

Die Sporenbildung des Milzbrandes bei Anaërobiose.

Erwiderung.

Von

Apotheker Dr. Richard Weil,
Assistenten am staatl. hygien. Institut Hamburg.

In Bd. XXXV dieser Zeitschrift erschien aus dem hygienischen Laboratorium des königlich württembergischen Medicinalcollegiums eine Arbeit von Hrn. Oberarzt Dr. Klett, die, falls sie einer sachlichen Kritik stand zu halten vermag, eine völlige Reform unserer Anschauungen über Anaërobiose herbeiführen müsste. Auffallend ist allerdings die Thatsache, dass der eigene Text mit manchen in den Tabellen niedergelegten Daten im directen Widerspruch steht.

Es sei meine Aufgabe, zuerst den Text für sich, alsdann den Text in Beziehung zu den Tabellen eingehend zu untersuchen.

In einer Zusammenstellung der neueren Arbeiten bespricht Klett auch die meinige und beginnt: „Im letzten Jahre veröffentlichte Weil eine Arbeit über die Biologie des Milzbrandes und wies darin nach, dass bei der Sporenbildung jedenfalls nicht die Erschöpfung des Nährbodens von ausschlaggebendem Einfluss sein könne, da dieselbe Bouillon, die nach reichlicher Bildung von Milzbrandsporen mittels Filtration durch ein Chamberlandfilter keimfrei gemacht war, eine reichliche Entwicklung zeigte, wenn sie mit denselben Sporen von neuem inficirt und bei geeigneter Temperatur im Brutschrank gehalten wurde.“

Ich¹ wies also nach, dass Sporen in demselben Nährmaterial auszukeimen vermögen, in dem sie vorher gebildet wurden.

Was hat denn die Auskeimung mit der Sporenbildung zu thun? Wie kommt Klett zu der unrichtigen Auffassung, ich hätte nachgewiesen, dass die Erschöpfung des Nährbodens bei der Sporenbildung jedenfalls nicht von ausschlaggebendem Einfluss sein könne?

Einer der Schlussätze meiner Arbeit lautet: Der atmosphärische Sauerstoff übt keinen specifischen Einfluss auf das Zustandekommen der Dauerformen aus. Die Milzbrandbacillen bilden in geeigneten Nährmedien

¹ Weil, Zur Biologie des Milzbrandes. *Archiv für Hygiene*. Bd. XXXV.

auch unter anaërobiontischen Bedingungen Sporen von beinahe normaler Virulenz; als solche Nährmedien bezeichne ich:

1. sterile Kartoffelscheiben, 2. 10 Procent Weizenauszug,
3. je 5 Procent Quitten- und Eibischschleim,
4. festes Schafblutserum mit 25 Procent Traubenzuckerbouillon.

Darüber äussert sich Klett: „Allgemein gefasst würde sich also aus den Weil'schen Resultaten die Regel ableiten lassen, dass für das Zustandekommen der Sporenbildung nicht das aërobe Wachsthum, sondern die Art des Nährmaterials von ausschlaggebender Bedeutung ist.“

Wenn ich an der Hand einwandfreier Experimente nachgewiesen habe, dass bei strenger Anaërobiose auf gewissen Nährmedien Sporenbildung eintritt, so folgt daraus, dass die Milzbrandbacillen absolut nicht des Sauerstoffes als solchen zur Sporenbildung bedürfen, sondern dass andere Oxydationsmittel, die die Bacillen anscheinend in gewissen Nährmedien vorfinden, bei strenger Anaërobiose dasselbe zu bewirken im Stande sind, was bei aërobem Wachsthum der Sauerstoff leistet.

Ich wies also bei anaërobem Wachsthum auf die Bedeutung des Nährmaterials für die Sporenbildung hin.

Wie kommt dann Klett zu der abermals unrichtigen Auffassung, es liesse sich aus meinen Resultaten die Regel ableiten, nicht das aërobe Wachsthum, sondern die Art des Nährmaterials sei für die Sporenbildung von ausschlaggebender Bedeutung?

Nun zu den Versuchen Klett's selbst.

