

M



Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten.  
— Universität Bern. —

**Weisen die in verschiedenen Substraten  
gefundenen Proteusbakterien biologische  
Unterschiede auf und welche?**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer hohen

philosophischen Fakultät der Universität Bern

vorgelegt von

**Karl Frégonneau**

von Eichstetten, Großh. Baden.



Leipzig-Reudnitz.

Druck von August Hoffmann.

1908.

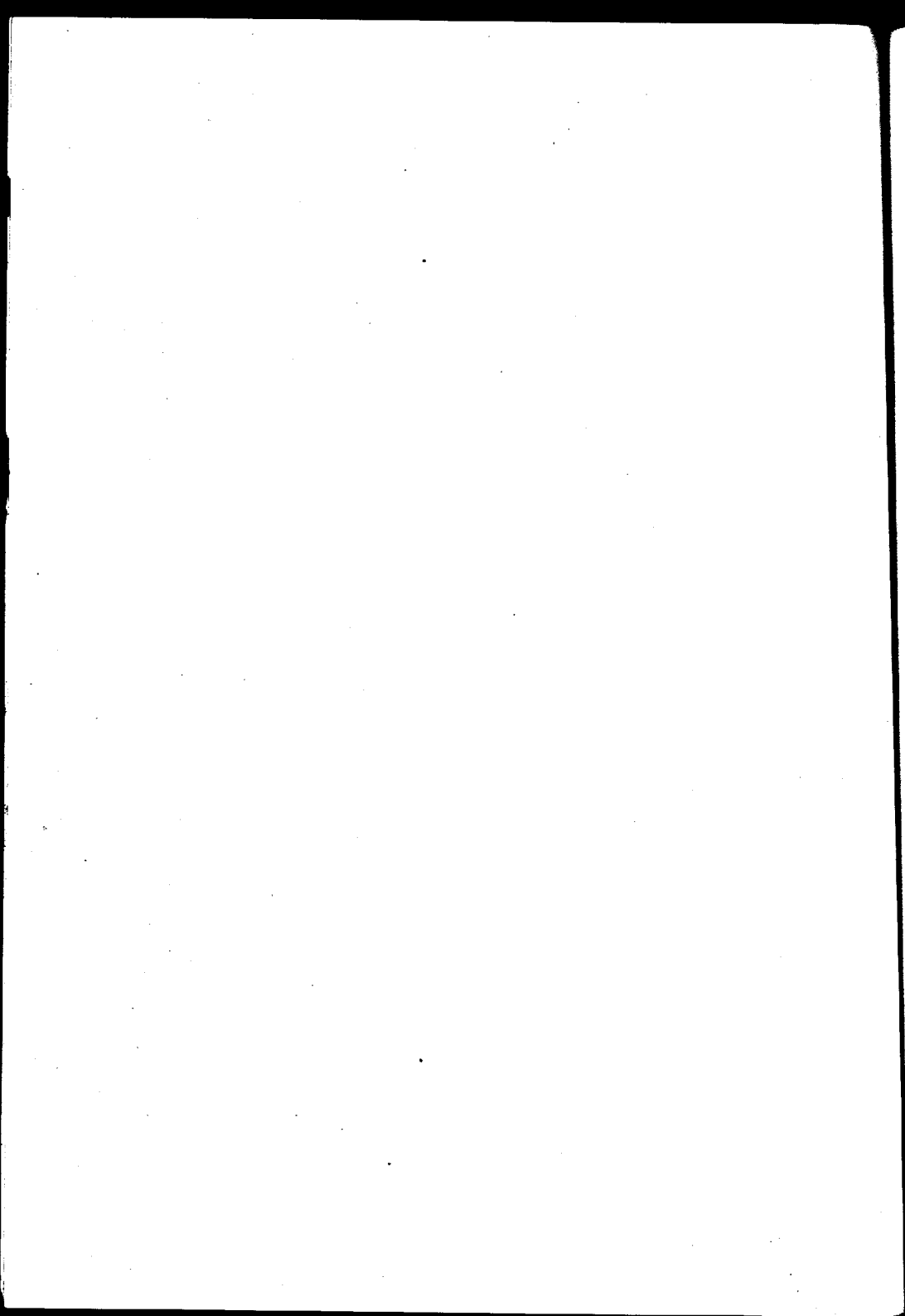
Von der philosophischen Fakultät auf Gutachten  
des Herrn Professor Dr. Kolle nach Antrag des  
Herrn Professor Dr. Studer angenommen.

Bern, 20. Februar 1908.

Der Dekan: Prof. Dr. Tobler.

**Den Manen meines Vaters!**  
**Meiner lieben Mutter**

als bescheidenes Dankeszeichen gewidmet.



## Einleitung.

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die aus verschiedenen faulenden Substraten gezüchteten Bakterien der Proteusgruppe in biologischer Hinsicht Unterschiede aufweisen und welcher Natur dieselben sind. Unsere Kenntnis von den Erregern der Fäulnis in eiweißhaltigen Stoffen stammt von Hauser, der im Jahre 1885 in seiner klassischen Arbeit „Über Fäulnisbakterien und deren Beziehung zur Septikämie“ drei Bakterien beschreibt, welche er regelmäßig in faulenden Substanzen fand und die er wegen ihrer wechselnden Gestalt „Proteus“ nannte. Hauser unterschied einen *Proteus vulgaris*, *Pr. mirabilis* und einen *P. Zenkeri*.

Da mir die Originalarbeit Hausers nicht zur Verfügung stand, so mögen an dieser Stelle einige für die Charakteristik der Gruppe wichtige Angaben aus dem Lehrbuch über Mikroorganismen von Flügge (2. Auflage 1886) angeführt werden.

Flügge führt an, daß die von Hauser in faulenden Substanzen gefundenen 3 Bakterienarten neben

vielen gemeinsamen Charakteren einige konstante Differenzen zeigten.

Im wesentlichen charakterisieren sich diese 3 Bakterienarten wie folgt.

*Proteus vulgaris*:

Bald sehr kurze, nahezu kugelige Stäbchen, bald Stäbchen von 1,25—3,75  $\mu$  Länge, bald Fäden. Die häufig auftretenden Fadenschlängelungen sind nicht als konstanter Wachstumstypus zu betrachten.

Die Stäbchen sind lebhaft beweglich.

Ihr Wachstum in 6 %iger Gelatine ist besonders charakterisiert durch zungenförmige Ausläufer, die von dem die Verflüssigungsschale umgebenden Vegetationsgürtel ausgehen. Diese Fortsätze befinden sich in Bewegung, lösen sich allmählich ab und bilden so isolierte Kolonien, die sich in der verflüssigten Gelatine frei bewegen. Erwähnt wird der üble Geruch der Gelatine und ihre stark alkalische Reaktion.

Was die Pathogenität anbetrifft, so hatten kleine Dosen keinerlei Effekt; größere erzeugten oft Abscesse an der Injektionsstelle; große Mengen subcutan oder intravenös appliziert riefen bei Kaninchen und Meerschweinchen toxische Erscheinungen hervor. Durch Thoncyylinder filtrierte Kulturen hatten die gleiche pathogene Wirkung.

*Proteus mirabilis* (Hauser):

Stäbchen von 0,6  $\mu$  Breite und sehr verschiedener

Länge. Vom vorigen unterschieden durch das viel häufigere Vorkommen von Involutionsformen. Ferner wird die Gelatine viel langsamer verflüssigt als bei *Proteus vulgaris*.

*Proteus Zenkeri*:

Bazillen von 0,4  $\mu$  Breite und im Mittel 1,65  $\mu$  Länge, teils mehr rundliche, teils längliche Formen.

Die Gelatine wird nicht verflüssigt und es kommt auch zu keiner stärkern Entwicklung von Geruch; Fleischbrühe wird dagegen unter starkem Geruch zersetzt.

Soweit in Kürze die Angaben von Flüge.

Neben Hauser haben sich vornehmlich die Italiener Foà, Bonome, Bordone-Uffreduzzi und Carbone, aber auch eine größere Anzahl deutscher und französischer Forscher mit dem Studium der *Proteus*-bakterien beschäftigt. In Nachstehendem gebe ich eine gedrängte Zusammenstellung der für diese Arbeit in Betracht kommenden Literatur. Ich habe dieselbe aus Gründen der Zweckmäßigkeit nach folgenden Gesichtspunkten geordnet:

- A) Vorkommen,
- B) Morphologie,
- C) Biologisches Verhalten (Beweglichkeit, Wachstumsverhältnisse, chemische Eigenschaften).
- D) Immunität.

### A) Vorkommen.

Proteusbazillen wurden gefunden: bei Fäulnisprozessen (Zentralblatt Bd. IX, Seite 57); bei Fleischvergiftung (dasselbe XV, Seite 314), bei Leichenfäulnis (dasselbe XI, 567). Kuhn stellt in letztcitierter Arbeit fest, daß *Proteus vulgaris* und *Zenkeri* als die wesentlichsten Erreger der Leichenfäulnis anzusehen seien; bei der typischen Leichenfäulnis scheint der sowohl aërob als auch anaërob wachsende *Proteus vulgaris* im Vordergrund zu stehen. Weiterhin ist die Anwesenheit von Proteusbakterien konstatiert worden in Sputum (dasselbe IX, 568), in faulender Hefe (dasselbe XVII, 471), in Leitungswasser (dasselbe IX, 381), in der Luft (XI, 632), im Staub (dasselbe XI, 601).

In seiner Arbeit: „Studien über verdorbene Gemüsekonserven“ (Archiv für Hygiene Band 54, 1905) stellt J. Belser fest, daß Erbsen- und Bohnenbrühen einen sehr günstigen Nährboden für *Proteus vulgaris* bilden. Der Eintritt der Fäulnis hängt nach Verfasser von hinreichender Feuchtigkeit, genügender Wärme und der Gegenwart von Mikroben oder deren Fermenten ab.

Foà und Bonome isolierten aus den Organen eines getöteten gesunden Fisches, der 24 Stunden bei 25° C aufbewahrt wurde, *Proteus vulgaris* in

Reinkultur (Baumgartens Jahresberichte, III, 1887), Seite 307).

Bordone-Uffreduzzi wiesen in menschlichen und tierischen Kadavern 12—24 Stunden nach erfolgtem Tode im Blute und in den Körpersäften *Proteus vulgaris* nach (Baumgarten V, 1889, Seite 384).

Doléris und Bourges fanden in fötidem parametrischem Eiter neben Streptokokken auch *Proteus vulgaris* (Baumgarten VIII, 1892, Seite 25).

Boyce und Herdmann konstatierten im Magen von Austern *Proteus* in großer Zahl (Baumgarten XII, 1896, Seite 785).

Wyss stellte *Proteus vulgaris* als Ursache einer Fischseuche im Züricher See fest (Baumgarten XIV, 1898, Seite 610).

Silberschmidt fand *Proteus vulgaris* in einer Fleischwurst, deren Genuß schwere Erkrankungen, z. T. Todesfälle hervorgerufen hatte (Zeitschrift für Hygiene Band 30, Seite 336).

