

[Aus dem Laboratorium der II. medicinischen Klinik zu Neapel.]
(Director: Prof. Cardarelli.)

Ueber das Wachsthum der Influenzabacillen auf hämoglobinfreien Nährböden.

Von

Dr. Arnold Cantani jun.,
Preparator.

In einer früheren Mittheilung¹ wurde von mir auf die Möglichkeit mehrfach hingewiesen, die Influenzabacillen auch auf hämoglobinfreien Nährböden züchten zu können. Es war mir schon damals thatsächlich gelungen, üppige Influenzaculturen auf Agar zu gewinnen, der mit reinem Thiersperma bestrichen worden war; da irgend eine Beimischung des Spermas mit Blut in meinen Versuchen ganz auszuschliessen war, galt nun dieser Befund schon als eine sicher bewiesene Thatsache.

Bei den oben citirten Experimenten wurde aber auch über einige Versuche berichtet, die mit anderen thierischen Flüssigkeiten angestellt worden waren. Es gelang mir schon damals die Züchtung der Influenzabacillen auch in Bouillon, der eine kleine Menge von Ascitesserum zugesetzt worden war. Dieser Befund wurde später auch von Elmassian² und Rosenthal³ ganz unabhängig von meinen Experimenten, die ihnen nicht bekannt waren, bestätigt.

Es blieb aber noch übrig, die interessante Frage zu entscheiden, welchen gemeinschaftlichen Bestandtheilen des Blutes, des Spermas und

¹ Zur Verwendung des Sperma als Nährbodenzusatz. *Centralblatt f. Bakteriologie*. Bd. XXII.

² *Annales de l'Institut Pasteur*. 1899.

³ *Société de biologie*. 17. März 1900.

auch des Serums die Eigenschaft zukam, das Wachsthum der Influenzabacillen zu befördern; und da die von mir mit nucleïn- und lecithinhaltigen Nährböden angestellten Versuche alle negativ ausfielen, glaubte ich damals als höchst wahrscheinlich, dass die wachsthumsfördernde Eigenschaft von einem Albuminkörper abhängig sei, der im Blute und im Sperma enthalten ist.

Ich hielt es nun als nicht uninteressant, dieses Studium noch weiter fortzusetzen; vor Allem wollte ich mich überzeugen, ob noch andere thierische und ev. menschliche Flüssigkeiten dieselben Eigenschaften besitzen betreffs des Wachstums der Influenzabacillen; in einer weiteren Experimentenreihe wurde von mir mit verschiedenen Substanzen versucht, die als Hauptbestandtheile der betreffenden Flüssigkeiten anzusehen waren.

Und da es mir endlich ganz zufälliger Weise gelang, als Nährböden für die Influenzabacillen auch einige Bakterien selbst zu verwenden, die, dem Agar zugesetzt, ein ziemlich üppiges Wachsthum der Influenzabacillen gestatteten, wurden von mir auch in dieser Richtung zahlreiche Experimente angestellt, von denen einige mir manche interessante Resultate über die Biologie der Influenzabacillen ergaben.

Im Folgenden wird nun so kurz als möglich über alle Experimente berichtet, die ich angestellt habe.

Ich verwendete bei meinen Versuchen zuerst Blutserum, welches auch spektroskopisch keine Spur von Hämoglobin enthielt, ferner verschiedene an Albumin reiche Transudate, die ebenfalls nicht bluthaltig waren.

Diese Flüssigkeiten wurden den üblichen Nährböden in verschiedenen Mengen hinzugefügt, oft in ganz steriler Weise. Wenn die Sterilisirung nicht zu vermeiden war, versuchte ich, sie bei nicht zu hoher Temperatur (70°) wiederholt auszuführen.

Die Culturen, die ich für meine Experimente brauchte, stammten aus drei typisch verlaufenen Influenzafällen und waren vor dem Gebrauch öfters auf ihre charakteristischen Eigenschaften geprüft. Sie waren alle auf Blutagar nach Voges cultivirt; da nach dieser Methode das Blut mit dem verflüssigten Agar direct vermischt wird, so ist bei den Abimpfungen auf anderen nicht bluthaltigen Nährmedien jede Transportirung von Blutspuren ausgeschlossen.

In reinem menschlichen Blutserum wuchsen die Influenzabacillen sehr spärlich; wenn man aber nach der Wertheim'schen Methode etwas Serum der gewöhnlichen Peptonbouillon zusetzte, fiel die Impfung von Influenza in diesen Röhrchen positiv aus. Schon nach 24 Stunden bemerkte man, dass die Bouillon etwas trübe geworden war, mit ganz kleinen Flöckchen

auf den Wandungen und auf dem Grunde des Röhrchens, die mikroskopisch und culturell aus Influenzabacillen zu bestehen sich erwiesen. Das Wachsthum der Stäbchen, welches nach 24 Stunden ein nicht sehr üppiges war, erreichte bis zum dritten Tage seinen Höhepunkt, um dann stationär zu bleiben. Zu dieser Zeit war die Trübung der Bouillon eine ziemlich intensive; es liess sich aber immer eine prägnante Flöckchenbildung bemerken, welche als eine Agglutinationserscheinung des in ziemlich grosser Menge der Bouillon zugesetzten Serums ($\frac{1}{3}$ Serum — $\frac{2}{3}$ Bouillon) aufzufassen ist. Menschliches wie thierisches Normalserum besitzt in der That, wie aus einigen von mir angestellten Experimenten hervorgeht,¹ ein ziemlich hohes Agglutinationsvermögen den Influenzabacillen gegenüber.