Klett will unter streng anaëroben Bedingungen arbeiten und verwendet als Anaërobenapparate Buchner'sche Röhren, in denen sich die mit sporenfreiem Milzbrandmaterial geimpften Nährmedien befanden. Als solche verwendet er Schrägagar, erstarrtes Blutserum; von flüssigen: Bouillon, Quittenschleim und ähnliche. Nach seinen Angaben ist es absolut nicht wesentlich, die Nährmedien stets vor dem Impfen auszukochen. Er bebrütete die in Buchner'schen Röhren befindlichen geimpften Nährmedien und fand nach 2 Tagen, dass sich „trotz des anaëroben Wachsthum“ massenhaft Sporen gebildet hatten.

Als Kriterium dafür, dass die Milzbrandbacillen unter streng anaëroben Bedingungen im inneren Reagensgläschen gewachsen sind, sieht Klett das Erlöschen eines brennenden Spahnes an, wenn derselbe nach vorsichtigem Oeffnen der Buchner'schen Röhre und nach Herausnahme des geimpften Reagircylinders in die äussere Buchner'sche Röhre hineingetaucht wurde.

Auf Grund des positiven Ausfalles der Sporenbildung in allen Nährmedien unter dem Einfluss von pyrogallolsaurem Kali kommt Klett zu dem Schlusse, dass zum Zustandekommen der Sporenbildung nicht die An-

wesenheit von Sauerstoff erforderlich ist — das ist ja zufälliger Weise richtig —, dass dieselbe vielmehr auch unter sogenannten anaëroben Verhältnissen in einer Stickstoffatmosphäre regelmässig einzutreten pflegt.

Es waren allerdings nur sogenannte anaërobe Verhältnisse, die wir aber aërobe zu nennen gezwungen sind. Der Beweis für meine Behauptung soll gleich nachher erbracht werden.

Klett sagt wörtlich: Wie übrigens weiter unten (wo er die Luft durch den sehr leicht diffundirbaren Wasserstoff verdrängt) gezeigt wird, ist die geringe Menge von Sauerstoff, die z. B. in schon längere Zeit zubereiteten Agarröhrchen absorbiert ist, von sich aus keineswegs im Stande, unter anderen Bedingungen (in der Wasserstoffatmosphäre) eine Sporenbildung zu ermöglichen.

Wie kommt Klett zu einer Vorstellung über die Grösse des Luftvolumens, das durch den Wasserstoff verdrängt wurde?

Wer öfters Titrationen ausführt mit Phenolphthalein, das gegen Luft bzw. deren Kohlensäuregehalt empfindlich ist, kennt zur Genüge die erheblichen Differenzen, die sich ergeben, je nachdem man das betreffende Nährmedium durch Auskochen luftleer macht oder nicht. Wenn sich diese Angaben direct auch nur auf flüssige Nährmedien beziehen, so wird keinesfalls bestritten werden können, dass ein plastischer Körper, wie Agar, beim Erstarren mechanisch Luft einzuschliessen vermag, deren Menge zu unterschätzen wir keinen Grund haben. Man kann ja einwenden, diese Luftmenge könne nur minimal sein, da unsere exquisiten Anaërobier, wie Tetanus oder Rauschbrand, manchmal auch vortrefflich in nicht ausgekochten festen Nährmedien zu gedeihen vermögen.

Nachdem wir aber einerseits absolut keine Vorstellung darüber haben, welche directe Rolle dem Sauerstoff beim Zustandekommen bzw. Ausbleiben der Entwicklung in den Reinculturen unserer obligaten Anaërobier zukommt, nachdem andererseits Kedrowski¹ es für den Tetanusbacillus gezeigt hat, dass derselbe in einer Prodigiosuscultur trotz einer gesättigten Sauerstoffatmosphäre, hergestellt durch ununterbrochenes Einleiten von Sauerstoff, sich reichlich vermehrte, und dass hier der Sauerstoff nur das Zustandekommen eines Fermentes begünstigt, das dem Tetanusbacillus auch unter völlig aëroben Bedingungen das Gedeihen ermöglicht, nachdem ferner Kitt² in grossen lufthaltigen Bouillonmengen auch prächtige Rauschbrandculturen zu züchten vermochte, dürfen wir keinesfalls den positiven Ausfall des Wachstumes eines strengen Anaërobiers als sicheres Kriterium dafür gelten lassen, dass das betreffende Nährmedium völlig sauerstofffrei war.