Wesenberg hat *Proteus* aus Fleisch isoliert (Zeitschrift für Hygiene, Band 28, Seite 491).

Pfuhl stellte in einer Rinderwurst, nach deren Genuß 81 Soldaten in Hannover an Brechdurchfall erkrankten, *Proteus* in großer Menge fest (Zeitschrift für Hygiene, Band 34, Seite 265).

Ulrich fand *Proteusbakterien* in rohem Fischfleisch schon bei gewöhnlicher Temperatur.

Im gekochten Fischfleisch vermehrt sich *Proteus* rasch und bedingt früh eintretende Fäulniserscheinungen. (Zeitschrift für Hygiene, Band 53, Seite 192).

Curschmann fand im Stuhl eines durch Genuß von gekochtem „Dörrfleisch“ Erkrankten *Bact. Proteus* in großer Menge.

(Zeitschrift für Hygiene, Band 55, Seite 297).

### B) Morphologie.

Rodet gibt an, daß die *Proteus*bakterien morphologisch die größten Unterschiede zeigen (sehr lange Stäbchen bis Kokken) und daß dieses im allgemeinen bei jeder Art der Fall ist. (Centralblatt für Bakt. Band 18, Seite 499).

Messca führt an, daß die *Proteus*bakterien außerordentlich zahlreiche Geißeln (60—100) besitzen, die dem einzelnen Stäbchen das Aussehen eines „Federbartes“ geben. (Baumgarten VII, 1891, Seite 344, Centralblatt für Bakt. IX, Seite 106).

### C) Biologisches Verhalten.

#### 1. Bewegungsfähigkeit:

Flügge fand viele der Stäbchen in lebhafter Bewegung (Flügge, Mikroorganismen).

## 2. Wachstum:

Im allgemeinen sind alle eiweißhaltigen Substrate für das Wachstum der Proteusbakterien sehr günstig.

Das Wachstum der Proteusbakterien auf den verschiedenen Nährböden wird von Lehmann und Neumann (Lehrbuch der Bakterien) wie folgt beschrieben:

Auf Schrägagar bilden sie schleierartige, dünn durchscheinende, saftig glänzende Beläge, mit stark getrübbtem Kondenswasser und gelblich-weißem Bodensatz.

Die Agarstichkultur ist uncharakteristisch, fadenförmig, die Auflage grau, schleimig, saftig, durchscheinend.

Auf Kartoffeln entwickeln sie sich sehr spärlich. Milch koaguliert nach 2—3 Tagen, wird aber später wieder verflüssigt.

Gelatine: Siehe Flügge, Mikroorganismen, ebenso Bouillon.

Bezüglich des Zusatzes von Kupfersulfat zu Nährböden mögen hier einige Angaben folgen, die für meine eigenen Versuche mit  $\text{CuSO}_4$  von Wichtigkeit sind.

Lehmann fand, daß die größte Cu-Menge, die man den Nahrungsmitteln zusetzen kann, ohne daß dieselben durch den spezifisch toxischen Cu-Geschmack ungenießbar werden, folgende Grenze hat:

In 300 ccm Suppe 20 mgr.; in 1 Liter Wein, der in einem Kupfergefäße stand, 50 mgr.; in 50 ccm Essig, der ebenfalls in einem Kupfergefäße stand 10 mgr.; in 50 gr. Fett, das zum Braten diente 5 mgr.; in 200 gr. sehr stark gekupferter grüner Erbsen 50 mgr.; in 500 gr. stark kupferhaltigen Bratens 60 mgr. (Centralblatt für Bakteriologie Band XVIII, 1007, 199).

J. Belser führt an, daß, um das frische Aussehen, welches die grünen Gemüse beim Kochen verlieren, wieder herzustellen, dem Kochwasser eine geringe Menge Kupfersulfat zugesetzt wird.

Weiterhin erwähnt er die Angaben von Tschirch, daß auf 60—70 Kilogramm Gemüse 30—70 Gramm Kupfersulfat und 100 Liter Wasser verwendet werden und daß sich bei Kupferanwesenheit das brillantgrüne Kupfersalz der Phyllocyaninsäure ( $C_{24}H_{27}N_2O_4$ )<sub>2</sub>Cu bildet, welches hauptsächlich die Erhaltung der grünen Farbe bedingt.

Verfasser bespricht die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung und bemerkt, daß Landmann dem Bacillus botulinus die Schuld beimißt, während die Konservenzzeitung (1904, Nr. 6, 7 und 8) Proteus vulgaris und mirabilis verantwortlich macht. (Archiv für Hygiene Band 34, 1905, Seite 107).

3) Chemische Eigenschaften:

a) Vergärung von Zucker.

Über das Verhalten der Proteen in zuckerhaltigen Nährböden gibt Weber an, daß von seinen 3 Stämmen (einer aus perityphlitischem Eiter, zwei aus Hackfleisch gezüchtet), ein Stamm Rohr- und Traubenzucker in Bouillon vergärte, während der andere Stamm nur Traubenzucker und der letzte keine Zuckerarten zu vergären im Stande war. Bei weiterer Züchtungsart erwarben die letzteren Stämme die gleiche Gärfähigkeit wie der erste Stamm. (Baumgarten, Jahresberichte, Band XIX, 1903, Seite 545).

F. Kuhn stellte fest, daß *Proteus vulgaris* bei Gegenwart von Traubenzucker Eiweißkörper nicht angreift. Er zersetzt nur den Zucker und bildet daraus eine Säure, um selbst in kurzer Zeit zu Grunde zu gehen. In mehr concentrirten Zuckerlösungen (bis 50%) vermehrt sich *Proteus* sehr langsam, lebt aber auch darin viel länger.

Dieses Verhalten scheint durch viel geringere Säurebildung bedingt zu sein. Zuckerhaltige Gelatine wird langsam bzw. gar nicht verflüssigt. In Milch ruft *Proteus* keinen Gestank, sondern einen angenehmen, rahmkäseartigen Geruch hervor. Die Milch wird dabei dick und reagiert sauer. (Centralblatt für Bakt. XI, Seite 568).

Im Centralblatt für Bakt. XIV, Seite 866 findet sich eine Angabe, daß *Proteus vulgaris* keine Milchsüßgärung hervorruft.



Lehmann und Neumann machen in ihrem Lehrbuch (pag. 281) über die Gasbildung folgende Angaben: „Gas- und Säurebildung aus Kohlehydraten: Bildet aus Traubenzucker reichlich Gas, nach Th. Smith aus Rohrzucker noch mehr, aus Milchsucker nicht. Nach Smith besteht das Gas  $\frac{1}{3}$  aus  $\text{CO}_2$ , zu  $\frac{2}{3}$  aus  $\text{H}_2$ . Auf Zuckernährböden fehlt jeder Fäulnisgeruch.“

b) Indolbildung:

Weber fand bei weiterer Untersuchung seiner oben erwähnten 3 Stämme, daß Stamm A nur Nitrit, Stamm C nur Indol, Stamm B weder das eine noch das andere bildete. (Baumgarten, XIX, 1903, Seite 545).

Lehmann und Neumann (Seite 281) bezeichnen die  $\text{H}_2$  S- und Indolbildung als reichlich.

F. A. Steensma fand auf Grund spektralanalytischer Untersuchungen, daß der *Proteus vulgaris* kein Indolbildner sei. (Centralblatt für Bakt. XLI, Seite 296).

c) Bildung stickstoffhaltiger Basen.

Carbone fand, daß in ältern, auf sterilisiertem Fleisch gezüchteten Kulturen von *Proteus vulgaris* neben Aethylen, Aethylendiamin, Gadinin und

Trimethylamin auch Cholin in reichlicher Menge gebildet wird. (Baumgarten VI, 1890, Seite 397).

d) Schwefelwasserstoffbildung.

Zum Nachweis von  $H_2S$  benutzte Stagnitta-Balistreri die von Fromme angegebene Eisengelatine (Zusatz von Eisensaccharat oder weinsaurem oder essigsauerm Eisen) zu gewöhnlicher Nährgelatine. Unter sämtlichen zur Untersuchung gelangten Bakterienarten ergab *Proteus vulgaris* hierbei die stärkste Reaktion. (Baumgarten IX, 1893, Seite 428, ferner: Centralblatt für Bakt. XIII, Seite 756).

e) Beziehungen zur ammoniakalischen Harnzer-  
setzung:

Brodmeier wies nach, daß *Proteus vulgaris* ein energischer Harnstoffzersetzer ist. (Centralblatt für Bakt. XVIII, Seite 380, ferner Baumgarten XI, 1895, Seite 429).

f) Einfluß von Kohlensäure und Leuchtgas:

Die im Soda- und Selterswasser befindliche Kohlensäure, ebenso Leuchtgas, sollen für *Proteus* nicht wachstumshemmend sein. (Centralblatt für Bakt. IX, Seite 111 und VIII, Seite 24).

g) Entwicklungshemmend wirken nach Claudio Fermi folgende Stoffe:

Salzsäure in 10, —5— und 2 %iger, Borsäure in 4 %iger, Milch-, Citronen-, Wein-, Oxalsäure in

10 %iger Lösung, ferner Normalalkali. (Centralblatt für Bakt. XXIII, Seite 212).

#### D) Immunität.

Foà und Bonome gelang es, durch Verimpfung sterilisierter oder durch Filtration bakterienfrei gemachter Kulturen von *Proteus vulgaris* (Hauser) Kaninchen gegen die Einwirkung virulenter Kulturen des *Proteus capsulatus* immun zu machen und umgekehrt. (Baumgarten, Jahresberichte IV, 1888).

Dieselben Forscher erzielten durch Injektion eines Gemisches von Cholin und Neurin bei Kaninchen Unempfindlichkeit gegen die Wirkung von *Proteus vulgaris*. (Baumgarten VI, 1890, Seite 397).

Ferner konnten die Autoren vermittelt intravenöser Injektion von Blut, das von Kaninchen stammte, welche einer Infektion mit *Proteus vulgaris* erlegen waren, andere Kaninchen gegen die Impfung mit virulenten Kulturen refraktär machen.

Derselbe Erfolg trat ein, wenn statt des Blutes filtrierte Kulturen benutzt wurden. (Centralblatt für Bakt. V, Seite 806; Zeitschrift für Hygiene V. 1889).

Carbone injizierte Tiere mit den unter c (Bildung stickstoffhaltiger Basen) erwähnten Basen und erreichte dadurch Immunität gegen *Proteus vulgaris*. (Baumgarten VI, 1890, Seite 397).

Klein fand, daß durch Injektion geringer Mengen gekochter Bouillonkulturen von *Proteus vulgaris* Meerschweinchen, welche mit virulentem *Proteus vulgaris* infiziert waren, völlig immun gegen dieses Bakterium wurden. (Baumgarten IX, 1893, Seite 428.)

