen sich dabei hauptsächlich auf die geringe Resistenzfähigkeit der Culturen. Vier Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrt, sind sie nicht mehr fortpflanzungsfähig. Auch in Objectglasculturen, die bei Brutwärme conservirt waren, wurde nichts beobachtet, was an Sporenbildung erinnert.

Ohne die beiden sehr gewichtigen Gründe, die ich in ihrem vollen Umfange bestätigen kann, im Geringsten zu unterschätzen, möchte ich der negativen Beweisführung zwei positive Argumente entgegenstellen. Einmal waren die Hamburger Autoren noch nicht im Besitz unserer Farbenreaction, die ja überhaupt mit ihren bestechenden Bildern der mächtigste Antrieb meiner Vermuthungen ist. Und ferner wird man sofort bemerkt haben, wie sehr die oben abgedruckte Beschreibung für meine Fig. 5 passt, und wie so ganz und gar nicht für die Figg. 1, 2, 3, 6.

„Die keulenähnliche Gestalt, jene zwei Substanzen, die Partikelchen von rundlicher, nicht selten ovaler und scheibenartiger Form u. s. w.“, das Alles finden wir in Fig. 5, und finden es noch prägnanter bei etwas weniger intensiver Färbung, das Alles vermissen wir in den Präparaten, die nach unserem Verfahren gefärbt sind. Der Bedeutung jener Kolben ist schon oben gedacht. Kuschbert und Neisser beschreiben „Keulenformen, in Scheiben zerschnitten“. Ist es nicht, als ob sie Fig. 5 vor Augen gehabt hätten? Eine sorgfältige Vergleichung der Bilder 1, 2, 3, 6 einer-, und 5 andererseits, noch besser aber die successive Behandlung ein und desselben Präparates zuerst nach unserem Verfahren, dann unter steter Beobachtung durch Zuträufeln der Fuchsinlösung vom

Rande des Deckglases her lehrt nun, dass die mehrfach erwähnten Körner bez. „Partikelchen“ von Fraenkel und Franke, Kuschbert und Neisser einerseits, und meine blauen Kügelchen der Bilder 1, 2, 3, 6 andererseits nicht identische Dinge sind. Letztere sind in die ersteren eingebettet, und werden bei gewöhnlichen Färbungen von ihnen eingehüllt, maskirt. Erstere sind demnach als meine blauen Kügelchen plus einem Mantel von Bacillenprotoplasma, und möglicherweise einer Bacillenmembran dazu aufzufassen. Sehen wir doch so oft rund um eben erst frei gewordene Milzbrandsporen, oder einem Pole noch anhaftend, Fetzen von übrig gebliebener Bacillensubstanz, blau die rothe Spore umgreifend (nach Neisser's Methode gefärbt).

Auf analoge Bilder beziehen sich denn auch die folgenden Worte Fraenkel's und Franke's:<sup>1</sup>

„An vielen Stellen kommt es zum Schwund der von uns kurz als Grundsubstanz bezeichneten Masse und dadurch werden jene den Inhalt derselben bildenden Partikelchen frei und können eventuell den Eindruck von im Präparat liegenden Kokken machen.“ Ja! Neisser will sogar direct ein Auswachsen der oben erwähnten Scheiben zu Bacillen gesehen haben und zwar stehen die neuentstandenen Exemplare mit ihrer Längsaxe senkrecht zum alten Bacillus. Freilich fasst Neisser diese Form der Fortpflanzung als einen neben der zweigliederigen Theilung einhergehenden Theilungsmodus auf und nach seiner Aussage<sup>2</sup> spricht Cohn jene in Scheiben zerschnittenen Dinge mit den birnförmigen endständigen Anschwellungen als Gonidienketten an. Dadurch aber wird man zur Aufstellung einer dritten Form der Fortpflanzung neben directer Theilung und Sporenbildung gezwungen. Wozu die Complication? Vereinfacht unsere Reaction nicht die ganze Frage, für unseren Xerobacillus wenigstens? Erinnert nicht das, was Neisser gesehen, jenes Auswachsen der Scheiben zu Bacillen in der Querrichtung an Sporenauskeimung<sup>3</sup> — man denke an die Keimung der Subtilis-Sporen senkrecht zur Längsaxe —; ist denn die Cohn'sche Supposition von Gonidien nicht auch mit der Existenz von Sporen verträglich?<sup>4</sup> Allerdings will ich nicht generalisiren.

<sup>1</sup> A. a. O. S. 182.

<sup>2</sup> A. a. O. S. 323.

<sup>3</sup> Ueber die Auffassung der Differenz der Sporenauskeimung in Längs- und Queraxe vgl. de Bary. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze*. 1884. S. 505, sowie *Vorlesungen über Bacterien*. S. 17.

<sup>4</sup> Hüppe, *Formen der Bacterien*. 1886. S. 126. S. 133 nimmt er an, es handle sich um zwei Fructificationsvorgänge, die neben einander vorkommen würden, um Endosporen und daneben Gonidien (also Arthrosporen) demnach eine Pleomorphie der Fructificationsorgane.