¹ Kedrowski, *Diese Zeitschrift*. Bd. XX. S. 358.

² Kitt, *Centralblatt für Bakteriologie u. Parasitenkunde*. Bd. XVII. S. 159.

Dieser mechanisch im Nährmedium eingeschlossene Sauerstoff bildet aber nur einen Bruchtheil der Sauerstoffmenge, die den Milzbrandbacillen in den Buchner'schen Röhren zur Verfügung stand.

Das Klett'sche Reagens, das Erlöschen des brennenden Spahnes, soll aber, wie Klett behauptet, ein Kriterium nicht nur dafür sein, dass in der Buchner'schen Röhre kein Sauerstoff mehr vorhanden war, sondern sogar als Beweis dafür gelten, dass die Milzbrandbacillen in der inneren Reagensröhre unter streng anaëroben Bedingungen gewachsen wären.

Die Thatsachen der Physik und Chemie machen Front gegen den Werth eines solchen Indikators.

Da einerseits die Luft mit einem Drucke von 10333^{kg} auf einem Quadratmeter Fläche lastet, andererseits es eine physikalische Fundamentaltatsache ist, dass verschiedene Gase, die keine chemische Wirkung auf einander ausüben, durch Diffusion sich gleichförmig durch den ganzen Raum vertheilen, so muss in die geöffnete Buchner'sche Röhre, während das Proberöhrchen entnommen wurde, Sauerstoff eingedrungen sein und beweist das Erlöschen des brennenden Spahnes nur, dass sich in der Buchner'schen Röhre keine 21 Procent Sauerstoff und mehr als 79 Procent Stickstoff befanden.

Eigene Versuche.

I. Colorimetrisch-chemischer Sauerstoffnachweis.

In 10 Buchner'sche Röhren gab ich je 1^{grm} Pyrogallol und 10^{ccm} ausgekochter 1procent. KOH, ferner je ein Schrägagar- und je ein steriles Reagensröhrchen; letzteres war gefüllt mit reinem Pyrogallol. Die wohl verschlossenen Apparate verweilten zweimal 24 Stunden bei 37° C.

Fünf Röhren wurden dann nach einander geöffnet, in Nachahmung der Klett'schen Versuche das Agarröhrchen entfernt und in das Pyrogallolröhrchen mit der Pipette 1^{ccm} kochend heisser 10proc. Kalilauge gegeben. Alsdann wurden die Buchner'schen Röhren, die im ganzen kaum 10 Sekunden geöffnet waren, wieder wohl verschlossen. Die Pyrogallollösung in den 5 Röhrchen war nach 4 Minuten noch gleichmässig hellgelb, nach 5 bis 10 Minuten entstand eine dünne schwarzbraune Zone am oberen Rande, die allmählich durch weitere Diffusion des Sauerstoffes nach unten fortschritt.

Die übrigen 5 Röhren wurden nun ebenfalls rasch geöffnet und ohne Entfernung des Agarröhrchens dem reinweissen Pyrogallol die ausgegebene Kalilauge zugesetzt, worauf mit dem Gummistopfen nach kaum 4 Sekunden die Buchner'schen Röhren wieder sorgfältig verschlossen wurden. Nach 30 Minuten ist das pyrogallolsaure Kali noch rein hellgelb, ein sicherer Beweis dafür, dass mit der heissen Kalilauge keine Luft mit übertragen wurde. Nach 40 Minuten ist in allen Röhrchen eine schwarzbraune Zone zu beobachten, die von oben nach unten mit der fortschreitenden Diffusion des Sauerstoffes sich vergrössert. Nachdem so in allen Buchner'schen Röhren die Anwesenheit von Sauerstoff mit absoluter Sicherheit erwiesen,

brachte ich in das Innere der 10 Röhren einen brennenden Spahn. Er erlischt sofort und beginnt an der Luft wieder zu glimmen.