Wenn man aber in denselben Verhältnissen das Serum mit dem Agar vermischte, waren die Resultate viel weniger ausgesprochen, als mit der Serumbouillon. Die Influenzabacillen wuchsen auf dem Serumagar sehr spärlich; oft waren die ganz kleinen Colonieen nach 48 Stunden kaum zu sehen, oft blieben die Abimpfungen ganz steril.

Mit Ascitesflüssigkeit waren die Verhältnisse dieselben; bei Zusatz der Ascitesflüssigkeit zur Bouillon waren die Resultate positiv; bei Zusatz zum Agar dagegen blieben die Röhrchen fast immer steril.

Mit dieser Ascitesflüssigkeit wurde von mir ein Nährboden nach der Wassermann'schen Angabe mit Nutrosezusatz hergestellt; es gelang mir ziemlich gut, eine beim Sieden nicht gerinnbare Flüssigkeit zu bereiten; einerseits blieb aber der Nährboden ziemlich trübe; die Influenzabacillen wuchsen andererseits gar nicht auf diesem so bereiteten Material.

Durch fortdauernde Erhitzung während zwei Tagen bei 65° gelang es mir, das Ascitesserum zu einer gallertartigen Flüssigkeit² zu concentriren, die bei der Hitze gar nicht mehr gerann. Dieses eingedampfte Serum konnte der Bouillon und dem Agar in beliebiger Menge zugesetzt werden, die Influenza kam aber darauf gar nicht fort.

Auf koagulirtem Kuhserum fielen die Züchtungsversuche fast immer negativ aus.

Ich ging nun zu anderen eiweisshaltigen und eiweissfreien thierischen Flüssigkeiten über; Milch erwies sich als ungeeignet, ebenfalls stark albuminreicher Urin. Die Beimischung von bei 100° sterilisirtem Ei zu dem Agar blieb auch ohne Erfolg für das Wachsthum der Influenzastäbchen.

Endlich wurde von mir auch ein Zusatz von Galle experimentirt; Meerschweinchen- und Kaninchengalle beförderte in keiner Weise das

¹ *Riforma medica*. 1900. Nr. 80—82.

² *Ebenda*. 1899. Nr. 68—70.

Wachsthum der Influenzabacillen, wenn sie dem einfachen Agar zugesetzt wurde; mit menschlicher Galle dagegen erreichte ich ein sehr gutes Wachsthum auf Agar. Die von mir gebrauchte Galle stammte aus einem an Aneurisma plötzlich gestorbenen Manne; sie hatte eine schöne grüne Farbe, war aber etwas zäher und dicker als normal; bei einer näheren Untersuchung erwies sie sich als stark mucinhaltig, aber eiweissfrei.

Auf Gallenagar bildeten die Influenzacoloneen einen ganz zarten Rasen von confluirenden, grünschimmernden Tröpfchen. Die mikroskopische Untersuchung von diesen Coloneen war höchst interessant, die Bacillen hatten auf diesem Nährboden ganz und gar ihre Form eingebüsst; sie waren wie aufgebläht, sahen alle dicker und länger aus, hie und da hatten einige die Form von grossen Kokken angenommen; es waren zahlreiche Filamente zu sehen, einige Bacillen waren auch auf einer Seite gekrümmt. Ich hatte in der That die echte Form der von Pfeiffer beschriebenen Pseudoinfluenzabacillen vor mir.

Anfangs zweifelte ich, dass es sich um echte Influenzabacillen handeln konnte; durch weitere Züchtungsversuche auf normalem und auf Blutagar konnte ich aber jeden Zweifel ausschliessen, dass es sich nicht um echte Influenzabacillen handelte. Es gelang mir übrigens, an verschiedenen Stämmen von Influenza dieselben Erscheinungen zu beobachten; es genügte oft, einen Tropfen dieser zähen, klebrigen Menschengalle auch dem gewöhnlichen Blutagar zuzusetzen, um dieselben degenerativen Formen der Influenzabacillen hervorzurufen; bei wiederholten Abimpfungen von diesen Culturen auf normalen Blutagar nahmen die Stäbchen wieder ihre alte Form an.

Ueber die Bedeutung von diesem Befunde bei der Frage der Pseudoinfluenzabacillen wurde von mir schon in einer anderen Arbeit¹ mehrfach hingewiesen. Dieselben degenerativen Formen sind mir übrigens öfters vorgekommen, wenn ich Influenzabacillen auf ungeeigneten Nährböden oder bei ungünstigen Verhältnissen (hohe Temperatur) züchtete. Ich glaube deshalb, dass die von Pfeiffer als Pseudoinfluenza beschriebenen Bacillen mit den echten ganz und gar identisch sind, was übrigens auch von anderen Autoren (Pielicke, Lindenthal, Grassberger) betont wird.

Ausser dem Sperma kann man aus dem Vorstehenden ersehen, dass es andere Substanzen giebt, auf welchen sich die Influenzabacillen mehr oder weniger üppig entwickeln können, ohne dass die Gegenwart von Hämoglobin im Mindesten nöthig sei, nämlich: Blutserum, Ascitesserum, Menschengalle.

¹ *Riforma medica*. 1900. Nr. 80—82.

In einer zweiten Versuchsreihe fügte ich nun den gewöhnlichen Nährböden Substanzen hinzu, die vermuthlich als die Hauptbestandtheile der angewendeten organischen Flüssigkeiten anzusehen waren. Ich benutzte Eiweisskörper der verschiedensten Gruppen, die theilweise von mir selbst bereitet, theilweise von der Firma Merk direct bezogen wurden, und nämlich Eialbumin, Eidotter, Serumalbumin, Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Hämatin Nencki, Globulin aus Blutfibrin, Serumglobulin, Cholestearin, Mucin aus Galle, Protein und ferner Protalbumose, Disalbumose, Deuteralbumose, Hämalbumose, Protagon.