Cohn soll diesen dritten Modus bei anderen Bacillen und Spirillen auch gesehen haben. Aber sollte es sich nicht verlohnen, auch dort einmal die neue Reaction zu versuchen! Möglich, dass sie uns auch dort Dinge erschliesst, die wir bis dahin nicht sehen<sup>1</sup> konnten; möglich, dass sie uns dadurch der Nothwendigkeit überhebt, das Schema der Fortpflanzung durch eine dritte Rubrik zu compliciren. Vereinfachung der Anschauungen ist ja doch das Kennzeichen fortschreitender Erkenntniss. Es ist eine blossе Perspective, die ich da eröffne; dessen bin ich mir wohl bewusst.

Wie mit Recht gefordert wird, habe ich es dabei nicht bewenden lassen, sondern mich bemüht, auf andere Merkmale, nach denen man auf die Sporennatur fraglicher Gebilde schliesst, zu fahnden.<sup>2</sup>

Einige Argumente morphologischer Natur mögen hier noch vorausgehen. Mein Protokoll beschreibt eine 48 Stunden alte Blutserum-Cultur, die von blauen Kugelchen wimmelt. Sie zeichnet sich aus durch eine Unzahl leicht gebogener Stäbchen, die an beiden<sup>3</sup> Enden blaue Knöpfchen tragen; durch eine beträchtliche Menge doppelgliedriger Stäbchen, deren proximale sowohl als distale Enden durch blaue Kugelchen armirt sind. Oftmals sind die beiden Glieder unter einem Winkel abgeknickt. Das ganze Bild spricht eindringlich für Sporen.

Ein ferneres morphologisches Verhalten spielt unvermerkt in's biologische Gebiet hinüber. Dass bei Zimmertemperatur aufbewahrte Culturen eine beschränkte Lebensdauer von einigen Wochen haben, kann ich Fraenkel und Franke<sup>4</sup> vollauf bestätigen. Mit Culturen aber, die stets im Brütschrank gestanden haben, werden folgende Uebertragungen vorgenommen: Eine Cultur vom 17./VIII. wird den 1./XI. (also nach

<sup>1</sup> Ich muss betonen, dass Neisser a. a. O. S. 323 deutlich glänzende Kugelchen beschreibt. In der Deutung ist er, wie billig, vorsichtig, zeigt aber entschiedene Neigung, sie für Sporen anzusprechen.

<sup>2</sup> Es muss hier erwähnt werden, dass Fraenkel und Franke (a. a. O. S. 181) die Xerosebacillen nach der Tuberkelbacillen-Methode zu färben versucht haben; mit negativem Resultat. Ob sie dies unter gleichzeitiger Erwärmung der Fuchsinlösung, wie es nach Neisser üblich ist, bewerkstelligt haben, geht aus dem Wortlaut nicht hervor, ist aber anzunehmen. Ich kann zum Ueberfluss den negativen Ausfall auch dieses Verfahrens verbürgen.

<sup>3</sup> de Bary sagt (*Vorlesungen über Bacterien*. S. 14): „Eine Mutterzelle bildet, soweit mit Sicherheit ausgesagt werden kann, immer nur eine Spore. Das ist fast immer mit Sicherheit nachzuweisen und die wenigen Angaben, aus welchen anderes, nämlich die Bildung von zwei Sporen in einer Zelle, hervorginge, sind unsicher, weil sie keine Garantie gegen das etwaige Uebersehen von Zellgrenzen oder sonstige Irrungen enthalten.“ Ich brauche wohl kaum noch eigens zu bitten, meinen obigen Wortlaut cum grano salis aufzunehmen und daraus eingedenk der Kleinheit und Schwierigkeit der Objecte, keinen Widerspruch mit dem Citat lesen zu wollen.

<sup>4</sup> A. a. O. S. 182.

75 Tagen) übergeimpft; die neue Cultur zeigt den 2./XI. noch kein Wachsthum, am 3./XI. ist sie nicht controlirt; am 4./XI. ist sie in gewohnter schöner Weise aufgeblüht, färbt sich charakteristisch mit Fuchsin, giebt die Sporenreaction — man gestatte mir der Kürze halber diesen präjudicirenden Ausdruck — in prägnanter Weise (Fig. 1). Präparate der alten Cultur vom 17./VIII., die also noch fruchtbar war, zeigen wirr im Knäuel liegende Bacillen, die sich ungemein schwer färben und auch keine Sporenreaction mehr geben. Wühlt man aber in den im Condensationswasser flottirenden Schüppchen herum, so fischt die Platinöse Dinge, die durch Fig. 8 wiedergegeben werden. In einem leicht diffus braun gefärbten Krümelchen, das durch feine Linien sich als ehemaliges Bacillenkümpchen verräth, liegen Kügelchen eingebettet von intensiver Blaufärbung und gleichmässigem Korn.