Physikalisch und colorimetrisch-chemisch wäre die Werthlosigkeit des Klett'schen Reagens bewiesen. Es sei nun aber auch meine Aufgabe, quantitativ festzustellen, welche Sauerstoffmengen den Milzbrandbacillen in den Buchner'schen Röhren zur Verfügung standen.

II. Gasanalytische Absorption und volumetrische Bestimmung des Sauerstoffes.

8 Buchner'sche Röhren, in denen sich je ein Gramm Pyrogallol, 10^{ccm} ausgekochter KOH und ein Schrägagarröhrchen befanden, waren mit Gummistopfen verschlossen, in die je 2 Glasröhren passten, die selbst mit Gummischläuchen und Quetschhähnen luftdicht abgeschlossen waren. Jede einzelne Röhre war auf's Sorgfältigste mit geschmolzenem Paraffin gedichtet. Dem Thermostaten von 37° wurden sie nach den unten angegebenen Zeiten entnommen und in je 2 der procentuale Sauerstoffgehalt ermittelt. Die Absorption¹ wurde bei 21° C. nach dem Vorgange Doyère's in besonderen Apparaten vorgenommen, durch Combination der Quecksilbergasbüretten mit den einfachen Gasabsorptionspipetten, in denen sich pyrogallolsaures Kali befand.

Der Sauerstoffgehalt betrug im Mittel:

Nach 2 stündigem Verweilen bei 37° C. 17.5 Procent.

" 6	"	"	"	"	"	13.4	"
" 20 ¹ / ₂	"	"	"	"	"	4.6	"
" 26	"	"	"	"	"	0	"

In den Buchner'schen Röhren steht den Milzbrandbacillen mehr als 20 Stunden lang Sauerstoff zur Verfügung. Wie ich² gezeigt habe, tritt die Sporenbildung bei Gegenwart von Sauerstoff im Temperaturoptimum schon nach 16 Stunden ein. Ist da die Anwesenheit von Sporen zu verwundern, wenn den Bacillen länger als 20 Stunden Sauerstoff geboten war?

Nun möchte ich nur noch citiren, was Buchner³ selbst über seine eigene Methode sagt: „Beträgt der Luftraum der äusseren Röhre 100^{ccm}, die Menge der Pyrogallussäure 1^{gmm}, jene der Zehntelkalilauge 10^{ccm}, so ist im Brutkasten bei 37° die Sauerstoffabsorption nach 24 Stunden vollendet. Für rein theoretische Versuche, bei denen von vorn herein jede Spur von Sauerstoff auszuschliessen ist, muss ohnehin eine der bisher bekannten Methoden verwendet werden.“

Und last not least behauptet Klett, dass die Sporenbildung regelmässig in einer Stickstoffatmosphäre einzutreten pflegt.

Ist denn Luft, der der Sauerstoff theilweise entzogen ist, eine Stickstoffatmosphäre? Das kann ein Gemenge sein von Stickstoff, Sauerstoff, Kohlensäure, Argon, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrit, Chlornatrium

¹ Hempel, *Gasanalytische Methoden*. 1900. S. 44, 133 ff.

² Weil, a. a. O.

³ Buchner, *Centralblatt für Bakteriologie u. Parasitenkunde*. Bd. IV. S. 150.

und anderen Verbindungen. Hätte Klett reines Ammoniumnitrit erhitzt, den Stickstoff in den Bottkin'schen Apparat geleitet, bis alle Luft verdrängt war, dann wäre ihm eine einwandsfreie Stickstoffatmosphäre zur Verfügung gestanden, die ihn höchstwahrscheinlich veranlasst hätte, diesen ersten Theil seiner Publication nochmals einer genauen Nachprüfung zu unterziehen.

Der zweite Theil der Klett'schen Arbeit ist theoretisch einwandsfrei; Klett vertrieb die Luft in den geimpften Nährmedien durch chemisch reinen Wasserstoff; als Anaërobenapparate benutzt er nach der Roux-Heim'schen Methode präparirte Reagensgläser und den Bottkin'schen Apparat.