Es wurden in der Regel 10^{cgrm} von je einer von diesen Substanzen einem verflüssigten Agarröhrchen beigemischt; die Sterilisirung wurde in der Mehrzahl der Fälle dadurch bewirkt, dass die Röhrchen während einigen Minuten auf dem Bunsenbrenner erhitzt wurden; die discontinuirliche Sterilisirung erwies sich als unpraktisch. Oft war die Vertheilung der Substanz im flüssigen Agar eine recht schwierige; ich achtete aber viel darauf, die Agarröhrchen nur dann rasch erstarren zu lassen, wenn die Vertheilung der Substanz annähernd gleichmässig war. Nebenbei wurden immer zahlreiche Controlröhrchen mit normalem Agar geimpft. Tabelle I erlaubt eine rasche und genaue Orientirung über die Resultate.

Tabelle I.

S u b s t a n z	Wachsthum	S u b s t a n z	Wachsthum
1. Eialbumin coagulirt .	+	12. Cholestearin	++
2. desgl. mit Agar gemischt	0	13. Mucin aus Galle . .	+++
3. desgl. auf Agar gestr. .	+	14. Protein	0
4. Eidotter coagulirt . .	+	15. Protalbumose	++
5. desgl. mit Agar gemischt	+	16. Emalbumose	++
6. Serumalbumin	+++	17. Deuteralbumose . . .	0
7. Hämoglobin	++++	18. Disalbumose	++
8. Oxyhämoglobin	+++++	19. Protagon	++
9. Globulin aus Blut . .	++++	20. Nutrose	0
10. desgl. aus Serum . .	+++	21. Somatose	0
11. Hämatin	0		

Wo keine nähere Angabe ist, versteht sich, dass die Substanz mit Agar in der vorher beschriebenen Weise gemischt ist.

Das Optimum des Wachstums wird durch das Zeichen + + + + + ausgedrückt.

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, üben die verschiedenen Albuminkörper einen ziemlich günstigen Einfluss auf das Wachsthum der Influenzabacillen aus. Schon auf reinem coagulirten Eialbumin war in meinen

Experimenten ein spärliches Wachsthum zu bemerken; Eidotter erwies sich, mit Agar gemischt, als wenig begünstigend (Capaldi,¹ Nastiu-koff²); auch im coagulirten Zustande konnte man etwas Wachsthum wahrnehmen, indem man auf der Oberfläche der in einer Petrischale coagulirten Substanz einen ganz zarten Rasen von Bacillen bemerken konnte. Auf Serumalbumin war das Wachsthum dagegen viel deutlicher; das reine Hämoglobin und das Oxyhämoglobin besonders gaben, wie natürlich, die besten Resultate. Die Experimente, die ich aber mit den einzelnen Bestandtheilen des Hämoglobins, Hämatins und Globulins anstellte, bewiesen, dass das Hämatin sich vollständig gleichgültig verhielt, das Globulin dagegen das Wachsthum der Influenzabacillen erheblich förderte. Man kann darum mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass das Globulin die active Substanz im Hämoglobin sei, die das Wachsthum der Influenzabacillen bewirkt; wir können uns das positive Wachsthum der Influenzabacillen im Serum und im Sperma dadurch erklären, dass auch in diesen letzten Flüssigkeiten Globulin enthalten ist. Ferner gebühren auch dem Serumalbumin wachsthumsfördernde Eigenschaften.

Ausser dem Globulin und dem Serumalbumin können noch andere Substanzen, wie aus Tabelle I ersichtlich, das Wachsthum der Influenzabacillen bewirken; auch in cholestearinhaltigem Agar bemerkte man in der That ein spärliches Wachsthum der Influenzakeime. Mit Mucin, welches aus der Galle stammte, wurden weitere Experimente angestellt und alle mit positivem Resultate; es war uns so die Möglichkeit gegeben, die wachsthumsfördernde Eigenschaft der Galle erklären zu können; da die auf mucinhaltigen Nährböden gezüchteten Bacillen keine degenerativen Formen erblicken lassen, ist diese Erscheinung mit grosser Wahrscheinlichkeit den in der Galle sich findenden Glykochol- und Taurocholsäuren zuzuschreiben.

Ferner besitzen auch Protalbumose, Disalbumose, Hämalbumose wachsthumsfördernde Eigenschaften.

Von dem positiven Ausfallen dieser letzten Experimente ermuthigt, versuchte ich, durch künstliche Digestion aus dem Blute selbst einen Nährboden zu gewinnen, der sich durch seine Uncoagulirbarkeit praktisch gut verwenden liess. Eine ziemlich grosse Menge Blut wurde daher bei Zusatz von Pepsin und Salzsäure einige Tage im Brutschranke gehalten, nachher filtrirt, schwach alkalisch gemacht, einige Minuten gekocht und wieder abfiltrirt. Ich erhielt eine goldgelbe, transparente Flüssigkeit, welche beim Kochen nicht mehr gerann und eine sehr schöne Biuret-

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XX. Nr. 22-23.

² *Ebenda*. Bd. XXI. S. 474.

reaction ergab. Bei Zusatz einer kleinen Menge von dieser Flüssigkeit blieb der Agar oder die Bouillon auch beim Kochen vollkommen klar; das Wachstum der Influenzakeime auf diesem so hergestellten Nährboden war ein ausgezeichnetes. Praktisch liess sich aber dieses Material gar nicht verwerthen, denn schon bei Aufbewahrung nach einigen Tagen verlor es ganz und gar die Eigenschaft, das Wachstum der Influenzabacillen zu begünstigen.