Die Beobachtung ist nicht vereinzelt: Eine Cultur vom 12./VIII. wird den 8./XI. (nach 88 Tagen) übertragen; die neue Cultur zeigt am 9./XI. noch kein Wachsthum, wird mit Condensationswasser gespült und zeigt nun den 10./XI. die bekannten Schüppchen. Die Cultur vom 12./VIII. wird auf die Sporenreaction geprüft. Es erscheinen spärliche, aber immer dicht in Gruppen stehende blauschwarze Körnchen, deren Einbettungsmasse den bacillären Charakter durchaus verloren hat. Eine undifferenzirbare, zerfallene, leicht krümelige, pulpöse Masse bildet die Umhüllung, von welch' unansehnlicher Folie sich die Körnchen um so deutlicher abheben.

Es fällt auf, dass Culturen von frischen, schön ausgeprägte bacilläre Formen enthaltenden Culturen übertragen, in 24 Stunden kräftig aufgeblüht sind, solche von alten abgeimpft zu erkennbaren Wachsthum dreier Tage bedürfen, zweier, wenn man inzwischen den Nährboden mit Condensationswasser befeuchtet. Worin liegt der Widerspruch begründet? Die wenigen Bacillen, die in alten Culturen ein kümmerliches Leben fristen, bedürfen vielleicht auf neuen Boden transplantirt zur Bildung einer mit blossen Auge erkennbaren Colonie längerer Zeit, alsein Convolut lebenskräftiger Bacillen, das in toto von der Nadel verpflanzt wird. Ich kann diese Ansicht nicht gelten lassen. Ihr zu Folge müsste eine viel geringere Zahl aufblühender Colonieen postulirt werden, als in That und Wahrheit gefunden werden, eingedenk der in jenen Präparaten höchst spärlichen, schlecht genug erhaltenen bacillären Formen. Eine allerdings höchst approximative Abschätzung der Colonieen dürfte viel eher der Anzahl jener Kügelchen (Fig. 8) entsprechen, die, als Sporen aufgefasst, eben zuerst zur Auskeimung einer längeren Zeit und einer stärkeren Irrigation bedürfen; einmal zu Bacillen ausgekeimt, vermehren sich diese nach dem viel rapideren Modus directer Theilung. Nur so ist es verständlich,

warum die Tochter-Cultur einer alten am 3. bis 4. Tage sich nicht wesentlich unterscheidet von einer Tochtercultur einer frischen am zweiten Tage, was Grösse und Anzahl der Colonieen anbetrifft.

Haben wir im Vorstehenden ein Urtheil über die Resistenz der fraglichen Kügelchen in feuchtem Zustande gewonnen, so fragen wir nun nach der Widerstandsfähigkeit derselben im trockenen, bekanntlich ein Verhalten, auf das die Würdigung der Sporen wesentlich abstellt. Die Beantwortung dieser Frage erhoffte ich von folgender Versuchsanordnung:

Den 10. August wird eine Rinderblutserum-Cultur vom 9. August (also 24 Stunden alt) untersucht: Blaue Kügelchen in ansehnlicher Menge.

Sterilisirte Seidenfäden werden im Condensationswasser und auf der bewachsenen Oberfläche hin- und hergewälzt, dann 24 Stunden getrocknet und von nun an täglich je einer auf frischen Nährboden (immer Blutserum) implantirt, und zwar stets unter Befeuchtung mit Condensationswasser. Am 11./VIII. Abends erste Implantation. Schon am 12./VIII. Morgens (nach 20 Stunden) sind die charakteristischen Schüppchen in Form eines Hofes um den Faden aufgeschossen; das heisst: sporenhaltige Bacillen ertragen die Austrocknung 24 Stunden lang.

2. Implantation 12./VIII. Abends 4 Uhr. Erkennbares Wachstum bis zum Morgen des 13./VIII.

3. Implantation 13./VIII. Abends 4 Uhr. Wachstum bis zum Morgen des 14./VIII.

Regelmässig fällt auf, dass am 3. Tage die Colonieen besonders üppig gedeihen, wenn am Tage zuvor für genügende Berieselung mit Condensationswasser gesorgt wurde. So wird tagtäglich eine Implantation vorgenommen bis und mit dem 20./VIII. Mit der Implantation vom 15./VIII. ändern sich die Wachstumsverhältnisse in soweit, als der nächstfolgende Tag noch keine deutlichen Colonieen bringt. Erst erneute Irrigation lässt am 2. Tage deutliche, aber immer noch spärliche Schüppchen aufschliessen. Nochmalige Berieselung an diesem Tage (17./VIII.) bewirkt ein über die ganze Serumfläche verbreitetes, dichtes Wachstum.

Es haben demnach die Fäden eine Austrocknung von  $5 \times 24$  Stunden unbeschadet ihrer Fortpflanzungsfähigkeit ertragen; das Wachstum aber ist verzögert, die aufblühenden Colonieen vermindert. Beruht dies auf einer Abschwächung der Lebensenergie der Bacillen durch die Eintrocknung? Möglich, aber nicht wahrscheinlich. Die befriedigendste Erklärung giebt wiederum die Ansicht, die oben schon auseinander gesetzt ist, es seien mit dem 5. Tage der Austrocknung alle Bacillen todt und nur die Sporen noch lebenskräftig; diese können es aber nicht fertig bringen, in 20 Stunden, wie bei den bisherigen Transplantationen, schon deutliche Colonieen zu bilden, weil sie dies auf einem viel mühsameren und lang-

wierigeren Weg bewerkstelligen müssen als die bisher transplantierten Bacillen, nicht auf dem Weg der üppigen directen Theilung, sondern auf dem langsamer Auskeimung. Kaum fertig gebildet, werden nun die jungen Bacillen durch erneute Berieselung verschleppt und verschwemmt und nun geht auf allen Punkten ein reges Wachsthum los, jetzt eben auf dem gedeihlichen Wege der Theilung.