Zu Klett's Erstaunen unterblieb in der einwandsfreien Wasserstoffatmosphäre die Sporenbildung auf allen Nährmedien, auf denen vorher „bei scheinbar streng anaëroben Bedingungen“ Sporen gebildet wurden, gänzlich. Nur auf Quitten- und Eibischschleim konnte er Sporen nach der rein objectiven biologischen Methode nachweisen.

Ich lasse die beiden hierher gehörigen Tabellen Klett's nebenstehend folgen.

Durch diese Resultate, den stets positiven Ausfall der Sporenbildung in der Buchner'schen Röhre im Vergleich zu dem stets negativen in der einwandsfreien Wasserstoffatmosphäre, glaubt sich Klett zu dem Schlusse berechtigt, dass die Stickstoffatmosphäre (in Wirklichkeit der Sauerstoff) das Zustandekommen der Sporen begünstige, während der Wasserstoff, in dessen Atmosphäre auf den gebräuchlichen Nährmedien niemals Sporen gebildet werden, einen schädigenden Einfluss auf die Entwicklung der Milzbrandbacillen ausübt, weshalb der Wasserstoff den Bakterien (nicht nur den Milzbrandbacillen) gegenüber nicht das indifferente Gas ist, für welches er bislang noch gehalten wird.

Solche offenbar unrichtige Folgerungen können indess die Resultate eines Hauser, eines Frankland oder eines Fränkel, die durch mühevollen experimentellen Arbeiten die Unschädlichkeit des Wasserstoffes den gebräuchlichen, auch noch so leicht zu Grunde gehenden Bakterien gegenüber nachgewiesen haben, nicht im mindesten beeinträchtigen.

Auf die Vorstellung Klett's, dass in flüssigen Nährmedien die Luft durch Wasserstoff nicht so gut verdrängt werden könne, wie in festen, da man die letzteren umzukehren vermag, will ich nicht näher eingehen.

Wenn ich beim Beginne meiner Erwiderung sagte, dass der Text in directem Widerspruch steht mit manchen in den Tabellen niedergelegten Daten, so erinnere ich nur an Tabelle IV.

Klett sagt, in der Wasserstoffatmosphäre werden von den Milzbrandbacillen keine Sporen gebildet. Wie verhält es sich mit der positiven Sporenbildung im Quittenschleim und im Eibischschleim?

Tabelle I.

Ausgangsmaterial: Herzblut einer an Milzbrand gestorbenen Maus.
Züchtung in Buchner'schen Röhren.

	C u l t u r		Entwicklung	Sporenbildung
	angelegt	untersucht		
Agar	13. X.	16. X.	reichlich	reichlich
Agar + 3 Tr. Na. sulfurosum	13. X.	16. X.	„	„
Agar + 2 Tr. Na. selenosum	13. X.	16. X.	„	„
Traubenzuckeragar . . .	3. V.	5. V.	„	„
Bouillon	1. XI.	3. XI.	mässig reichlich	zieml. reichlich
Traubenzuckerbouillon . .	3. V.	5. V.	„	„
Bouillon + 3 Tr. Na. sulfur.	1. XI.	3. XI.	zieml. reichlich	„
Quittenschleim	20. XII.	22. XII.	„	„
Eibischschleim	20. XII.	22. XII.	„	„
Blutserum erstarrt . . .	16. VI.	19. VI.	mässig reichlich	mässig reichlich

Tabelle IV. Züchtung in Wasserstoff.

Ausgangspunkt: Sporenfreies Material aus dem Thierkörper.