Bakteriennährböden.

Ueber die Möglichkeit, durch die gleichzeitige Impfung von verschiedenen Bakterien auf demselben Nährboden das Wachstum des einen auf Kosten des anderen Mikroorganismus zu begünstigen, wird, so viel ich weiss, von wenigen Autoren berichtet.

So hat Buchner¹ gefunden, dass der Cholera-vibrio in einer sterilisirten Nährlösung, welche bereits als Nährbodensubstrat für Cholera gedient hat, ein ganz besonders üppiges Wachstum zeigte; eine ähnliche Begünstigung des Wachstums will auch Salkowski² bei Wasserbakterien beobachtet haben. Der Saccharomyces der Ingwerbierhefe gährt nach Ward³ in Symbiose mit einem anaëroben „Bacterium vermicosum“ viel kräftiger. Turrò⁴ will ferner gefunden haben, dass Streptokokken ganz besonders üppig in nicht sterilisirten lebenden Cholera- und Pyocyaneus-, sowie in Milzbrandculturen wachsen. Von anderen Autoren (Roux und Yersin,⁵ Schneider⁶ u. s. w.) wurde eine Begünstigung des Wachstums von Diphtheriebacillen bei Anwesenheit von Streptokokken im selben Nährboden bemerkt. Endlich seien noch die Studien von Grassberger⁷ citirt, der bei der Isolirung von Influenza aus Sputa auf Blutagarplatten ein üppigeres Wachstum der Influenzakeime in der Nähe von Staphylococcuscolonieen bemerkte.

In allen den bisher citirten Experimenten handelte es sich einfach um eine Begünstigung des einen oder des anderen Bakteriums durch gleichzeitige Impfung von anderen Mikroorganismen; einen Nährboden aber zu fabriciren, der ausschliesslich durch Bakterienzusatz das Wachstum von einem Mikroorganismus befördert, der sonst auf ihm gar

¹ Ref. in Flüge, *Die Mikroorganismen*. Bd. I. S. 140.

² *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften*. 1892. S. 305.

³ Ref. in Flüge, *Die Mikroorganismen*.

⁴ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XVII. S. 868.

⁵ *Annales de l'Institut Pasteur*. T. IV.

⁶ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XII. S. 290.

⁷ *Diese Zeitschrift*. Bd. XXV. S. 453.

nicht fortkommen würde, wurde aber von keinem der erstgenannten Autoren versucht.

Sehr schöne und beweiskräftige Experimente wurden in dieser Richtung, so viel ich weiss, nur von Frosch¹ angestellt, der bei der Frage der Reinzüchtung der Amöben als eine ausschliessliche Bedingung für ihr Fortkommen auf gewöhnlichem Agar die Gegenwart von anderen Bakterien als nöthig bewies. Die Amöben kamen in der That auf gewöhnlichem Agar gar nicht fort, wenn sie nicht mit anderen Bakterien vergesellschaftet waren; nicht alle Bakterien erwiesen sich im selben Maasse wachstumsfördernd; eine Bakterienart wurde von den Amöben ganz deutlich bevorzugt. Nach Frosch's Versuchen ist das Amöbenwachsthum nicht vom Stoffwechselprodukte der Bakterien oder von irgend einer Modificirung des Nährbodens, sondern von den in den Bakterienleibern enthaltenen Stoffen selbst abhängig; dem erstgenannten Autor ist es aber nicht gelungen, mit sterilisirtem Bakterienzusatz einen für die Amöben günstigen Nährboden zu fabriciren.

Bei meinen Versuchen über Influenzanährböden wurden nun von mir auch einige Experimente in dieser Richtung angestellt. Man konnte in der That mit keinem anderen Mikroben den begünstigenden Einfluss von anderen Bakterien als Nährbodenzusatz so gut studiren, wie mit den Influenzabacillen, welche auf einfachem Agar gar nicht fortkommen.

Zu dieser Idee kam ich übrigens ganz zufälliger Weise; ich beschäftigte mich damals gerade mit Gonokokkennährböden und hatte gefunden, dass diese Bakterien auf einer Mischung von Blut und Glycerin ($\frac{1}{3}$ Blut, $\frac{2}{3}$ Glycerin; davon wurden einige Tropfen dem Agar oder der Bouillon zugesetzt) sehr gut gedeihen.² Da ich auf diesem so hergestellten Nährboden auch die Züchtung von Influenzabacillen versuchen wollte, impfte ich einige von diesen Agarröhrchen mit Influenza, dieses Mal aber mit ganz negativem Resultate. Ich bewahrte nun diese steril gebliebene Röhrchen 6 bis 7 Tage und benutzte sie zum zweiten Mal zur Abimpfung einer Gonokokkencultur. Nach 24 Stunden bemerkte ich ein sehr üppiges Wachsthum darauf; zu meinem Erstaunen aber hatten sich statt der Gonokokken die Influenzabacillen darauf entwickelt, die ich vor einer Woche besät hatte; von den Gonokokken waren mikroskopisch nur noch einige seltene isolirte Glieder hier und da, zwischen ungeheuer dichten Haufen von Influenzabacillen nachzuweisen. Die Abimpfung von dieser Influenzacultur auf einfachem Agar fiel negativ aus, auf demselben Blutglycerin-nährboden aber ohne Gonokokkenzusatz waren wie früher die Abimpfungen von Influenza erfolglos.

¹ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXI. S. 926.