Was für die Transplantation vom 15./VIII. galt, kann für diejenige vom 16./VIII. und 17./VIII. wiederholt werden. Die Colonieen der letzten sind nicht mehr so reichlich, dass sie nicht noch könnten gezählt werden. Vom 18./VIII. an — es sind noch drei Uebertragungen gemacht worden — bleiben die Röhrchen steril.

Was sagt der Versuch? Seine Antwort ist nicht so präzise und unzweideutig, wie ich von vornherein gehofft hatte. Bei der geringen Anzahl genau bekannter und biologisch erforschter Sporen ist man auf den Vergleich mit einem Prototyp angewiesen. Das sind und bleiben voraussichtlich noch lange die Sporen des Milzbrandes. Interpretiren wir unsern Versuch nach Analogie des Milzbrandes, so müssten wir annehmen, dass die Bacillen es sind, welche im ausgetrockneten Zustande soweit ein kümmerliches Leben noch fristen, dass sie, auf günstiges Nährmedium transplantiert und wiederum befeuchtet, jeder Zeit innerhalb einer Frist von drei Tagen wieder zur vollen Entfaltung ihrer Lebensthätigkeiten angefacht werden. Wie ich oben schon angedeutet, könnte die allmählich abnehmende Anzahl der Colonieen mit einem allmählichen Einschlafen der Wachstumsenergie in Zusammenhang gebracht werden. Aber ist denn dieses fortwährende Vergleichen mit den Verhältnissen des Milzbrandes eben nicht nur ein Nothbehelf, weil wir keine anderen ebenso gut studirten Paradigmata haben? Ist es nicht geradezu unbillig, an das zarte, hinfällige Wesen unseres Bacillus, der sich nur so schwer saprophytischem Wachsthum anbequemt, dieselben hochgehenden Anforderungen zu stellen, wie an einen der stärksten resistentesten Repräsentanten aller bisher bekannten Organismen? Ich möchte von vornherein Verwahrung dagegen einlegen, dass ich die Ansprüche an Sporen ad hoc herabsetzte und pro domo. Der Gedanke ist anderer Orts schon ausgesprochen. Mein Gewährsmann sagt:<sup>1</sup> „Die Resistenz der Typhussporen beweist von Neuem die Richtigkeit der Anschauungen von Hüppe, dass die Frage der Dauerformen nicht nach den aus der Resistenz der Milzbrandsporen gefolgerten Anschauungen beurtheilt werden darf, sondern nur nach den allgemeinen morphologischen und biologischen Merkmalen.“ Mag auch Manchem aus Hüppe's Worten der Versuch herausklingen, seine Dauersporen des

<sup>1</sup> Hüppe, *Tageblatt der 60. Naturforscherversammlung in Wiesbaden*. 1887. S. 276. — Man vergleiche damit Hüppe, *Die Formen der Bacterien*. S. 116.

Kommabacillus zu retten und zu stützen, die Billigkeit dieser Wendung wird Jeder zugeben müssen. Ich muss übrigens erwähnen, dass auch die unerbittlichste Analogie mit dem Milzbrand nicht einmal gegen, sondern eher für meine Vermuthungen spricht. Wenn meine Seidenfäden nach einer Austrocknungsdauer von  $7 \times 24$  Stunden noch fruchtbar sind, sporenfreie, direct dem Blute entnommene und an Seidenfäden angetrocknete Milzbrandbacillen dagegen die Vertrocknung nur  $6 \times 24$  Stunden aushalten, ist es dann wirklich auch nur im Geringsten wahrscheinlich, dass diese doch noch etwas grössere Resistenz der Xerosisfäden den Bacillen zu danken sei, deren Hinfälligkeit wir ja doch auf Schritt und Tritt kennen gelernt haben?

Am 20./VIII. wurden Deckglaspräparate aller Culturen vom 9. bis 20./VIII. angefertigt und alle übereinstimmend nach der Sporenreaction behandelt. Es konnte sich ja natürlich bei einer Vergleichung der Anzahl der Sporen um nicht viel mehr als approximative Schätzung handeln. Die Berechtigung einer solchen aber eingeräumt, hatte ich den Eindruck, dass die grösste Anzahl blauer Kügelchen am 2. bis 5. Tage des Wachstums angetroffen wird, dass sie von da an ganz allmählich etwas abnimmt, ein Umstand, der auch nicht direct gegen die Sporennatur dieser Dinge in's Feld zu führen ist. Wie sich ganz alte Culturen der Reaction gegenüber verhalten, ist oben mehrfach erwähnt. Es könnte nun vielleicht befremden, dass in so kurzer Zeit schon Sporen gebildet werden. Dabei möge man sich aber an die Eigenthümlichkeit des Xerose-Bacillus erinnern, dass seine Colonieen am 2. und 3. Tage die Akme ihrer Entwicklung erreicht haben, um von da an kaum sich weiter auszubreiten. Verschiedene der genannten Autoren haben ausdrücklich darauf hingewiesen.