	I. Gener.	II. Gener.	III. Gener.	IV. Gener.	V. Gener.
Agar	18. XII. Entw. + Spor. —	20. XII. Entw. + Spor. —	30. XII. Entw. + Spor. —	15. I. Entw. + Spor. —	22. I. Entw. + Spor. —
Bouillon	4. I. Entw. + Spor. —	15. I. Entw. + Spor. —	22. I. Entw. + Spor. —	30. I. Entw. + Spor. —	10. II. Entw. + Spor. —
Traubenzuckeragar . . .	10. IV. Entw. + Spor. —	18. IV. Entw. + Spor. —	21. IV. Entw. + Spor. —		
Traubenzuckerbouillon . .	10. IV. Entw. + Spor. —	18. IV. Entw. + Spor. —	22. IV. Entw. + Spor. —		
Gelatine	18. XII. Entw. + Spor. —	20. XII. Entw. + Spor. —	28. XII. Entw. + Spor. —	4. I. Entw. + Spor. —	15. I. Entw. + Spor. —
Quittenschleim	12. III. Entw. + Spor. —	16. III. Entw. + Spor. +	20. III. Entw. + Spor. —	27. III. Entw. + Spor. —	4. IV. Entw. + Spor. —
Eibischschleim	10. IV. Entw. + Spor. —	18. IV. Entw. + Spor. —	21. IV. Entw. + Spor. —	27. IV. Entw. + Spor. +	30. IV. Entw. + Spor. —

Will Klett behaupten, seine Versuche mit diesen beiden Nährmedien seien nicht einwandsfrei? Das zu beweisen, dürfte ihm schon deshalb schwer fallen, da die Resultate auf den übrigen in gleicher Weise behandelten Nährmedien, die ein einheitliches negatives Ergebniss zeigen, dagegen sprechen.

Wenn Klett einwendet, es ist doch nicht in allen Quitten- und Eibischschleimröhrchen Sporenbildung erfolgt, so frage ich: Ist denn den Individuen ein und derselben Bakterienart von der Natur ein mathematisch genaues Verhalten vorgeschrieben? Kennt nicht jeder Biologe das völlig verschiedene Verhalten selbst der Nachkommen einer einzigen Bakterienzelle?

Einer unserer bedeutendsten Bakterienkenner, Migula¹, betont in seiner Arbeit: „Ueber Abnahme und Regeneration der (aëroben) Sporenbildung bei Bakterien“ die bedauernswerthe Thatsache, dass sehr viele Arten, die im Anfange reichlich Sporen bildeten, nach und nach bei fortgesetzter Züchtung immer mangelhafter Sporen bilden, so dass man schliesslich selbst in sehr alten Culturen nur noch ganz vereinzelt Sporen findet.

Andererseits bin ich weit davon entfernt, zu behaupten, dass der wässrige Auszug von Quitten- und Eibischwurzeln etc. die natürliche Anlage der vegetativen Formen, Sporen zu bilden, derartig specifisch so zu beeinflussen vermag, dass jede vegetative Zelle des Milzbranderreger's Dauerformen bilden muss. Es unterliegt keinem Zweifel, dass der feine und complicirte Mechanismus der physiologischen Bedingungen der Sporenbildung direct von mehreren Factoren abhängig ist; als solche kennen wir bis jetzt: den günstigen Einfluss der Temperatur und des Nährmediums; an der dritten, von den Autoren gewöhnlich angeführten physiologischen Bedingung der Sporenbildung „einer ungehinderten Zufuhr von Sauerstoff“ können wir, was die Milzbrandbacillen betrifft, nicht mehr festhalten.

Beim Studium der Sporenbildung unter streng anaëroben Bedingungen liess ich einwandsfreie Experimente entscheiden und begnügte mich mit der Constatirung der Thatsache, dass dieselbe auf unseren gebräuchlichen Nährböden ausbleibt, während es Nährböden giebt, auf denen die Milzbrandbacillen unter gleichen Bedingungen Sporen zu bilden vermögen, eine Thatsache, die ich zuerst experimentell festgestellt habe.

Wenn Klett in gesperrten Lettern sagt: Zum Zustandekommen der Sporenbildung beim Milzbrand ist nicht die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich, so bestätigt er die von mir festgestellte Thatsache. Von seinen eigenen Experimenten kann er zur Stütze der Bestätigung nur seine Quitten- und Eibischschleimversuche heranziehen.

¹ Migula, *Zeitschrift für angew. Mikroskopie*. Bd. V.