² *Contributo allo studio del Gonococco*. *Riforma medica*. 1899. p. 68—70.

Dieselben Versuche wurden von mir dann auch auf einfachem Agar und mit fast gleichen Resultaten wiederholt; wenn man die Agarröhrchen gleichzeitig mit Gonokokken in ziemlich grosser Menge und Influenza impfte, so bemerkte man nach 24 Stunden ein üppiges Wachstum der Influenzabacillen; diese entwickelten sich aber nur da, wo sich Gonokokkenmaterial fand, wo dies fehlte oder spärlich war, war auch das Influenzawachstum ein spärliches oder blieb ganz aus.

Auf Ascitesagar hatte man noch bessere Resultate als auf einfachem Agar; auf Blutagar waren, wie natürlich, die Resultate viel brillanter, obwohl nicht so beweiskräftig wie auf den anderen vorher citirten Nährböden.

Wie aus diesen Experimenten hervorgeht, äussert sich die begünstigende Wirkung der Gonokokken auf das Wachstum der Influenzabacillen in constanter Weise nicht nur, wenn man einen für Influenza und Gonokokken ungünstigen Nährboden wählte (einfaches Agar), sondern auch, wenn man einen für Influenza ungünstiges und für Gonokokken günstiges Nährsubstrat anwendete (Blutglycerin-Ascitesagar). Die Influenzabacillen mit anderen Worten überwältigten die Gonokokkenentwicklung auch auf einem für diese letzteren sehr günstigen Nährboden.

Bei diesen so übereinstimmenden Experimenten stellte sich nun natürlich die Frage, wie weit auch die anderen Bakterien das Wachstum der Influenzabacillen beeinflussen konnten. — Es wurde von mir zu diesem Zwecke eine grosse Reihe von Experimenten mit allen möglichen Bakterien angestellt, die ich eben zur Hand hatte. Ich wählte zuerst nicht pathogene Keime, die aus der Laboratoriumluft, aus Sputa u. s. w. stammten; es wurden gerade diejenigen Bakterien nicht ohne Acht gelassen, die in den Influenzasputa am häufigsten vorkommen; zuletzt wurden fast alle pathogene Bakterien zu den Versuchen verwendet.

Die ersten Experimentenreihen wurden mit lebendigen Bakterien angestellt; bei diesen Versuchen gelang es mir nicht ohne Schwierigkeit, das gleichzeitige Wachstum von Influenza- und anderen Bakterien auf demselben Nährboden zu erreichen; viele von den angewendeten Bakterien überwucherten oft die zarten Influenzacoloneen, wenn sie zusammen mit diesen geimpft wurden, in solcher Weise, dass nichts mehr von Influenza zu sehen war. Ich wurde daher gezwungen, das Plattenverfahren so anzuwenden, dass ich das gleichzeitige Wachstum von den beiden Bakterienarten ziemlich gut beobachten konnte. Um dies zu erhalten, verfuhr ich folgender Weise: die mit Agar, mit Ascites- oder mit Blutglycerinagar begossenen Platten (für meine Experimente wählte ich diese drei verschiedenen Nährböden) wurden 24 Stunden lang steril gehalten, um das Condenswasser verdunsten zu lassen. Wenn die Platten ganz trocken geworden waren, impfte ich sie alle mit einer gleichen Menge von Influenza

(in der Regel zwei Normalösen einer in 1^{cem} steriles Wasser aufgeschwemmten Cultur). Dies Influenzamaterial wurde möglichst gleich auf der Oberfläche der Platte vertheilt. Eine halbe Stunde später impfte ich dieselbe Platte wieder mit dem Bakterium, das ich eben ausgewählt hatte; die Impfung aber geschah dieses Mal nicht auf der ganzen Platte, sondern in zwei möglichst dünnen gekreuzten Strichen. Die Platten wurden nachher im Brutschrank bei 37° gehalten und nach 20, 24 und 48 Stunden sorgfältig untersucht; das Wachstum der Influenzacoloneen wurde besonders am Rande und in der Dicke der Bakterienstreifen streng überwacht; von den verdächtigen Influenzacoloneen wurden immer Präparate angefertigt und Controlröhrchen abgeimpft. Bei jeder Experimentenreihe wurden Controlplatten mit Influenza aber ohne Bakterienzusatz angestellt, um das Wachstum dieser Bacillen auf den gebrauchten Nährböden genauer überwachen zu können.

Tabelle II.
Platten mit einfachem Agar.

Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.	Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.
Kleine Diplobacillen aus Influenzasputum	0	Tuberkelbacillen	0
Sarcine aus Influenzasputum	0	Diplok. Fraenkel aus Infl.-Sp.	0
Blastomyceten aus Infl.-Sp.	0	Streptokokken „ „	0
Bact. d aus Influenzasputum	0	„ a. Peritonitis	0
„ c „ „	0	Gonokokken	++ +
„ a „ „	0	Staphylococcus aureus	0
„ h „ „	0	„ albus	0
„ i „ „	0	Pyocyaneus	0
Schwarze Hefe	0	Cholera	0
Rosa-Hefe	0	Typhus	0
Gelbe Sarcine aus Luft	0	Milzbrand	0
Grosse Diplok. aus Infl.-Sp.	++	Diphtheritis	++ +
Grüne Bacillen „ „	+	Pseudodiphtheritis	0
Grosse gelbe Kokken a. Luft	++	Coli	0

Das Optimum des Wachsthum's ist mit + + + + + bezeichnet.