Stimmt es nun nicht mit unseren an anderen Organismen gewonnenen Anschauungen überein, wenn die Sporenentwicklung in dem Moment beginnt, da der Nährboden erschöpft ist? Was bedeutet das Stehenbleiben der Entwicklung denn anderes als Erschöpfung des Nährbodens? Dass ein gewisser Bruchtheil der blauen Kügelchen im Laufe der Tage noch in Wegfall kommt, nicht die Reife fertiger ausgebildeter Sporen erlangt, ist an sich auch nicht so wunderbar. Man denke an Präparate sporenbildender Milzbrandbacillen: Wie ungleich an Grösse sind die rothen Kügelchen in den blauen Stäbchen. Wie gleichmässig dagegen sind Sporen in alten Agar- oder Kartoffelculturen, wo eben nur Sporen noch bleiben. Ist es denn nun wahrscheinlich, dass alle jene unfertigen kleineren Kügelchen schon so resistent sind wie alte ausgewachsene Sporen, oder dass überhaupt alle derselben einstmals das Stadium fertiger<sup>1</sup> Sporen

<sup>1</sup> Hüppe, a. a. O. S. 139: „Selbst eine beginnende Sporenbildung kann wieder rückgängig werden.“



erreichen? Doch wohl nicht! Gleich so lehrt ein Blick auf die Figg. 1 und 8, wie sehr viel gleichförmiger die Sporen der alten Cultur (Fig. 8) als der jungen (Fig. 1) sind. Viele der Bacillen mögen den Anlauf nehmen, Sporen zu bilden, nur ein Bruchtheil derselben wird wirklich diese Rolle der Fortpflanzung der Art bis zu Ende spielen.

Es musste nun selbstverständlich eine wünschenswerthe Ergänzung und eine Stütze für die Reaction sein, wenn es gelang, andere Species der Organismen zu finden, die sich ähnlich ihr gegenüber verhalten. Namentlich musste der positive Ausfall der Reaction bei einem Bacillus, bei dem mit einiger Zuverlässigkeit Sporen von anderer Seite schon beschrieben sind, meine Auffassung auf starke Füße stellen. Wie einleuchtet, ist die Aufgabe hier eine unabsehbare. Eine gewisse Einschränkung war daher geboten. Ich beginne mit einigen Beobachtungen, die mir gewissermaassen der Zufall in die Hände spielte. Bei der oben erwähnten Färbung (den 20./VIII.) aller Serienculturen vom 9. bis 20./VIII. zeigte sich die Cultur vom 13./VIII. durch eine eingeschleppte Sarcine verunreinigt, die leider nicht weiter gezüchtet worden ist, da das Interesse erst auf sie hingelenkt wurde, als sie nicht mehr existirte.

Diese Sarcine nun giebt die Reaction in schönster und exactester Weise und zwar so, dass in einem ovoiden Einzelindividuum je zwei, selten nur ein blaues Kügelchen getroffen werden. Die Verbindungslinie der beiden Körnchen fällt mit der Längsaxe der Ovals zusammen, oder anders ausgedrückt, die Kügelchen entsprechen etwa den beiden Brennpunkten der Ellipse (Fig. 4). Aus der Figur mag der Sarcine-Charakter nicht gerade deutlich hervorgehen, es ist aber ein merkwürdiges und constantes Verhalten, dass gerade diejenigen Ovale, welche die Reaction in prägnantester Weise zeigen, nicht in Tetraden- oder Packetform liegen, sondern, wie eben die Zeichnung lehrt, etwas aufgelockert, nur mit schwacher Andeutung der Viererform.

Complicirtere Bilder giebt ein Coccus, der sich auf Kartoffeln eingeschlichen hatte, auf welche Xeroseculturen des verschiedensten Alters ausgesät waren, in der Absicht, vielleicht doch ein Wachsthum auf diesem Nährboden bei Brüttemperatur zu erzwingen. Dies zwar gelang ebenso wenig als Gelatineculturen, es zeigte sich aber, dass der *Micrococcus* einige höchst beachtenswerthe Eigenschaften besitzt. Er wächst nicht auf Gelatine, bisher nur auf Kartoffeln im Brütschrank. Wenn seine weitere Beobachtung lehren sollte, dass es sich verlohnt, ihn weiter zu charakterisiren, so kann dies gelegentlich an anderem Orte geschehen. Hier interessirt uns nur sein Verhalten unserer Reaction gegenüber. Das Präparat wimmelt von Diplokokken, daneben tauchen aus der Menge einzelne grössere Individuen auf, von fast doppeltem Durchmesser wie die

kleinen.<sup>1</sup> In diesen sitzt nun ganz constant und zwar excentrisch ein dunkelblaues Korn (Fig. 7). Alle Diplokokken des Präparates aber bergen gewöhnlich je zwei blaue Kügelchen, je eines in einer Hemisphäre und zwar in einer so regelmässigen Anordnung, dass der leiseste Verdacht, es könnte sich um zufällig restirende Farbpartikelchen handeln, im Keim erstickt wird. Die ganz kleinen, einfachen Kokken, die aber numerisch den Diplokokken nachstehen, sind frei von Kügelchen. Die Grösse der Körnchen variirt nicht sehr bedeutend, steht aber innerhalb gewisser bescheidener Grenzen im geraden Verhältniss zur Grösse der beherbergenden Zelle, so dass die grossen einzelligen Wesen die grössten Körner, diejenigen Diplokokken aber, deren Theilungsäquator kaum erst angedeutet ist, die kleinsten Kügelchen enthalten. Die Diplokokken erinnern einigermaassen an die Sarcine (Fig. 4).