Weber fand, daß bei seinen erwähnten 3 Stämmen den schärfsten Unterschied die Agglutinationsprobe ergab: Immunserum (Hund) von A agglutinierte in stärkerer Verdünnung nur diesen Stamm, ebenso agglutinierte das von B und C gewonnene Serum nur den betreffenden Stamm. Weber schließt daraus, daß *Proteus vulgaris* keine einheitliche Art darstelle, sondern eine Gruppe von Bakterien, wie *Bakt. coli*. (Baumgarten XIX, 1903, Seite 545).

Pfaundler gibt an, daß bei bestehender fieberhafter *Proteus*bacillose die Mischung des Blutserums des Kranken mit einer *Proteus*emulsion das Phänomen der Fadenbildung ergibt, während in nicht fieberhaften Fällen bei der gleichen Versuchsanordnung Agglutinationserscheinungen auftreten. (Centralblatt für Bakteriologie XXIII, 1898).

S. Wolf kommt in Bezug auf die *Proteus*bakterien zu dem Schluß, daß „das Blutserum des *Proteus* immunen Tieres immer nur gegen die Art agglutinierte, mit der das betreffende Tier immunisiert war, niemals gegen die andern Stämme.“ (Centralblatt für Bakt. XXV, 1899, Seite 316.)

In Band IV, Abschnitt XII des großen bakteriologischen Handbuches von Kolle und Wassermann schreibt Paltauf über Agglutination der Proteusbakterien auf Seite 709: „Wolf zeigte für Proteus ein ganz ähnliches Verhalten der Agglutination, wie selbe bei Bac. coli besteht, womit eine allgemeine Serodiagnose für Zugehörigkeit der Art oder für Krankheitsdiagnose ausgeschlossen wäre. . . .“

Nach Rodella wären unter der Bezeichnung Proteus verschiedene Arten zusammengefaßt, daher die verschiedenen Agglutinationsverhältnisse.

Im Nachstehenden gehe ich zu meinen eigenen Untersuchungen über. Wie schon eingangs erwähnt, sollten dabei die aus verschiedenen faulenden Substraten gezüchteten Proteusstämme hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens näher studiert und nach gefundenen Merkmalen klassifiziert werden.

---

## Spezieller Teil.

Zur Gewinnung von Proteusbakterien setzte ich nachstehende Substrate der Fäulnis aus.

A) Fleisch von Säugetieren:

1. Hundeleber, 2. Kaninchenlunge, 3. Kalbfleisch.

B) Taubenfleisch.

C) Fleisch von Fischen:

1. Seefisch, 2. Forelle, 3. Flußbarsch (*perca fluviatilis*).

D) Miesmuschel (*Mytilus edulus*).

E) Wurstwaren:

1. Fleisch- und 2. Leberwurst.

F) Sog. Romatourkäse.

G) Gemüsekonserven:

1. Gelbe Erbsen, 2. Grüne Erbsen, 3. Gelbe Bohnen, 4. sog. Brockelerbsen, 5. Gelbe Rüben, 6. Artischocken.

H) 2 Sputa.

Es scheint mir nicht unwesentlich zu sein, im Nachstehenden einige Angaben über den Ursprung und den Zustand des von mir benutzten Materials vorzuschicken.

Fleisch von Säugetieren, wie Hundeleber und

Kaninchenlunge, beschaffte ich mir im hiesigen bakteriologischen Institut, Kalbfleisch in einer hiesigen Schlächtereier.

Taubenfleisch erhielt ich aus dem hiesigen zoologischen Institut.

Fischfleisch, wie Seefisch und Forelle, entstammten Berner Restaurants, Flußbarsch kam aus dem zoologischen Institut.

Miesmuscheln bezog ich ebenfalls aus dem gleichen Institut.

Sämtliche Fleischsubstrate waren ungekocht und in frischem Zustand.

Die Wurstwaren bezog ich aus einer hiesigen Wursterei, etwa Anfang Juli bei großer Hitze und bemerkte sofort an beiden Würsten einen leichten Fäulnisgeruch; nach etwa 20stündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur steigerte sich der Geruch zur Unerträglichkeit.

Den Romatourkäse (in Südwest-Deutschland auch Elsässerkäse genannt) erhielt ich in einer Berner Delikatesshandlung; er war fast weich, zähflüssig und roch stark.

Gemüsekonserven bezog ich sämtlich aus der Konservenfabrik Devant les ponts bei Metz in Lothringen und zwar verlangte ich sog. „bombierte“ Büchsen, d. h. solche mit konvexen Deckeln. Diese Erscheinung läßt stets mit Sicherheit darauf schließen,

daß der Inhalt der Büchse nicht genügend sterilisiert war und unter starker Gasbildung in Zersetzung begriffen ist. Sämtlichen Büchsen entströmte beim Eröffnen unter starkem Druck Gas und Flüssigkeit; während den aus den Büchsen mit gelben Rüben, Spargeln und Artischocken entweichenden Gasen keinerlei unangenehmer insbesondere widriger Geruch anhaftete, verbreiteten hingegen Erbsen und Bohnen einen penetranten Gestank nach Indol und Schwefelwasserstoff.

Sämtliche Gemüsekonserven sahen im übrigen normal aus.

Die Sputa entstammten der Berner medizinischen Klinik und wurden mir von Herrn Dr. Tomarkin, dem damaligen Leiter der Untersuchungsstation des bakteriologischen Institutes, übergeben, da er darin *Proteus vulgaris* nachweisen konnte.

## II. Vorbereitung der Substrate.

Um das Material zur Fäulnis zu bringen, wurden die einzelnen Substrate in kleine offene Petrischalen verteilt, dieselben in eine feuchte Kammer — eine Koch'sche Schale mit angefeuchtetem Filtrierpapier in mehrfacher Lage am Boden — eingeschlossen und bei Bruttemperatur aufbewahrt.

Das Taubenfleisch wurde direkt in einer zugedeckten Petrischale exponiert.

Die Vorbereitung der Gemüsekonserven geschah in gleicher Weise wie bei den Fleischproben, nur wurde hier von denjenigen Büchsen, die schon beim Eröffnen einen unangenehmen fäulnisartigen Geruch verbreiteten, sofort eine Verimpfung auf verschiedene Nährböden vorgenommen.

Einige Fleisch- und Gemüseproben setzte ich zum Teil in den Tierställen, zum Teil in einer Waschküche aus.

Diese sämtlichen Proben mit Ausnahme einer Kalbfleischprobe, die sich in der Waschküche befand, waren bald von dichtem Schimmelpilzrasen überwuchert und konnten nicht weiter benutzt werden. Einzig die Kalbfleischprobe zeigte typische Fleischfäulnis, was vielleicht dem Umstand zuzuschreiben ist, daß in dem betreffenden Raume eine sehr feuchte warme Luft herrschte, die die Fäulnis wohl begünstigte. So soll nach Baltzer auf Gletschern deshalb keine Kadaverfäulnis eintreten, weil die Luftfeuchtigkeit vom Gletschereis absorbiert wird.

Fleisch- und Leberwurst und Romatourkäse wurden in der feuchten Kammer bei gewöhnlicher Temperatur (etwa 25° Réaumur) ausgesetzt.

### III. Mikroskopische Untersuchung der Substrate vor der Fäulnis.

Da die Substrate unter A, B und C (Fleisch von Säugetieren, Taube und Fischen) frisch waren

und das Substrat D (Miesmuschel) im lebenden Zustande erhalten war, so wurde von einer mikroskopischen Voruntersuchung abgesehen.

In den beiden erwähnten Sputis fanden sich mikroskopisch grampositive Stäbchen.

Ebenso ergaben Ausstrichpräparate der beiden Wurstproben neben zahlreichen Kokken einige gramfärbbare Stäbchen. Im Romatourkäse konnten vor der Fäulnis keine Stäbchen, sondern ausschließlich Kokken konstatiert werden.

Die Gemüsekonserven verhielten sich wie folgt:

Die übelriechenden Sorten (Erbsen und Bohnen) zeigten neben einer großen Anzahl Kokken vereinzelte grampositive Stäbchen.

Die Spargel-Artischocken- und gelbe Rübenbüchsen enthielten nur Kokken in großer Menge, jedoch keine Stäbchen.

#### IV. Beschaffenheit der Präparate während der Fäulnis.

Etwa 24 Stunden nach der Fäulniseinwirkung verbreiteten die Fleischproben typischen Fäulnisgeruch, nach weitem 24—30 Stunden ging die natürliche Fleischfarbe nach und nach in ein schmutziges Grau über. Die Oberfläche wurde nach einigen Tagen (es bezieht sich dies hauptsächlich auf die

Proben im Brutschrank) breiartig weich; diese Aufweichung ergriff immer tiefere Gewebeschichten, bis nach 3—4 Wochen in den Schälchen nur noch eine schmutzige, übelriechende Flüssigkeit vorhanden war. Ähnliches Verhalten zeigte die Käseprobe. Die Miesmuschel wurde unter gleichen Erscheinungen in etwa 1—1½ Wochen zerstört. Wesentlich anders verhielten sich die Gemüsekonserven, indem Form und Farbe wenig verändert wurden und die eingetretene Fäulnis sich bloß durch den Gestank verriet.

Die Fleischwurst wurde nach zweimal 24 Stunden grau und roch penetrant, während die Leberwurst sich äußerlich wenig veränderte. Es sei hier vorausgeschickt, daß beide Wurstproben nach 24 stündiger Einwirkung der Fäulnis beinahe Reinkulturen von *Proteus vulgaris* lieferten. Die beiden Sputa wurden ohne weitere Vorbereitung sofort zu Kulturzwecken benutzt.

#### V. Methode der Reinzüchtung.

Die Reinzüchtung der Bakterien aus den faulenden Substanzen geschah in folgender Weise:

Gleich nach Auftreten des Fäulnisgeruches wurde von dem Material eine Probe entnommen, in Nährbouillon übertragen, 10—15 Minuten kräftig geschüttelt und mit der Aufschwemmung eine größere An-

zahl Agarplatten nach dem Verdünnungsprinzip beschickt. Nach eingetretenem Wachstum wurden isolierte Kolonien abgestochen und falls sie mikroskopisch Stäbchen zeigten, in weitem Verdünnungen auf Agar und in Gelatine verimpft.

Ergab sich am Schlusse eine Reinkultur grampositiver Stäbchen, die die Gelatine verflüssigten und in Bouillon Trübung und fauligen Geruch verursachten, so wurde dieselbe als *Proteus* betrachtet.

Nach dieser Methode gelang es mir, aus den beiden Sputis, der Fleisch- und Leberwurst in relativ kurzer Zeit Reinkulturen von *Proteus* zu erzielen, während bei den andern Materialien dieses Verfahren nicht zum Ziele führte und deshalb etwas modifiziert werden mußte. Diese Modifikation bestand darin, daß von den Agarkulturen, die vermittelt der Schüttelbouillon gewonnen waren, zunächst Ausstriche auf Gelatineplatten vorgenommen wurden, um nach stattgefundener Entwicklung die aufgegangenen verflüssigenden Kolonien auf Schrägagar zu übertragen.