Wie aus der Tabelle II hervorgeht, haben sich nur wenige Bakterien als wachsthumsfördernd für die Influenzabacillen bewährt, wenn sie in lebendigem Zustande zusammen mit den Influenzabacillen auf einfachem Agar geimpft wurden; auf Diphtheritis- und Gonokokkenplatten hatte man die besten Resultate; man konnte in der That ein sicheres Wachstum

der Influenzacoloneen ganz dicht am Rande und in der Schicht selbst der ausgestrichenen Bakterien beobachten. Bei Diphtheritis waren die Resultate nach 48 Stunden noch prägnanter; man bemerkte nicht nur am Rande des Diphtheriestriches, sondern auch in der Schicht selbst ganz kleine punktförmige Colonieen, die sich von dem übrigen homogenen Diphtherierasen emporhoben.

Diese Resultate wurden aber viel deutlicher, wenn man ein stark albuminreiches Nährsubstrat für die Bereitung der Platten anwendete. (Vgl. Tabelle III.)

Tabelle III.
Wachstum auf Ascitesagar.

Bakterienart	Wachstum der Infl.-Bac.	Bakterienart	Wachstum der Infl.-Bac.
Streptokokken aus Infl.-Sput.	++	Milzbrand	+
Diplok. Fraenkel a. Infl.-Sp.	0	Staphylococcus aureus	++
Diplokokken aus Sputum	0	Staphylococcus albus	++
Gonokokken	++++	Tuberkelbacillen	-+
Diphtheritis	++++		

Die Controlplatten, einfach mit Influenzabacillen geimpft, blieben steril. Das Optimum des Wachstums ist mit +++++ bezeichnet.

Schon anders gestaltet sich die Sache, wenn man einen Nährboden verwendet, der reich an Albumin ist, jedoch sehr wenig für das Wachstum der Influenzabacillen passt. Die Influenzabacillen kommen trotzdem zur Entwicklung, wenn sie auf Ascitesagar in Gemeinschaft mit anderen Bakterien geimpft werden. Auch hier wie in der vorigen Tabelle machen sich grosse Unterschiede betreffs der Wachstumsbegünstigung je nach der verwendeten Bakterienart bemerkbar.

Noch günstiger gestalten sich die Experimente, die in der Tabelle IV zusammengefasst sind.

Bei diesen letzten Experimenten sind die Resultate weit günstiger als in den anderen zwei Tabellen; die Ursache ist aber leicht zu erklären, wenn man in Betracht zieht, dass wir ein Blutsubstrat angewendet haben, bei welchem nur durch Zusatz von Glycerin die Entwicklung der Influenzabacillen gehemmt wird. Die Influenzacoloneen waren in Gemeinschaft von Gonokokken und Diphtheritis besonders schön entwickelt; man bemerkte dicht am Rande dieser Bakterien ganz schöne Riesencolonieen. Die vom Bakterienstrieche weiter entfernten Influenzacoloneen sahen dagegen immer kümmerlicher aus, bis man bei einer Entfernung von 1^{cm} bis zu 1^{1/2}^{cm} kein Wachstum von Influenza mit bloßem Auge mehr bemerken konnte.

Tabelle IV.
Wachsthum auf Blutglycerinagar.

Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.	Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.
Grosse Diplokokken aus Influenzasputum	+++++	Gonokokken	+++++
Grüne Bacillen desgl.	+++	Staphylococcus albus	+++
Bacterium <i>d</i> desgl.	+++	Staphylococcus aureus	+++
„ <i>i</i> „	+	Tuberkelbacillen	+
„ <i>a</i> „	+++	Diphtheritis	+++++
„ <i>h</i> „	+++	Pseudodiphtheritis	++
„ <i>i</i> „	+	Typhus	+
Diplokokken „	+	Milzbrand	+
Streptokokken „	+++	Coli	+
		Pyocyaneus	+++

Die Controlplatten bei den 7 mal wiederholten Versuchen haben nur ein Mal und erst nach 48 Stunden ein ganz kümmerliches Wachsthum von Influenzabacillen bemerken lassen. Das Optimum des Wachsthum ist mit +++++ bezeichnet.

Wenn man nun die Resultate dieser drei letzten Tabellen kurz zusammenfasst, so kann man durchaus nicht leugnen, dass es auch andere Bakterien giebt, welche, wie die Gonokokken, wachsthumsfördernde Eigenschaften für die Influenzakeime besitzen, jedoch mit bemerkenswerthen Unterschieden.

Zu den Bakterien, die sich am günstigsten bewiesen haben, sollen in erste Reihe die Gonokokken und die Diphtheritisbacillen gestellt werden, die auch auf einfachem Agar mit den Influenzabacillen zusammen geimpft, das Wachsthum dieser letzteren sehr gut befördern; es kommen dann in zweiter Reihe die Staphylokokken, einige nicht virulente Diplokokken aus Sputum, die auf Ascitesagar eine gute Wirkung ausübten. Keine besondere Wirkung haben in unseren Experimenten die Fraenkel'schen Diplokokken, die Streptokokken und die Tuberkelbacillen entfaltet; man könnte vielleicht bei den zwei ersten Mikroben eher eine Begünstigung derselben seitens der Influenzabacillen annehmen.

Bei diesen ziemlich übereinstimmenden Experimenten stellte ich mir die Frage, wodurch das Wachsthum der Influenzabacillen bedingt sei: von einer durch die Bakterien verursachten Veränderung der gebrauchten Nährböden, oder von Nährstoffen, die im Leibe der Bakterien selbst enthalten sind? Es war endlich noch die Frage einer Symbiose in's Auge zu fassen.