Von einer Reihe von Organismen, die ich auf die Reaction hin untersucht habe und zwar mit negativem Resultat, will ich nennen:

Micrococcus tetragenus (Gaffky), (Kartoffelcultur am 5. Tage),  
 Bacillus megatherium (du Bary),  
 Bacillus mycoides,  
 Bacillus pneumoniae (Friedländer),  
 Saccharomyces glutinis,  
 Bacillus pyocyaneus  $\alpha$ ,  
 Bacillus pyocyaneus  $\beta$ .<sup>2</sup>

Ein dem fluorescirenden ähnlicher Bacillus, der in einem azootischen Sperma, das dem Arzt zur Untersuchung zugeschickt worden, ganz rapid eine grelle grasgrüne Farbe erzeugt hatte.<sup>3</sup> Ferner:

Bacillus anthracis (alle genannten auf Kartoffeln am 2. Tage).

Freilich müsste nun durch Variation der Lebensbedingungen all' diesen Bacillen Gelegenheit zur Sporenbildung gegeben werden, was ich bisher nicht in dem gewünschten Maasse bewerkstelligen konnte, so dass denn auch diese negativen Resultate recht wenig besagen.

Ganz prachtvoll aber gelang die Reaction bei Bacillus cyanogenus (dem Erzeuger der blauen Milch) (Fig. 9). In mehr als einer Hinsicht ist dieser Fund interessant und dazu angethan, die Sporennatur der fraglichen blauen Dinge wahrscheinlicher zu machen. Nach der morphologischen Seite allein beurtheilt, ist das Bild (Fig. 9) bestechend. Die geringen Unterschiede in der Grösse der Körnchen sprechen nicht dagegen; das

<sup>1</sup> Es handelt sich natürlich um Reinculturen.

<sup>2</sup> Vgl. *diese Zeitschrift*. Bd. II. Hft. 2.

<sup>3</sup> Von Professor Schultze mir zur bacteriologischen Prüfung angeboten.

wird Jeder zugeben, der in früheren Stadien der Sporenbildung Milzbrandbacillen nach der Neisser'schen Methode gefärbt hat. Sehr zu Statten kam die Gelegenheit, einen positiven Ausfall der Reaction bei einem Organismus aufzufinden, bei dem Sporenbildung, mit etwelcher Sicherheit beobachtet ist, wenn auch eine Doppelfärbung bis anhin nicht gelungen ist. Es war so die Möglichkeit gegeben, jene Angaben mit unseren Bildern auf Schritt und Tritt zu vergleichen. Nach Flügge<sup>1</sup> sind die Sporen endständig, so dass sie im Verein mit dem Bacillus hie und da Keulenform darstellen. Solche Formen wird man auch in unserer Fig. 9 nicht vermissen. Dann fehlt es nicht an Stäbchen mit je zwei endständigen Kügelchen. Weiterhin sind da und dort blaue Kügelchen, selten mehr als je eines, höchstens zwei eingelagert in lange blasse Fäden, die etwas weniger als die kürzeren Elemente von der contrastirenden Farbe in sich aufgenommen haben. Nach Hüppe<sup>2</sup> sind Spirillen und Spirochäten für Komma- und Vibrioformen einerseits, lange Fäden für echte Bacillen andererseits „als eine Art von Ruheform aufzufassen, die sich bei partieller Erschöpfung des Nährbodens bilden.“ Sporenbildung und Auftreten langer Fäden fallen daher der Natur der Sache nach in dieselbe Entwicklungsphase. Ich betone diese Coincidenz und möchte daran erinnern, wie sehr schnell und üppig der Bacillus cyanogenus auf der Kartoffel<sup>3</sup> wächst und zwar namentlich in der Fläche mit rapider Inanspruchnahme des ganzen Nährareals. Den anderen genannten Organismen gegenüber nimmt er darin eine Sonderstellung ein, daher es nicht befremden kann, dass bei der kurzen Dauer von 2 × 24 Stunden schon Erscheinungen auftreten, die man eben bei Erschöpfung des Nährbodens zu sehen gewohnt ist. Die Berücksichtigung dieser Verhältnisse wird wohl, wie oben schon angedeutet, der Analogien noch mehr erschliessen. Für den Abschluss dieser Arbeit schien es mir genügend, deren, wenn auch wenige, so doch nachdrückliche aufführen zu können.