Vermittelt dieses Verfahrens gelang es mir, auch von diesen Substanzen in verhältnismäßig kurzer Zeit Reinkulturen von *Proteus* zu erhalten.

## VI. Das Vorkommen von *Proteus* und andern Fäulnisbakterien in den faulenden Substraten.

Die Fleischsubstrate ergaben in den ersten Tagen der Fäulnis an ihrer Oberfläche eine reichliche Ausbeute an Proteen. Bei zunehmender Fäulnis überragten jedoch an der Oberfläche die Kokken, während in tiefern Schichten vorwiegend Stäbchenbakterien festgestellt werden konnten. Das läßt darauf schließen, daß die Proteen bei dem Fäulnisvorgang von der Oberfläche nach dem Innern vordringen.

In der oben erwähnten resistierenden schmutzigen grauen Flüssigkeit waren Proteen nicht mehr nachzuweisen.

### Gemüse-Substrate.

Nach dem Öffnen der Erbsen- und Bohnenbüchsen wurden sofort Gelatinestichkulturen angelegt, da der widrige Geruch intensive Fäulnis verriet. Es trat denn auch Verflüssigung der Kulturen ein, auch verbreiteten sie nach einigen Tagen einen typischen Fäulnisgeruch. Nach zweitägiger Einwirkung der feuchten Wärme im Brutschrank wurden aus diesem Material nach oben beschriebenen Züchtungsverfahren Reinkulturen von *Proteus* erzielt.

Wesentlich anders verhielten sich dagegen Spargeln, Artischocken und gelbe Rüben. Die Spargeln ver-

breiteten beim Öffnen der Büchse einen starken Geruch nach Asparaginsäure, was als ein Zeichen der Zersetzung zu betrachten ist. Asparaginsäure tritt bekanntlich nach Spargelgenuß im menschlichen Harn in reichlicher Menge auf und kann schon durch den Geruch nachgewiesen werden.

Weder von Spargeln, noch von den Artischocken-substraten konnten Proteen gezüchtet werden; selbst reichliche Aussaat von *Proteus* ging auf diesen Substraten in kurzer Zeit zu Grunde.

Wahrscheinlich beruht diese Erscheinung, neben der Einwirkung der Asparaginsäure an sich, noch auf dem Umstande, daß mit der Bildung dieser Säure als Spaltungsprodukt der Eiweißkörper den Bakterien zugleich der wichtigste Nahrungsstoff entzogen wird. (Siehe Bernthsen, Lehrbuch der organischen Chemie, 8. Auflage, Seite 254).

Dasselbe Verhalten zeigten auch die Artischocken-substrate. Dagegen ließ sich auf den gelben Rüben nach zweitägigem Aufenthalt in der feuchten Kammer *Proteus*, wenn auch nur in geringer Menge, nachweisen, während dieser Nachweis sofort nach dem Öffnen der bombierten Büchsen nicht gelang.

Die Gewinnung von *Proteus*-Reinkulturen aus gelben Rüben bot die größten Schwierigkeiten, da keine Verflüssigungszentren auf den mit Schüttelbouillon geimpften Gelatineplatten auftraten; erst als

das Substrat direkt auf die Platten verimpft wurde, zeigten sich wenig umfangreiche Verflüssigungsstellen in geringer Zahl. Nach etwa 48 stündigem Wachstum konnte hieraus die Reinzüchtung von Agarkultur ohne erhebliche Schwierigkeiten bewerkstelligt werden.

Dieser Teil meiner Untersuchungen hat ergeben, daß in allen Substraten nur eine Art von Bazillen nachzuweisen war, nämlich grampositive Stäbchen von 3—4  $\mu$  Länge, die die Gelatine stark verflüssigten und unter Fäulnisgeruch zersetzten und die in der Nährbouillon intensive Trübung hervorriefen.

Neben diesen Stäbchen waren nur Kokken anzutreffen. Als die günstigsten Substrate für diese Stäbchen erwiesen sich die verschiedenen Fleisch- und Wurstsorten, sowie die Miesmuschel, weiterhin kommen die Käseprobe und die Sputa in Betracht. Am ungeeignetsten waren die Gemüseproben und zwar in der Reihenfolge Erbsen, Bohnen, gelbe Rüben.

Spargeln und Artischocken versagten vollständig.

#### VII. Die biologischen Eigenschaften der von den verschiedenen Substraten gewonnenen Fäulniserreger.

Nach den Ausführungen in Abschnitt VI kam nur eine Art von Fäulniserregern in Betracht und es war zu entscheiden, ob es sich dabei um *Proteus vulgaris*, *Pr. Zenkeri* oder *Pr. mirabilis* handelte.

Die Prüfung der von den verschiedenen Substanzen erhaltenen Reinstämme erstreckte sich auf folgende Momente.

a) Mikroskopische Untersuchung.

Färbbarkeit (Methylenblau, Carbolfuchsin, Gram, Neißer).

Beweglichkeit, Wachstum auf Agar (Stich und Platte) auf Gelatine (Stich und Platte) in Nährbouillon, in Milch, auf Kartoffeln, auf Drygalski-Endo- Curcuma- und Methylorangeagar (Stich und Platten), und in Curcuma- und Methylorangebouillon.

b) Chemisches Verhalten.

Gasbildung in zuckerhaltigen Nährsubstraten.

Prüfung auf N-haltige Spaltungsprodukte.

Indolbildung.

Reaktion der Gelatine- und Bouillonkulturen.

Untersuchung auf Salpetersäure mit Diphenylamin.

c) Wachstum der Reinstämme auf Agarplatten, welche mit Kupfersulfat versetzt wurden.

d) Tierversuche (Immunität).

e) Anhang: Einwirkung der Bakterien der Proteus- und Coligruppe auf Methylorange.

A) Mikroskopische Untersuchungen.

a) Methylenblaufärbung: 1. Junge (24 Stunden alte) Kulturen bildeten stets lange, sich kreuzende

Ketten und Fäden, welche manchmal knäuelartig verschlungen waren. 2—4 Tage alte Kulturen boten stets ein wesentlich anderes Bild, indem anstatt der Ketten lauter einzelne Stäbchen von durchschnittlich 3—4  $\mu$  Länge vorhanden waren.

2—3 Wochen alte Kulturen zeigten mit Methylenblau gefärbt allerlei Involutionsformen, meistens hatten die Bakterien unförmliche Verdickungen an beiden Enden oder sie boten auch auffällige Krümmungen dar; einen Monat alte und noch ältere Kulturen zeigten deutlichen Zerfall in kokkenartige Gebilde. Über ihre Regenerationsfähigkeit bei Übertragung auf frische Nährböden wird später berichtet werden.

b) Färbungen mit Carbofuchsin ergaben dasselbe Resultat wie mit Methylenblau; da die mikroskopischen Untersuchungen mit Methylenblau und Carbofuchsin stets gleichzeitig gemacht wurden, sei hier von jeder Reinkultur das Einzelresultat angegeben.

1. Hundeleber. Meth. blau und Karbofuchsin: 24 Stunden alte Kulturen: Ketten- und fadenförmige, vielfach knäuelartig verschlungene Bazillen; 2 Tage alte Kulturen: Einzelstäbchen von 3—4  $\mu$  Länge.

Involutionsformen nicht untersucht.

2. Kaninchenlunge: Dieselben Bilder wie bei der Hundeleber.

3. Kalbfleisch wie oben.

4. Fleischwurst wie oben.

Als Involutionsformen ergaben sich stark deformierte Individuen.

5. Leberwurst wie Fleischwurst.

6. Forelle: Dasselbe.

7. Flußfisch (Barsch): Dasselbe.

8. Seefisch: Dasselbe.

9. Sputum I: Dasselbe.

10. Sputum II: Dasselbe.

11. Miesmuschel: Dasselbe.

12. Taubenfleisch: Dasselbe.

13. Gelbe Erbsen: Dasselbe.

14. Grüne Erbsen: Dasselbe.

15. Gelbe Bohnen: Dasselbe.

16. Gelbe Rüben: Dasselbe.

17. Brockelerben: Dasselbe.

18. Käse: Dasselbe.

c) Färbungen nach Gram:

Sämtliche Reinstämme erwiesen sich bei der Färbung nach Gram als deutlich positiv; sie zeigten im Jugend- und vorgerückteren Stadium dieselben mikroskopischen Bilder wie bei der direkten Färbung.

d) Untersuchungen auf Beweglichkeit:

Verwendet wurden stets 18stündige Kulturen; zuerst zeigten sich im hängenden Tropfen bei sämtlichen Stämmen lange fadenartige Gebilde, die sich

träge bewegten; nach 1—2 Minuten konnte man jedoch beobachten, wie diese Fäden in kürzere Abschnitte zerfielen, welche sich, wenn auch noch etwas träge, so doch bedeutend lebhafter bewegten, als die ursprünglichen Ketten. Diese verkürzten Fäden rissen nach einigen Sekunden wieder ein und nach 3—4 Minuten hatten sie sich in lauter Einzelindividuen aufgeteilt, welche mit lebhaft schlängelnden, aalartigen Bewegungen im Tropfen umherschwammen. Innerhalb 5 Minuten trat allmählich eine Verlangsamung der Bewegung ein.

Die Entstehung der fadenförmigen Gebilde ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Einzelindividuen im Jugendstadium mit den Polgeißeln zusammenhängen und auf diese Weise lange Ketten bilden.

e) Als eine für *Proteus* noch nicht angewandte Färbungsmethode kam die Körnchenfärbung nach Neißer hinzu. Nach einigen vergeblichen Versuchen, die angegebenen Zeiten bei der Färbung einzuhalten, fand ich, daß eine Vorfärbung von 5—6 Sekunden mit essigsaurem Methylenblau und eine Vesuvinafärbung in der Dauer von 4—5 Sekunden die besten Resultate ergaben.

Dabei zeigte sich ferner, daß die Verwendung einer gewöhnlichen, 50%igen Essigsäure (in doppelter Quantität) statt des Eis-Essigs das Färbungsvermögen nicht im geringsten beeinträchtigte.

Resultate der Neißer'schen Polfärbung:

- Stamm 1: nach Neißer färbbar (Hundeleber).
- Stamm 2: nach Neißer färbbar (Kaninchenlunge).
- Stamm 3: nach Neißer färbbar (Sputum I).
- Stamm 4: nach Neißer färbbar (Seefisch).
- Stamm 5: nach Neißer färbbar (Kalbfleisch).
- Stamm 6: nach Neißer färbbar (Forelle).
- Stamm 7: nach Neißer färbbar (Sputum II).
- Stamm 8: nach Neißer färbbar (gelbe Erbsen).
- Stamm 9: nach Neißer färbbar (Flußfisch).
- Stamm 10: nach Neißer färbbar (Miesmuschel).
- Stamm 11: nach Neißer färbbar (gelbe Erbsen).
- Stamm 12: nach Neißer färbbar (gelbe Rübe).
- Stamm 13: sehr gut gefärbt (gelbe Bohnen).
- Stamm 14: sehr gut gefärbt (grüne Erbsen).
- Stamm 15: färbbar (Taubenfleisch.)
- Stamm 16: färbbar (Leberwurst).
- Stamm 17: färbbar (Fleischwurst).
- Stamm 18: färbbar (Käse).