Dieses Mal gelang es mir aber durchaus nicht schwierig eine Antwort auf diese Frage zu finden. Ich sterilisirte ganz einfach die verschiedenen Bakterien und setzte sie dem verflüssigten und bei 40° abgekühlten Agar zu.

Die verschiedenen Bakterien wurden alle in der gleichen Weise sterilisirt, indem ich sie einer Temperatur von 60° 3 Stunden lang aussetzte; diese Zeitdauer war für die Sterilisirung der meisten Bakterien genügend. Die Sterilisirung bei 100° wurde von mir auch manchmal versucht; ich bekam aber lange nicht so gute Resultate, wie bei einer Temperatur von 60°. Sehr achtete ich darauf, die so hergestellten Röhrechen an demselben Tage zu impfen; sehr oft geschah es, dass schon nach 24 Stunden dasselbe Material, welches in früheren Experimenten positive Resultate gegeben hatte, nicht mehr im Stande war, nur eine einzige Influenzacolonie zur Entwicklung zu bringen, ganz in analoger Weise, wie mir mit dem mit digerirten Blute bereiteten Nährboden geschah. Dieses Phänomen ist übrigens nicht schwer zu erklären, wenn man an die grosse Labilität der im Zelleibe enthaltenen Substanzen denkt. Mannigfaltige Veränderungen sind übrigens von allen Forschern in der Vitalität, in der Virulenz und in der Toxicität von vielen Bakterien schon nach Aufbewahrung derselben während kurzer Zeit beobachtet worden.

Was die Menge der mit dem verflüssigten Agar vermischten Culturen anbetrifft, so ist hier zu bemerken, dass immer unter gleichen Verhältnissen gearbeitet wurde. In der Regel wurde eine ganze Agarcultur des Bakterienmaterials in 1^{cem} Wasser aufgeschwemmt und, nach Sterilisirung, dem verflüssigten Agar zugesetzt. Von den nicht üppig wachsenden Bakterien (Diplo-, Streptokokken u. s. w.) wurden je nach ihrer Wachsthumskraft 4 bis 8 Culturen angewendet. Es wurde stets mit gleichen Mengen Influenzabacillen geimpft.

Die Resultate der obigen Versuche werden der Kürze wegen in Tabellen zusammengefasst; sie werden in solche eingetheilt, die mit nicht pathogenen Keimen und in solche, die mit pathogenen Mikroorganismen ausgeführt sind. (Vgl. Tabelle V u. VI.)

Wie aus diesen zwei Tabellen V und VI zu ersehen ist, haben viele von den pathogenen, sowie von den nicht pathogenen Bakterien und unter diesen auch einige Hefearten wachsthumsfördernde Eigenschaften für die Influenzabacillen, wenn sie in sterilisirtem Zustande den gewöhnlichen Nährböden beigemischt werden. Auch hier, wie bei den Versuchen mit lebendigen Keimen, üben nicht alle Bakterien denselben Einfluss auf das Wachsthum der Influenzabacillen; diese Unterschiede werden wir später zu erklären versuchen.

Tabelle V.
Versuche mit nicht pathogenen Keimen.

Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.	Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.
Diplobacillen aus Luft	0	Grosse Diplok. a. Blen.-Eiter	+++
Grosse Kokken aus Luft	0	Gelbe Sarcine aus Luft	+++
Kleine Diplobac. a. Infl.-Sp.	0	Grosse gelbe Kokken desgl.	+++++
Sarcine aus Influenza-Sputa	0	Micrococcus roseus desgl.	+++
Blastomyceten desgl.	0	Bacillen aus Wasser	0
Grosse Diplokokken desgl.	++++	Kokken „ „	0
Grüner Bacillus desgl.	++++	Pseudodiphtherie aus einem weichen Schanker	+++
Diplobacillen aus Blenorrrhagie-Eiter	++++	Schwarze Hefe	++
		Rosa Hefe	+++

Das Optimum des Wachstums ist mit +++++ bezeichnet.

Tabelle VI.
Versuche mit pathogenen Keimen.

Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.	Bakterienart	Wachsthum der Infl.-Bac.
Virulente Streptokokken aus einer Pneumonie	0	Megaterium	0
Virulente Streptokokken aus einer Peritonitis	0	Cholera	++
Avirulente Streptok. a. Mund	0	Metschnikoff	+++
Diplok. Fraenkel aus Pneum.	0	Finkler	+
Avirulente Diplok. aus Mund	0	Prodigiosus	+++
Milzbrand	0	Diphtheritis	+++++
Coli	0	Staphylococcus aureus	+++
Typhus	+++	Staphylococcus albus	+++
		Gonokokken	+++++

Das Optimum des Wachstums ist mit +++++ bezeichnet.

Hier bietet sich uns besser die Gelegenheit, auf einige widersprechende Resultate die Aufmerksamkeit zu lenken, die zwischen den Experimenten mit lebendigen und denen mit sterilisirten Bakterien zu bestehen scheinen. Viele von denjenigen Bakterien, die in der That in lebendigem Zustande gar keine begünstigende Wirkung der Influenzabacillen gegenüber zeigten, haben sich im sterilisirten Zustande als besser passend erwiesen.