Auf einen weiteren dunkeln Punkt scheint mir durch das Verhalten des Bacillus cyanogenus mehr Licht zu fallen. Die Figg. 4 und 7 mussten bei Betrachtung der bipolaren Anordnung der Körnchen in den ovoiden Zellen, namentlich aber durch die Coincidenz des Auftretens der

<sup>1</sup> *Die Mikroorganismen.* 2. Aufl. S. 292.

<sup>2</sup> *Fortschritte der Medicin.* 1885. Nr. 19. S. 623.

<sup>3</sup> Es dürfte nicht zufällig sein, dass Gelatineculturen des Bacillus cyanogenus von dem Alter weniger Tage sich gegen die Reaction negativ verhalten; dass dagegen bei Zimmertemperatur gehalten, in steriler Milch gezüchtet, der Bacillus Formen aufweist, die in schönster, tadellosester Weise die blauen Kügelchen zeigen. Nach Flügge (a. a. O. S. 292) sind letztere Momente die Bedingungen der Sporenbildung!

Kügelchen mit Theilungserscheinungen (Diplokokkenformen) zu der Vermuthung führen, es möchten die Körnchen Vorboten des Theilungsprocesses sein. Damit ist nun freilich auch nicht viel gesagt und es müsste noch des Weiteren erörtert werden, ob man sich darunter Analoga der Zellkerne,<sup>1</sup> deren Theilungsphasen der Theilung des Zelleibes vorausgehen, zu denken habe, oder ob es Protoplasmaverdichtungen sind, die ähnlich den Krystallisationscentren, die Zweitheilung einleiten, dadurch, dass ein jedes Protoplasma um sich herum anzieht. Angenommen, es wären Verdichtungscentren des Protoplasmas, so haben wir uns damit die Hände nicht gebunden und können immer noch die Körnchen der Diplokokken (Fig. 7) als Theilungserscheinungen auffassen, ohne darum andererseits den Gedanken an die Sporennatur aufgeben zu müssen. Denn was ist die endogene und wohl auch die „arthrogene“ Spore denn anders als ein verdichtetes Protoplasmaklumpchen.<sup>2</sup> Seit Dyrmont<sup>3</sup> bei Nencki nachgewiesen hat, dass der Fettgehalt von Sporen und Fäden nur wenig, der Eiweissgehalt aber beträchtlich und zwar zu Gunsten der ersteren differirt, ist man ja nun über diese Auffassung einig und hat Cohn's ursprüngliche Ansicht von der Fettnatur der Spore fallen gelassen, eine Anschauung, die in der glänzenden Beschaffenheit, dem starken Lichtbrechungsvermögen und der Resistenz gegen hohe Hitzegrade begründet schien.<sup>4</sup>

Welcher Deutung sind nun aber die grösseren blauen Körner in den grossen Einzelzellen der Fig. 7 fähig? Ich habe es oben absichtlich vermieden, mich in Speculationen über einen Fortpflanzungsmodus der Mikrokokken zu verwickeln. Auf so spärliche Erfahrungen baut man keine Hypothese. Aber ein Fingerzeig mag in dem Dunkel, das die Fortpflanzung der Mikrokokken verhüllt, doch wohl gestattet sein. Ist es nicht denkbar, dass die grossen Einzelzellen die Rolle von Dauerformen spielen, eine Auffassung, die einerseits mit dem positiven Ausfall meiner Reaction, wenn man ihr schon eine gewisse Beweiskraft per analogiam einräumen

<sup>1</sup> Etwa ähnlich, wie Klebs die chromatophilen Körner vieler Bacillen mit den Mikrosomen der Zellkerne in Parallele setzt. Vergl. *Allgemeine Pathologie*. Bd. I. S. 76 Anmerkung.

<sup>2</sup> Hüppe, a. a. O. S. 130: Die Bildung der Arthrosporen, die meist deutliche Zunahme der Lichtbrechung deuten darauf hin, dass eine Contraction des Protoplasma wahrscheinlich mit im Spiele ist.

<sup>3</sup> *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. Bd. XXI. S. 309.

<sup>4</sup> Auch Koch hatte früher (*Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 1876. Bd. II. Hft. 2. S. 289) noch angenommen, dass die Spore aus einem Oel bestehe, welches von einer dünnen Protoplasmaschicht eingehüllt ist. Letztere sei die eigentliche entwicklungsfähige Zellsubstanz, während ersteres vielleicht einen bei der Keimung zu verbrauchenden Reservestoff bilde.

will, andererseits mit manchen Angaben und Muthmaassungen der Literatur übereinstimmt, denen zu Folge bei den Mikrokokken eine Summe auserwählter, grösser wachsender, stärker glänzender Individuen mit der Erhaltung der Art betraut werden.<sup>1</sup>

Wenn nun oben für die Diplokokken die Frage offen gelassen werden musste, ob die blauen Wesen nicht auch bei gewissen Phasen der Theilung eine Function zu übernehmen haben, so glaube ich dies wenigstens für den *Bacillus cyanogenus* des Entschiedensten in Abrede stellen zu müssen. Nach 48 stündigem Wachsthum auf Kartoffeln haben wir in Theilung begriffener Formen genug, aber, wie die Fig. 9 lehrt, keine einzige mit blauen Kügelchen combinirt. Die kurzen Doppelstäbchen sind nur durch eine etwas intensivere Färbung an den beiden Enden, den distalen und den proximalen, ausgezeichnet. Zudem hat der stärker tingirte endständige Bacillenbezirk nicht Kreisform, sondern die Gestalt eines Meniscus<sup>2</sup> und zwar mit der Concavität der Bacillenmitte zugekehrt. Beim *Bacillus cyanogenus* hat der positive Ausfall der Reaction sicherlich nichts mit Theilungsvorgängen zu thun.