Bei Anwendung der üblichen Zeitdauer von 1—3 Sekunden für essigsaures Methylenblau und 4—5 Sekunden für Vesuvin wurde die Methylenblaufärbung durch die braune Farbe des Vesuvins zugedeckt.

### Kontrolle:

Ehe ich zu der speziellen biologischen Prüfung der von mir aus den verschiedenen faulenden Substanzen gewonnenen Reinstämme übergehe, wäre noch die Frage vorerst zu erörtern, ob es sich dabei um echte Vertreter der Proteusgruppe handelte.

Zu diesem Zwecke wurde folgender Kontrollversuch angestellt.

Je ein Stückchen möglichst fettfreien Fleisches wurde in einem Petrischälchen 30 Minuten lang bei 110° Celsius im gespannten Dampf sterilisiert, nach dem Erkalten mit den betreffenden Stämmen geimpft und bei 37° bebrütet. Die weitem Überimpfungen geschahen nach üblichen Prinzipien und ergaben überall typische Vertreter der Proteusgruppe.

Bemerkt sei noch, daß beim Entnehmen der Proben von den Fleischstückchen stets darauf geachtet wurde, die Entnahme möglichst entfernt von der Stelle, an der der ursprüngliche Ausstrich der Kultur sich befand, zu bewerkstelligen.

### B) Kulturelles Verfahren. Prüfung der Reinstämme.

a) Schrägagar. 1. Wachstum durchweg sehr gut; bei Schwemmkulturen (Methode Schottelius) waren die rasenförmigen Beläge gleichmäßig, von

schmutzig weißer Farbe; Kondenswasser stets stark getrübt mit Bodensatz. Mit zunehmendem Alter ging die Farbe der Kulturen in eine graue über; auch die Nährböden nahmen eine dunklere Färbung an, indem das Gelbgrau des sterilen Schrägagars in ein Rehbraun überging.

2. Auf Agar in Petrischalen breitete sich das Wachstum in 3 Tagen derart aus, daß die gesamte Nährfläche von einer dicken homogenen Schicht überzogen war.

3. Agarstich. Der Stichkanal schmal, nur wenig verästelt; nach durchschnittlich 3 Tagen bildete sich um die Einstichstelle ein etwa 1 mm dicker flacher Belag, während in der Tiefe das Wachstum sehr gering war.

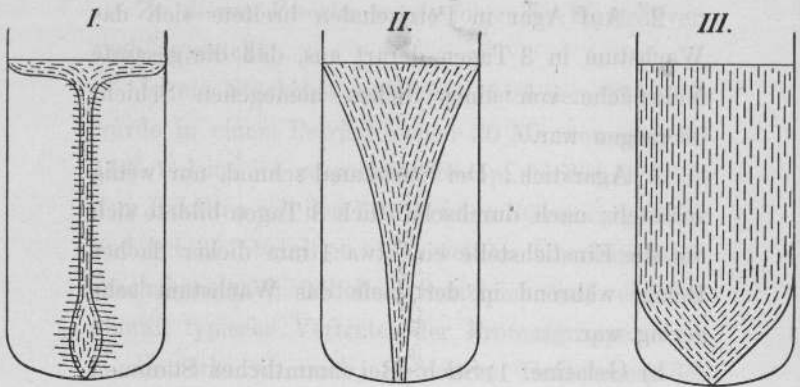
b) Gelatine. 1) Stich. Bei sämtlichen Stämmen zeigten sich nach 2 mal 24 Stunden am Einstich flache Verflüssigungsschalen, während der Stichkanal feine Verästelungen anwies, die durchschnittlich am Ende desselben länger waren als in der Mitte.

(Siehe Abbildung 1).

Nach weitem 2—3 Tagen bildete sich ein Verflüssigungstrichter (siehe Abbildung 2) und nach 6—7 und mehr Tagen hatte die Verflüssigung die gesamte Gelatine ergriffen (Abbildung 3).

In diesem Stadium verbreitete der Nährboden bei starker Trübung einen widerwärtigen Fäulnisgeruch.

2. Gelatineplatten. Hier zeigten sich nach 2 mal 24 Stunden in der Regel etwa 2—5 flache Verflüssigungsstellen von 0,5 cm im Durchmesser, welche sich rasch vergrößerten, so daß nach einer Woche die Platte vollkommen verflüssigt war und dabei einen außerordentlich penetranten Fäulnisgeruch verbreitete.



c) Nährbouillon. Nach 24 Stunden lebhaftere Trübung, dicker, schleimiger Bodensatz und leichter Fäulnisgeruch, der allmählich zunahm.

d) Milch. Nach 24 Stunden beginnende, nach 3 mal 24 Stunden vollendete Coagulation.

Die Milchkulturen nahmen eine dunklere Färbung an, die ins gelbliche spielte. Reaktion: schwach alkalisch.

e) Kartoffel. Hier war durchwegs, wohl wegen der Eiweißarmut dieses Substrates, das Wachs-

tum ein sehr spärliches. Der Belag hatte ein schmutziges, grüngraues Aussehen und eine schleimige Konsistenz.

f) Drygalskiagarplatten.

Ihre Herstellung geschah genau nach den im Lehrbuche von Kolle-Hetsch enthaltenen Angaben (s. Seite 563).

Das Wachstum aller Stämme war auf diesem Nährboden ein ausgezeichnetes, so daß nach 3-tägiger Bebrütung die Platten vollkommen überwuchert waren. Ein Farbenumschlag fand nicht statt.

g) Fuchsinagarplatten nach Endo waren ebenfalls nach den Angaben des Lehrbuches von Kolle-Hetsch (s. Seite 564) hergestellt, nur mit der Modifikation, daß statt der vorgeschriebenen Menge von 10 ccm 1% iger Fuchsinlösung nur 5 ccm verwendet wurden.

Benutzt man nämlich die vorgeschriebene Quantität Farbstoff, so dunkeln die Platten ziemlich rasch nach, was bei Verwendung einer geringern Menge Farblösung nicht eintritt.

Auch auf diesen Nährböden ließ die Entwicklung der Stämme nichts zu wünschen übrig. Der Farbstoff blieb auch hier vollkommen unverändert.

Die Beobachtung und Kontrolle dieser Nährböden erstreckte sich auf einen Zeitraum von 12 Tagen.

h) Neutralrotagar (n. Rotberger, modifiziert von Scheffler s. Lehrbuch von Kolle-Hetsch, S. 564).

Die Kulturen wurden als Stich- und Schüttelkulturen angelegt. Bei erstern bildete sich um den Sticheingang ein dichter Belag, während die Schüttelkulturen weder in der Tiefe, noch auf der Oberfläche Wachstum ergaben. Da diese Nährböden vor der Aussaat in einem Wasserbad verflüssigt und auf 45° abgekühlt waren, so ist wohl schwerlich anzunehmen, daß das Ausbleiben des Wachstums auf Temperatureinflüsse zurückzuführen ist. Der Farbstoff der Stichkulturen blieb unverändert. Die Kontrollröhrchen zeigten ebenfalls keine Veränderung.

i) Curcumanährböden.

Diese neuen Versuche wurden in der Erwägung unternommen, daß, wenn säurebildende Bakterien Veränderungen an Nährböden hervorbringen, die mit einem säureempfindlichen Agens imprägniert sind, wie Lackmus, Fuchsin, Neutralrot, solche Veränderungen auch durch Basenbildner an Nährböden hervorgebracht werden können, die mit einem basenempfindlichen Reagens versetzt sind.

Da nun die Gelatine- und Bouillonkulturen sämtlicher Reinstämme stark basisch reagierten, so lagen Versuche mit basenempfindlichen Farbstoffen sehr nahe. Als solche kamen hauptsächlich

lich in Betracht: roter Lackmus, Curcuma und das zu Titrirzwecken viel verwendete Phenolphthalein.

Von rotem Lackmus wurde Abstand genommen, weil durch relativ starken Zusatz von Essigsäure zum Nährsubstrat das Wachstum überhaupt in Frage gestellt schien. Dagegen erschienen sehr geeignet Curcuma und Phenolphthalein, ersteres insbesondere deshalb, weil es ein äußerst empfindliches Reagenz ist auf Ammoniak und organische Stickstoffbasen, wie Amide, Amine und Abkömmlinge des Carbanids.

Die Reaktion tritt in der Weise in die Erscheinung, daß durch Basen der hellgelbe Farbstoff gebräunt wird. Das Curcumin wird aus der Curcumawurzel (Indien, Japan) gewonnen, ist also ein natürlicher Farbstoff bis jetzt unbekannter chemischer Konstitution (Bernthsen 8. Aufl. Seite 260.).

Die Versuche mit Curcuma-Agarplatten wurden zuerst angestellt; dieselben wurden nach der Vorschrift von Kolle-Hetsch für Endonährböden (Seite 564) hergestellt:

Auf 2 Liter Leitungswasser 20 gr. Liebig's Fleisch-extrakt, 10 gr. Kochsalz, 20 gr. Peptonum siccum Witte, 80 gr. Stangenagar. Dieses Gemisch wurde 2 Stunden im Autoklaven bei 110° gekocht, filtriert, mit verd. Essigsäure sorgfältig neutralisiert. Nach der Neutralisation wurden 10 ccm zuerst alkoholischer, später wässriger Curcuma-lösung von 0,1 gr. Curcu-

min zugesetzt, zur Verdampfung des Alkohols wiederum 30 Minuten im Autoklaven bei 100° erwärmt und in Halbliterkölbchen abgefüllt.

Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß das Curcumin sowohl in Alkohol als auch in Wasser schwer löslich ist, in beiden nur bei längerer Erwärmung, aber auch dann bleibt noch etwa  $\frac{1}{4}$  des Materials ungelöst. Es muß deshalb die Farbstofflösung vor Gebrauch gut filtriert werden. Daß die wässrige Lösung der alkoholischen vorzuziehen ist, braucht aus naheliegenden Gründen wohl keiner nähern Erörterung. In Anbetracht der Schwerlöslichkeit des Curcumins ist eine kleine Überschreitung der vorgeschriebenen Mengen statthaft.

#### 1. Agarplatten.

Die ersten Versuche wurden mit 1 gr. Curcuma auf etwa 1 Liter Agar gemacht. Die Platten zeigten den intensiven aromatischen Geruch des Curcumas; Wachstum der Kulturen fand nicht statt. Später wurde die Curcuminmenge auf 0,1 gr. reduziert.

Das Wachstum der Kulturen war jetzt ein ausgezeichnetes. Eine Veränderung des Farbstoffes blieb aus.