Der Leser wird aber diesen Widersprüchen kaum zu grossen Werth beilegen, wenn er daran denken wird, dass wir mit der Sterilisirung alle

diejenigen Vitalitätserscheinungen aufgehoben haben, die sich dem Wachstum der Influenzabacillen gegenüber vielleicht als schädlich erweisen konnten. Unter diesen ist in erster Linie das leichte Ueberwuchern der Bakterien über die zarten Influenzastäbchen zu erwähnen. Bei der Anordnung von unseren Experimenten wurde versucht, diesem Hindernisse möglichst auszuweichen; man konnte aber nicht die ungeheuer grossen Unterschiede ausgleichen, die zwischen dem ganz üppigen Fortkommen der meisten Bakterien auf einfachem Agar und dem negativen Wachstum der Influenzabacillen auf demselben Nährboden bestehen. Die Richtigkeit dieser Anschauung wird übrigens durch die viel günstigeren Resultate bewiesen, die wir gehabt haben, wenn wir einen für Influenza nicht ganz ungeeigneten Nährboden gewählt haben; auf Ascites- und auf Blutglycerinagar waren die Resultate schon viel günstiger.

Es ist ferner auch möglich, dass die Sterilisirung das Freiwerden der im Zellleibe der Bakterien enthaltenen Substanzen begünstigt und hiermit auch das Wachstum der Influenzakeime erleichtert habe. Bei der Mischung von sterilisirten Bakterien mit dem Agar wurden übrigens grössere Mengen von Bakteriensubstanz mit den Influenzabacillen in Berührung gebracht, als bei der einfachen Nachbarschaft einer Influenzacolonie mit den Colonieen von anderen, lebendigen, überwuchernden Bakterien.

Was es nun sei, viel wichtiger ist für uns vor Allem die Lösung der Frage, welche Faktoren bei den verschiedenen Bakterien ins Spiel kommen, um das Wachstum der Influenzabacillen zu befördern. Wir könnten in der That schon von Anfang die Frage stellen: sind es einfach chemische Faktoren, die aus der Substanz selbst, die in den Bakterienleibern enthalten ist, ein günstiges Nährsubstrat für die Influenzabacillen bilden, oder kommen noch andere uns unbekannte Erscheinungen ins Spiel? Aus den oben citirten Experimenten, die mit sterilisirten Culturen ausgeführt worden sind, können wir ohne weiteres ganz einfach die erste Hypothese als sicher bewiesene Thatsache annehmen; da wir mit der Sterilisirung alle Vitalitätsphänomene ganz ausgeschlossen haben, so kann es sich demgemäss um nichts Anderes, als um chemische Bestandtheile handeln, die in den Bakterienleibern selbst enthalten sind und ein günstiges Nährsubstrat für die Influenzabacillen bilden.

Wenn wir aber der Frage näher treten wollen, welchen von diesen Körpern, die im Bakterienleibe enthalten sind, die Eigenschaft gebühre, das Wachstum der Influenzabacillen zu begünstigen, so können wir nicht mit gleicher Sicherheit so schnell antworten.

Die Studien über die chemische Zusammensetzung der Mikroorganismen sind nicht so sehr weit vorgeschritten, dass wir eine sichere Lösung unserer Frage in ihnen finden können. Es liegen zwar Untersuchungen

von Nencki, Brieger, Kramer, Nishimuna vor, die einen Gehalt an Albuminkörpern seitens verschiedener Bakterien aufweisen. Die hohen Werthe von Stickstoffgehalt, die von vielen Autoren (Brieger, Vincenzi, Kappes, Hammerschlag, Kresling, Dziergowski und Rekowski, Cramer¹ u. A.) in der trockenen Substanz von vielen Bakterien gefunden wurden, lassen uns auf einen reichen Gehalt an Albuminkörpern seitens dieser Bakterien schliessen. Was die Identificirung dieser Albuminkörper anbelangt, so liegt noch viel Unsicheres vor, wie aus den vielen Widersprüchen zwischen Forschern wie Nencki, Brieger, Hoffmann, Weyl u. s. w. zu ersehen ist.

Aus allen den ausgeführten chemischen Analysen wird aber der reiche Gehalt der Bakterien an Albumin als sicher bewiesene Thatsache hervorgehoben. Bei den Analysen Cramer's wird dieser Gehalt bis zu 80 Procent der trockenen Substanz calculirt; in den Untersuchungen von Dziergowski und Rekowski bezüglich der Zusammensetzung der Diphtheriebacillen wird ein Werth von 63.4 Procent Albumin angegeben. Auch von de Giaksa² wurden analoge Experimente mit gleichen Resultaten angestellt.

Schon in früheren Experimenten ist es uns gelungen, den Werth einiger Albuminkörper bei der Zusammensetzung der Influenzanährböden zu bestimmen. Was den Nuclein- und Lecithingehalt betrifft, welcher in vielen Bakterien ein erheblicher ist, so können wir durch unsere vorher citirten Experimente³ und durch andere von Capaldi⁴ sehr sorgfältig ausgeführte Versuche einen solchen eher ausschliessen als annehmen. Mit grosser Wahrscheinlichkeit können wir daher auch in den aus Bakterien zusammengesetzten Nährböden, die sich für das Wachsthum der Influenzabacillen günstig bewiesen haben, eine sehr active Wirkung seitens der Albuminkörper, die in den Bakterienleibern selbst enthalten sind, annehmen.

Die Unterschiede, die wir bei den verschiedenen Bakterien betreffs der wachsthumfördernden Eigenschaften den Influenzabacillen gegenüber beobachtet haben, können wir alle ganz einfach mit qualitativen Differenzen bei den verschiedenen Substanzen, die im Bakterienprotoplasma enthalten sind, erklären.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, meinen verbindlichsten Dank dem Director unserer Klinik, Prof. Cardarelli, für seine rege Unterstützung auszusprechen.

¹ Ref. in Flügge, *Die Mikroorganismen*. Bd. I. S. 97 ff.

² *Annali d'Igiene*. Celli 1894.

³ *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. XXII. Nr. 20/21.

⁴ *Ebenda*. Bd. XX. Nr. 22/23.