Obwohl ich mich nun selbstverständlich zu Ehrlich's<sup>3</sup> Ansicht bekenne, „dass die blosse Farbenmischung und tinctoriale Receptirkunde, wie sie früher geübt wurde, weder dem jetzigen Stande unserer Wissenschaft entspricht, noch auch für deren Weiterbildung erspriesslich ist“, und ferner, „dass eine neue Methode fortab nur Werth hat, wenn sie, wie die Weigert'sche Färbung des Centralnervensystemes, mit einer wissenschaftlichen Durchführung und Ergründung Hand in Hand geht“, obwohl ich dies Postulat vollauf würdige, muss ich leider darauf verzichten, ihm zu genügen. Die Färbeversuche, die ich in dieser Hinsicht unternahm, haben den Boden noch nicht so vorbereitet, dass darauf eine Hypothese gebaut werden könnte. Ich habe oben in einer Anmerkung angedeutet, weshalb das Verständniss dieser Reaction besonders erschwert ist. Ich verweise daher die Frage an eine höhere chemische Instanz.

Sollte die vorliegende Arbeit aber den Anstoss geben, dass da und dort die neu empfohlene Reaction in den Kreis bacteriologischer Untersuchungsmethoden aufgenommen würde, so hat sie ihren Zweck erreicht. Nur so ist es möglich, dass in kurzer Zeit ein kritisches Beobachtungsmaterial entstehe, das ein besseres Fundament für eine neue Sache ist, als noch so viele Argumente eines Einzelnen, denen leider nur zu leicht

<sup>1</sup> Salomonsen, *Botanische Zeitung*. 1876. S. 620. Nach den heutigen Kenntnissen ist diese Fructification wohl als eine Art der Arthrosporenbildung aufzufassen.

<sup>2</sup> In der Projection auf die Ebene gedacht.

<sup>3</sup> Ehrlich, Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. *Charité - Annalen*. XI. Jahrgang.

das individuelle Unzulängliche anhaftet. Diese Erwägung hat mich zu einem etwas früheren Abschluss dieser Untersuchungsreihe bewogen.

Bewährt sich die angeführte Methode der Sporenfärbung, vielleicht auch für eine grössere Summe von Mikrokokken, so wäre die Hoffnung, die Hüppe<sup>1</sup> ausspricht, der Erfüllung nahe. Der Nachweis endogener Sporen in Kokken würde die Kluft zwischen endogenen und arthrosporen Bakterien überbrücken.

Hat die Reaction eine allgemeinere Bedeutung — und ich werde nicht ermangeln, sie fernerhin nach allen Seiten zu prüfen — so sind die Consequenzen nicht abzusehen. Für einmal kam es mir nur darauf an, den Beweis zu führen, dass sie für die biologischen Fragen des *Bacillus xerosis* nicht ohne Belang ist.

Heidelberg, 26. November 1887.

---

<sup>1</sup> Hüppe, *Formen der Bakterien*. S. 139.

---

## Erklärung der Abbildungen.

---

### Tafel I.

- Fig. 1.** Cultur vom 17./VIII.; übergeimpft den 1./XI.; untersucht am 4./XI.  
**Fig. 2.** 24 Stunden alte Cultur (9. bis 10./VIII).  
**Fig. 3.** Cultur auf Hydrocelenserum (2. 24 Stunden alt).  
**Fig. 4.** Sarcine (zufällige Verunreinigung der Cultur vom 13./VIII).  
**Fig. 5.** Dasselbe Ausstreichpräparat wie Fig. 1 (mit wässr. Fuchsinlös. gefärbt).  
**Fig. 6.** Dasselbe Ausstreichpräparat wie Fig. 1 u. 5 (bei langsamem Zufließen der Fuchsinlösung vom Rande des Deckgläschens her. Stelle der Grenzzone, wo eben Fuchsin noch schwach nachfärbt).  
**Fig. 7.** Coccus (auf Kartoffeln als zufällige Verunreinigung gewachsen).  
**Fig. 8.** Cultur vom 12./VIII. nach 88 Tagen untersucht.  
**Fig. 9.** *Bacillus cyanogenus*, 48 Stunden auf Kartoffeln gewachsen im Brüt-schrank.
-

Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

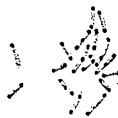


Fig. 4.

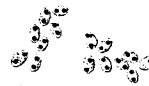


Fig. 5.



Fig. 6.

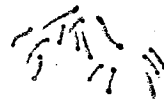


Fig. 9.



Fig. 7.



Fig. 8.