#### 2. Gelatinestich.

Die Gelatineröhrchen wurden in der Weise für den Gebrauch präpariert, daß von einer 1%igen wässrigen Curcuminlösung 0,5 ccm jedem Röhrchen

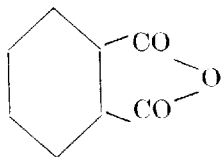
zugegeben und dieselben 15 Minuten bei  $110^{\circ}$  sterilisiert wurden. Nach 4 tägigem Wachstum war Verflüssigung der Gelatine und intensiver Fäulnisgeruch eingetreten. Eine Veränderung des Farbstoffes konnte auch hier nicht wahrgenommen werden.

### 3. Curcumabouillons.

Nach derselben Methode wie die Gelatine hergestellt. Keine Veränderung des Farbstoffes, trotzdem das Substrat sehr kräftige alkalische Reaktion zeigte.

Das zweite für Basennachweis in Betracht kommende Reagenz war Phenolphthalein.

Dasselbe findet bekanntlich in der Acidi- und Alkalimetrie ausgedehnte Verwendung als sehr empfindlicher Indikator auf Alkali; Phenolphthalein ist ein Abkommeling von Phtalsäureanhydrid (siehe die untenstehende Konstitutionsformel), in saurer Lösung ist es farblos, in alkalischer Lösung tritt schöne carminrote Färbung auf, welche durch Austausch zweier Hydroxylwasserstoffe durch Metalle (Na, K, Ca, Ba) hervorgerufen wird. In Wasser ist es unlöslich, dagegen leicht in Alkohol. Wie bei den Ver-



suchen mit Curcuma wurden auch hier Agar-, Gelatine- und Bouillonnährböden benutzt und zu diesen Substraten nach erfolgter genauer Neutralisation 0,2 bis 0,3 ccm Phenolphthaleinlösung zugegeben; nach Verflüchtigung des Lösungsalkohols blieb das Phenolphthalein auch im Nährsubstrat in Lösung. Zur Verdampfung des Lösungsalkohols wurde das Nährsubstrat 15 Minuten im Autoklaven bei 100° erhitzt, alsdann in  $\frac{1}{2}$  Literkölbchen abgefüllt und, wie bei Curcuma, Platten in dicker Schicht gegossen. Auch hier blieb die Farbenreaktion aus, obgleich das Wachstum der Reinstämme ein ausgezeichnetes war.

### 2. Gelatinestich.

Zu jedem Röhrechen wurden 2—3 Tropfen Phenolphthalein beigegeben und die Entfernung des Alkohols durch  $\frac{1}{4}$  stündige Erwärmung im Autoklaven bei 100° bewerkstelligt. Auch hier war das Resultat ein negatives, trotzdem nach 2 Tagen starke Verflüssigung eintrat und Lackmuspapier ausgesprochene alkalische Reaktion zeigte.

### 3. Bouillon.

Die Bouillons wurden in der gleichen Weise vorbereitet wie die Gelatineröhrchen. Auch hier war das Resultat ein negatives.

Reaktion: stark alkalisch.

An diese Versuche mit basenempfindlichen Farbstoffen schlossen sich die Prüfungen mittelst

Methylorange an, die auf besondere Anregung des Herrn Prof. Kollé unter anderm auf die gesamte Proteus- und Coligruppe ausgedehnt wurden.

Die Prüfung umfaßte folgende Bakterienarten.

Proteus vulgaris, Proteus mirabilis (bezogen von Kral in Prag), Subtilis, El Tor, Coli, Typhus und Paratyphus. Die eigentümlichen Reaktionen, welche dabei in den Bouillonnährsubstraten in die Erscheinung traten, sollen gesondert besprochen werden.

### C. Chemisches Verhalten:

Zunächst war festzustellen, ob die gezüchteten Reinstämme gasbildende Eigenschaften besitzen. Die Prüfung erstreckte sich auf die Vergärung von Rohr-, Milch- und Traubenzucker, die den Agar-, bezw. Bouillonnährböden (letztere in Gärkölbchen abgefüllt) in üblicher Weise beigegeben waren.

a) Zuckeragar.

1. Rohrzucker.

Sämtliche 18 Stämme bildeten nach 24 Stunden um den Stichkanal auf der Oberfläche des Nährbodens eine dicke, grauweiße, schleimige Schicht. Geruch war nicht wahrzunehmen. Der Stichkanal war jeweils eng, ohne Verästelungen; Gasblasen fehlten vollständig.

2. Milchzucker. Dieselben Erscheinungen.

3. Traubenzucker. Dasselbe Resultat.

b) Zuckerbouillon.

1. Rohrzucker.

Nach 24 Stunden durchwegs sehr starkes Wachstum und starke Trübung der Nährböden; Gasbildung war nirgends wahrzunehmen, auch nicht nach dreitägiger Brutzeit. Geruch: faulig-stinkend.

2. Milch- und 3. Traubenzucker zeigten dasselbe Verhalten.

c. Da die Versuche mit Curcumanährböden ein positives Resultat nicht ergeben hatten, beschloß ich, die durch die Reinstämme erzeugte Basicität der Nährsubstrate auf rein chemischem Wege qualitativ auszuprobieren. Dies geschah zunächst mit rotem Lackmuspapier, das schon nach etwa 15 Stunden Brutzeit durch Bouillonnährböden intensiv blau gefärbt erschien. Es kam mir hauptsächlich darauf an, die Anwesenheit von N.-haltigen gasförmigen Spaltungsprodukten in den Nährböden durch einen einfachen Versuch festzustellen; zu diesem Zwecke verwendete ich frisch hergestelltes, luftgetrocknetes Curcumapapier, das aus weißem Filtrierpapier, welches mit starker, weingeistiger Curcumalösung imprägniert war, hergestellt wurde. Das Papier hatte eine schöne zitrongelbe Färbung. Die Versuche wurden folgendermaßen angesetzt.

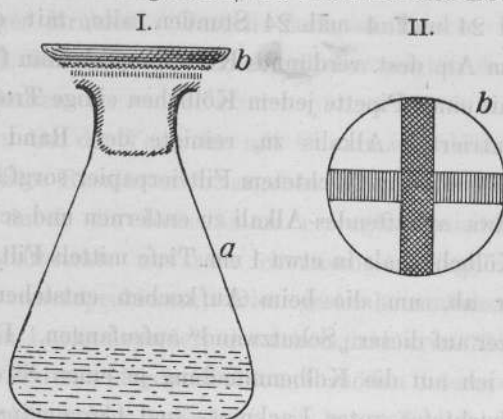
In ein Erlenmeyerkölbchen von etwa 150 cem.

Inhalt wurde ein großer Platinlöffel 3 mal 24 Stunden alter und noch älterer Agarkultur zusammen mit dem Nährsubstrat in destilliertes Wasser eingetragen und der Nährboden unter leichtem Erwärmen gelöst.

Von Gelatine wurden jeweils mehr oder weniger verflüssigte Kulturen verwendet, von Bouillon 24, 2 mal 24 und 4 mal 24 Stunden alte, mit etwa 10 ccm Aq. dest. verdünnte Kulturen. Alsdann fügte ich mit einer Pipette jedem Kölbchen einige Tropfen konzentrierten Alkalis zu, reinigte den Rand des Gefäßes mit angefeuchtetem Filtrierpapier sorgfältig, um etwa anhaftendes Alkali zu entfernen und schloß den Kölbchenhals in etwa 1 cm. Tiefe mittels Filtrierpapier ab, um die beim Aufkochen entstehenden Spritzer auf dieser „Schutzwand“ aufzufangen. Dann legte ich auf die Kolbenmündung je einen Streifen angefeuchtetes rotes Lackmus- und Curcumapapier und zwar gekreuzt und beschwerte die Streifen mit einem Uhrschildchen (siehe Abbildungen I und II).

Bei Zusatz der conc. Alkalilösung handelte ich nach dem alten chemischen Grundsatz: Säuren treiben Säuren aus, Basen treiben Basen aus. Es wird die schwächere Säure von der stärkern, die schwächere Base von der stärkern stets verjagt, zum Teil schon bei gewöhnlicher Temperatur (z. B. H Cl mit conc.  $H_2 S O_4$ ;  $N H_3$  aus seiner wässerigen Lösung mit conc.  $K O H$ ), zum Teil beim Erwärmen. In der

Kälte machte sich bei meinen Reinkulturen keinerlei Reaktion bemerkbar, dagegen zum Teil sehr stark bei nur gelindem Erwärmen, wie unten näher ausgeführt werden soll. Die Erwärmung geschah nur ganz kurze Zeit, und zwar so, daß die Agarlösungen einmal stark aufgeköcht, die Gelatine- und Bouillon-



- a) Kölbchen. — Rot. Lackmus.  
 b) Uherschälchen. ■■■■■ Curcupapier.  
 ■■■■■ Schutzwand.  
 -.-.-.- Flüssigkeit.

lösungen dagegen nur bis zum Kochen erwärmt wurden, da bei letztern die Reaktion bereits bei beginnender Erwärmung je nach dem Alter der Kulturen mehr oder minder stark eintrat.

a) Agar.

Die mit dem Platinlöffel entnommenen Agarproben zeigten durchwegs geringfügige Zersetzung

durch die Bakterien, da die Reagenzpapiere erst nach einmaligem Aufkochen nur schwachen Farbenumschlag zeigten, so daß also Lackmuspapier nur ganz leicht blau, Curcuma hellbraun, mehr ins orangegelbe spielend erschien. Ich richtete beim Entnehmen des Nährsubstrates mein besonderes Augenmerk darauf, nicht tiefere Schichten, sondern die Oberfläche der Agarplatten zu berücksichtigen. Die ungeimpften Kontrollproben veränderten sich nach mehrmaligem Aufkochen die Reagenzpapiere, jedoch nur äußerst schwach.

b) Gelatine.

Die Gelatinesubstrate reagierten durchweg im Gegensatz zu Agar schon bei beginnender Erwärmung insbesondere auf Curcuma sehr stark, ohne daß es nötig gewesen wäre, die Substanzen zum Aufkochen zu bringen. Es beweisen diese Reaktionen eine sehr weitgehende Zersetzung der Nährböden, unter Bildung gasförmiger, stark basischer Zerfallsprodukte, welche intensiv nach altem zersetztem Urin rochen. Die Kontrolle zeigte dieselbe Reaktion wie die Agarkontrolle.

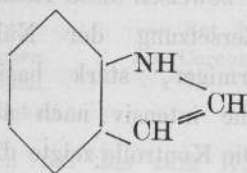
c) Bouillon:

Während die Gelatinesubstrate erst nach mehrtäglichem Wachstum, d. h. erst nach ihrer Verflüssigung, also in stark vorgeschrittenem Zersetzungsstadium, Verwendung fanden, wurden die Bouillon-

kulturen in drei Wachstumsstadien untersucht, nämlich nach 24-, 2 mal 24- und 4 mal 24-stündiger Bebrütung. Die 24 Stunden alten Kulturen waren am schwächsten zersetzt, immerhin jedoch so, daß die Reaktion auf die Reagenzpapiere an der Siedepunktgrenze der Flüssigkeit stark auftrat. In vorgeschrittenem Stadium, nach 2 mal 24- und 4 mal 24-stündigem Wachstum im Brutschrank trat dieselbe lebhaftere Veränderung der Reagenzpapiere schon bei gelindem Erwärmen des Kölbcheninhaltes auf, wie bei den Gelatinekulturen. Die Kontrolle reagierte wie bei Agar und Gelatine nur schwach und erst nach einigem Kochen.

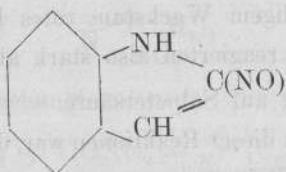
d) Indolbildung.

Das Indol, 1868 von Baeyer entdeckt, hat die Konstitutionsformel:



und bildet einen heterocyclischen Doppelring. Es ist der ständige Begleiter der Albuminfäulnis und durch eine charakteristische empfindliche Reaktion nachzuweisen. Wenn man nämlich indolhaltigen Lösungen salpetrige Säure in Gestalt von deren K-Salz zusetzt,

so entsteht ein roter Niederschlag, welcher aus Nitrosoindol besteht von der Formel:



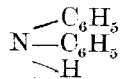
d. h. das H-Atom der den heterocyclischen (Pyrrol)-Ring abschließende C H-Gruppe wird durch eine Nitrosogruppe ersetzt. Ich verwendete zu den Indolnachweisen eine Woche alte Gelatine- und Bouillonkulturen. Das zur Reaktion notwendige salpetrigsaure Kalium erhielt ich aus dem chemischen Laboratorium der Universität Bern. Dasselbe war durch den Vorlesungsassistenten der anorganischen Abteilung, Herrn Dr. Paul Barteczko, vorher auf seine Reinheit geprüft und mir als garantiert chemisch rein übergeben worden. Die verflüssigten Gelatine- und die Bouillon-Nährböden, welche eine Woche lang der Einwirkung der Bakterien ausgesetzt waren, verdünnte ich zur Indolreaktion kräftig mit destilliertem Wasser, säuerte mit verdünnter Schwefelsäure schwach an und setzte alsdann einige Tropfen konzentrierter wässriger Lösung von  $KNO_2$  zu. Sofort bildete sich in allen Fällen der charakteristische rote Niederschlag von Nitrosoindol und zwar trat derselbe sehr kräftig auf.

e) Reaktion.

Die Gelatine- und Bouillonkulturen färbten schon nach 24 stündigem Wachstum rotes Lackmuspapier intensiv blau, reagierten also stark alkalisch.

f) Prüfung auf Salpetersäure.

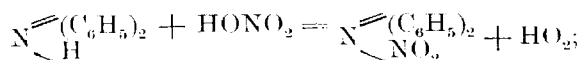
Der Zweck dieser Reaktionen war, die oxydierende Wirkung der Reinstämme zu prüfen; da die Eiweißkörper der Nährböden Stickstoff enthalten, lag im Falle einer oxydierenden Wirkung der Reinstämme die Vermutung nahe, daß sich salpetersaure Salze wie  $\text{Na N O}_3$  bilden könnten. Ich verwendete Bouillonkulturen vom Alter einer Woche und untersuchte dieselben nach folgender Methode: in ein mit wenig konzentrierter Schwefelsäure beschicktes Uherschälchen wurden einige Krystalle Diphenylamin gegeben und in der Säure gelöst. Darauf wurde ein Tropfen der Kulturen mittelst eines dünnen Glasstabes vorsichtig an den Rand der Schwefelsäure gebracht, so daß eine langsame Vermischung eintreten konnte. Wenn nun Salpetersäure in freier oder gebundener Form, wenn auch nur in Spuren vorhanden ist, tritt intensive Blaufärbung des schwefelsauren Diphenylamins auf. Das Diphenylamin hat die Formel:



Bei der Salpetersäure-Reaktion bildet sich jedenfalls Nitrodiphenylamin



nach der Gleichung:



genau ist die Reaktion noch nicht aufgeklärt. Die Untersuchung der sämtlichen 18 Reinstämme auf Salpetersäure ergab negatives Resultat.

D) Wachstum der gezüchteten Reinkulturen auf Agarnährböden, welche mit Kupfervitriol imprägniert waren.

Da beim Kochen von Gemüsen und Früchten für die Konservierung in vielen Fällen der aus Chlorophyll und andern Pflanzenfarben bestehende Pflanzenfarbstoff teils ganz zerstört wird, teils stark verblaßt und die Ware dadurch ein unansehnliches Aussehen erhält, verwenden die Konservenfabriken zur Erzeugung einer leuchtenden Farbe für die Früchte wie Kirschen, Pflaumen etc. unschädliche, substantive Anilinfarbstoffe, d. h. solche Farbstoffe, welche ohne Beizen die Faser färben (z. B. Anilinrot), während zur Wiederherstellung der grünen Farbe, insbesondere von Erbsen und Bohnen, Kupfervitriol ( $\text{Cu S O}_4$ ) in kleinen Portionen Anwendung findet

(siehe Einleitung S. 12). Da mir beim Öffnen der mit grünen Erbsen gefüllten bombierten Büchsen der Umstand aufgefallen war, daß der Inhalt lange nicht in dem Maße widerlich roch, wie die ungefärbten gelben Erbsen, lag die Vermutung nahe, daß das zugesetzte Kupfervitriol hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum ausüben könne. Zur Ermittlung, ob diese Vermutung sich bewahrheite, imprägnierte ich Nähragar mit verschiedenen, genau abgewogenen Quanten von Kupfervitriol, goß davon Platten und machte auf diese Aussaaten meiner Reinstämme. Es war zunächst nötig, zu erfahren, welche Menge des Cu-Salzes die Konservenfabriken zum Zusatz verwenden; auf eine diesbezügliche Anfrage bei der Konservenfabrik *Devant les ponts* bei Metz erhielt ich die Mitteilung, daß der Zusatz 35—40 Gramm auf 100 Liter Wasser betrage. Ich wog nun äquivalente Mengen Kupfervitriol ab und zwar folgendermaßen:

1. 0,0125 gr.  $\text{Cu S O}_4$  : 50 cem Agar, entsprechend 35 gr.  $\text{Cu S O}_4$  : 100 Liter Wasser.
2. 0,02 gr.  $\text{Cu S O}_4$  : 50 cem Agar, entsprechend 40 gr. : 100 Liter aq.
3. 0,025 gr. : 50 cem Agar = 50 gr. : 100 Litter aq.
4. 0,03 gr.  $\text{Cu S O}_4$  : 50 cem = 60 gr. : 100 Liter aq.

5. 0,1 gr., 6. 0,2 gr., 7. 0,5 gr.  $\text{Cu S O}_4$  auf jeweils 50 cem Agar. Zur Aussaat wurden verwendet die Stämme 3, 7, 8, 15, 17.

Die Platten wurden zuerst zugedeckt in den Brutschrank gestellt. Resultate nach 24 Stunden:

Serie 1 (0,0125 gr.  $\text{Cu S O}_4$ ): kein Wachstum.

Serie 2 (0,02 gr.  $\text{Cu S O}_4$ ): kein Wachstum.

Serie 3 (0,025 gr.  $\text{Cu S O}_4$ ): kein Wachstum.

Serie 4 (0,3 gr.  $\text{Cu S O}_4$ ): kein Wachstum.

Serie 5 (0,1 gr.  $\text{Cu S O}_4$ ): kein Wachstum.

Serien 6 und 7: kein Wachstum.

Nun wurden die Platten geöffnet in den Brutschrank gestellt und nach 2 mal 24 Stunden kontrolliert.

Resultate: Serie 1: starke Schimmelpilzbildung.

Serie 2: starke Schimmelpilzbildung.

Serie 3: schwache Schimmelpilzbildung.

Die übrigen Serien wiesen überhaupt kein Wachstum auf.

Kontrollplatten: Ausgezeichnetes Wachstum aller Reinstämme.

Es liegt nun die Frage nahe:

Woher kommt es, daß in den mit Kupfersulfat imprägnierten Erbsen Proteen sich lebensfähig erhalten hatten, während auf keiner der Kupfersulfatplatten Wachstum vorhanden war? Die Frage kann dahin beantwortet werden, daß das Wasser, in dem

die Erbsen mit Kupfersulfat zusammen gekocht werden, weggegossen wird und die Erbsen nochmals gründlich abgospült werden, ehe sie in die Konservbüchsen wandern.

Weitaus das meiste Kupfersulfat wird mit dem Kochwasser, in dem es in Lösung bleibt, weggegossen und nur ein geringer Bruchteil des Salzes dringt in das Gewebe der Gemüse ein. Dieser Bruchteil ist dann nicht mehr im Stande, die Entwicklung von Bakterien ganz hinten zu halten.

Es ist also der Kupfersulfatzusatz in dieser geringen Quantität einerseits für den Konsumenten unschädlich, andererseits beeinträchtigt er das Bakterienwachstum, wenn er es auch nicht ganz zu verhindern vermag.

#### E. Tierversuche.

Die Tierversuche wurden mit den Stämmen 4 und 17 gemacht; für jeden Stamm wurden drei Kaninchen verwendet, von denen zwei durch Tod ausschieden, so daß zuletzt 4 Versuchstiere in Betracht kamen. Die Versuche erstreckten sich auf Immunisierung und Serumgewinnung. Zu diesem Zwecke wurden Aufschwemmungen der Kulturen in physiologischer Kochsalzlösung (0.7 gr. Na Cl : 1 Liter aq. dest.) gemacht und 30 Minuten bei 70° C erwärmt. Nach dem Erkalten erhielten

die Tiere eine Injektion von je 1 ccm dieser Aufschwemmungen in die Ohrvene.

Die Dosen waren folgende:

1. Injektion (11. I. 07): Tier 1 : 1 Oese Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 2 : 2 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 3 : 3 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

2. Injektion (nach einer Woche): Tier 1 : 2 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 2 : 4 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 3 : 6 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Da nach dieser Injektion 2 Tiere infolge Speichelflusses eingingen, mußte ein Wechsel in der Dosierung stattfinden und zwar folgendermaßen:

3. Injektion (Mitte Februar): Tier 1 : 3 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 2 : 6 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

4. Injektion (Ende Februar): Tier 1 : 6 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Tier 2 : 12 Oesen Kultur auf 1 ccm Na Cl.

Die Stämme 4 und 17 wurden vor jeder Injektion auf Schrägagar überimpft und nach 15 stündigem Wachstum verwendet. Gewicht und Temperatur der Tiere wurden täglich kontrolliert; ersteres blieb konstant, letztere normal.

Zur Serumgewinnung wurden die beiden Tiere,

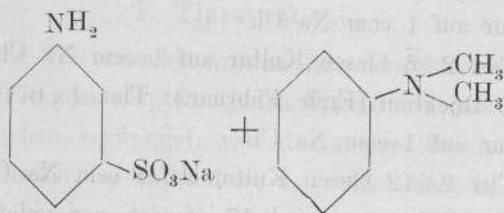
welche mit den höchsten Dosen geimpft waren, also die Kaninchen Nr. 2, total entblutet.

Mit diesem Serum wurden 3 Agglutinationsproben vorgenommen, deren Resultate in den betreffenden Tabellen enthalten sind.

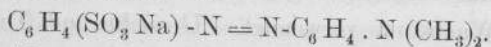
### F. Anhang.

Einwirkung der Bakterien der Proteus- und Coli-gruppe auf Methylorange.

Methylorange ist ein Farbstoff der reichhaltigen Azogruppe; die Farbstoffe dieser Gruppe enthalten das Chromophor -N=N- und werden aus cyclischen Verbindungen durch den Prozeß der Diazotierung dargestellt. Das Methylorange ist das Na-Salz des Helianthins und wird dargestellt aus sulfanilsaurem Natrium und Dimethylanilin:



Seine Formel ist:



Als technischer Farbstoff ist Methylorange durch echtere gelbe Farbstoffe, hauptsächlich durch die Flavone von Kostanecki's etwas in den Hintergrund

gedrängt, dagegen kommt ihm analytisch eine große Bedeutung zu als sehr empfindlicher Indikator bei der alkalimetrischen Maßanalyse, indem seine ursprünglich orange-gelbe Lösung durch Spuren von Säuren rot gefärbt wird (s. Bernthsen, Lehrbuch der org. Chemie, 8. Auflage, Seite 395). Es ersetzt bei der maßanalytischen Bestimmung des Ammoniaks und seiner Verbindungen das Phenolphthaleïn, welches nur bei der Titration von Alkali, Hydraten der alkalischen Erden etc. verwendet werden kann.

Dieser Umstand veranlaßte mich, den Farbstoff in den Bereich meiner Untersuchungen zu ziehen. Ich begann meine Untersuchungen mit den in den vorigen Abschnitten besprochenen Reinstämmen, dehnte sie jedoch auf Veranlassung des Herrn Prof. Dr. Kollé auf *Proteus mirabilis*, *Subtilis*, *El Tor*, *Coli*, *Typhus* und *Paratyphus* aus.

Analog dem Vorgehen bei den *Curcuma*-Nährböden begann ich meine Methylorangeversuche mit Agarplatten. Der Nähragar wurde hergestellt nach der Angabe des Lehrbuches von Kollé-Hetsch für Endoagar. Da der Farbstoff in Wasser löslich ist, verwendete ich die wässrige Lösung desselben im Verhältnis 0.5 gr. : 1 Liter Wasser; auf den Liter Nähragar kamen 5 ccm Farbstofflösung. Die zunächst verwendeten Reinstämme erzeugten keine

Farbenveränderung, ebenso nicht die oben angeführten Bakterienarten.

Ich verließ deshalb die Versuche mit Agarplatten und ging nach dem chemischen Grundprinzip „*corpora non agunt, nisi fluida*“ zu Bouillon-Nährböden über.

In diese Nährböden überimpfte ich zunächst alle von mir gewonnenen Reinstämme der Proteusgruppe mit dem Resultat, daß nach 24stündiger Bebrütung bei sehr starkem Wachstum der Farbstoff nicht verändert wurde. Später zog ich auch *Proteus mirabilis*, *Subtilis*, *El Tor*, *Coli*, *Typhus* und *Paratyphus* in den Kreis der Untersuchung. Nach 24stündigem Wachstum ergab sich dabei folgendes:

Während *Proteus vulgaris* und *mirabilis*, *Subtilis*, *El Tor* und *Coli* bei üppiger Entwicklung keine Veränderung des Farbstoffes bewirkt hatten, war die *Typhusbouillon* merklich verblaßt, zeigte jedoch immerhin noch einen gelben Farbenton, *Paratyphus* hingegen war gänzlich entfärbt, so daß das Nährsubstrat vollkommen das Aussehen einer gewöhnlichen Nährbouillon darbot.

Dieses Verhalten der Bakterien gegenüber dem Farbstoff war um so merkwürdiger, als ich von den säurebildenden *Coli* einen Farbenumschlag von gelb in rot erwartete, während von den andern Stämmen Indifferenz vorausgesetzt werden mußte. Ich setzte nun mit allen im Institut gezüchteten *Coli*, *Typhus*.

und Paratyphusstämmen die Versuche in größerm Maßstabe fort und war dabei im besondern bedacht, das Verhalten der Kulturen auch nach längerer Brutzeit als 24 Stunden zu beobachten.

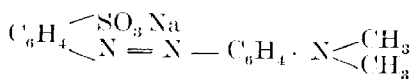
Dabei konnte ich feststellen, daß nach 3 mal 24 Stunden *Proteus vulgaris* und *Subtilis* den Farbstoff vollständig, *Proteus mirabilis* halb, *El Tor* und *Coli* zum Teil zerstört hatten; die Typhusbouillon verblaßte nach 20—30, Paratyphus durchschnittlich nach 10—15 Stunden. Während sämtliche Stämme schön gleichmäßig und zuverlässig reagierten, versagten leider gerade bei den letzten Versuchen einige Typhusstämmen, indem sie in derselben Zeit wie Paratyphus den Farbstoff zerstörten. Ich versuchte es deshalb mit der doppelten Farbstoffdosis, nämlich 1 gr. Methyloorange: 1 Liter aq. und konnte hierbei einen kleinen Fortschritt in der Differenzierung der beiden Spezies feststellen; immerhin war die Reaktion auch jetzt noch nicht eine so unzweideutige, daß von einer sichern Unterscheidung zwischen Typhus und Paratyphus die Rede sein konnte, während hingegen zwischen *Coli* einerseits und Typhus und Paratyphus anderseits auf Grund dieser Reaktion nach etwa 20stündigem Wachstum eine Differenzierung wohl möglich erschien. Ich muß es daher späteren eingehenderen Untersuchungen anheimstellen, die Frage nach dieser Richtung zu

klären. In der zugehörigen Tabelle sind die Resultate zusammengestellt.

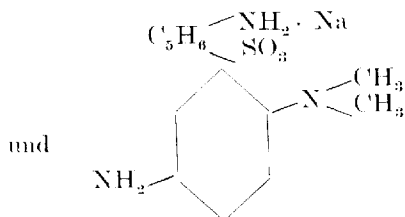
Es entsteht nun die Frage, auf welche chemischen Vorgänge die Zerstörung des Methylorange zurückzuführen ist, eine Erscheinung, die um so merkwürdiger ist, als der Farbstoff chemisch als „echt“, d. h. schwer veränderlich, angesehen wird; seiner ausgiebigen technischen Verwendung steht nur seine Reaktionsfähigkeit auf Säuren und der durch diese bewirkte Farbenumschlag aus gelb in rot, entgegen. Es liegen für die durch die oben erwähnten Bakterien bewirkte Verblassung bzw. Zerstörung des Farbstoffes zwei Möglichkeiten vor.

1. Spaltung in der chromophoren Gruppe;
2. Reduktion des Farbstoffes zu seiner Leukobase.

Ersterer Vorgang würde sich nach dem Muster der Zuckerspaltung durch die Hefepilze im alkoholischen Gährungsprozeß vollziehen. Der Farbstoff hat die Konstitutionsformel:



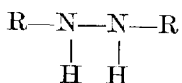
Durch die Spaltung zwischen  $-\text{N}=\text{N}-$  würde der Farbstoff durch H-Aufnahme in seine Komponenten, nämlich einerseits sulfanilsaures Natrium:



p-Amidodimethylanilin zerfallen.

Nun greift nach Gattermann (Die Praxis des organischen Chemikers, 4. Auflage, Seite 221) die Reduktion eines Azokörpers stets in der Azogruppe ein ( $\text{R}-\text{N}=\text{N}-\text{R}$ ), es würde also in diesem Falle allen den Bakterien, welche den Farbstoff verblaßten, eine sehr stark reduzierende Wirkung zukommen, was in Anbetracht ihrer biologischen Funktionen, insbesondere bei *Proteus vulgaris*, *Subtilis* und *Typhus* leicht erklärlich ist. Die zweite Möglichkeit wäre die Reduktion des Farbstoffes zur Leukobase; diese halte ich auf Grund der oben angeführten chemischen Tatsachen für ausgeschlossen, aus dem Grunde, weil eine Leukobase durch Addition von meist 2 Atomen Wasserstoff entsteht, welche häufig, wie beim Malachitgrün, 1 Cl-Atom des salzsauren Salzes der Farbstoffbase oder Sauerstoffatome vertreten; dieser Umstand schaltet beim Methylorange aus; gesetzt den Fall, daß die beiden H-Atome sich an die N-Atome der chromophoren Gruppe durch Sprengung der doppelten Bindung angliedern, so ist keine Leukobase

entstanden, sondern ein neuer Körper, ein der Azoreihe verwandter Hydrazokörper von der Formel



Diese Möglichkeit kann nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden, ist jedoch auf Grund der von Gattermann angeführten Tatsachen über die Reduktion der Azokörper unwahrscheinlich.

Außerdem sind Leukobasen nur typisch für die Triphenylmethanfarbstoffe (z. B. Malachitgrün, Fuchsin), Indigo, Methylenblau, Safranin (s. Bernthsen, Seite 468).

Das genaue Studium dieser interessanten chemischen Vorgänge wird Gegenstand späterer eingehender Untersuchungen sein.

---

## Schlußfolgerungen.

1. Sämtliche 18 Proteusstämmе, die aus den verschiedenen faulenden Substraten gezüchtet wurden, haben bei der morphologisch-biologischen Prüfung keine wesentlichen Unterschiede erkennen lassen. Sie zeigten alle bei der Methylenblau- und Fuchsinfärbung dasselbe mikroskopische Bild, nämlich im Jugendstadium lange verschlungene Ketten, in 1—2 Tage alten Kulturen gleichmäßig lange Stäbchen, die sich sämtlich nach der Gram'schen Methode färben ließen. Alle Stämme verflüssigten Gelatine-nährböden unter starker Entwicklung stinkend-fauligen Geruchs und intensiver Trübung der Nährböden.

Die Agglutinationsreaktion ist von mir zur Differenzierung der einzelnen Stämme deshalb nicht in vollem Maße herangezogen worden, weil sich bei einer Vorprüfung mit zwei Stämmen ganz differente Resultate ergaben. Während Serum 1, gewonnen durch Stamm 4, gegen denselben Stamm den gleichen Agglutinationstiter zeigte, wie das Normalserum, wobei allerdings dieser Titer ein auf-

fällig hoher war, ergab Serum 2, gewonnen durch Stamm 17, gegen den homologen Stamm eine Agglutination von 1:500. Das Normalserum agglutinierte den gleichen Stamm nur in Verdünnungen von 1:20.

Sämtliche flüssigen Nährböden reagierten nach eintägigem Wachstum stark alkalisch. Als günstigste Substrate für das Wachstum der Proteusbakterien erwiesen sich alle Fleischsorten, weniger geeignet waren Leguminosen (Erbsen, Bohnen) und am ungünstigsten eiweißarme bzw. eiweißfreie Gemüsesorten.

2. Bezüglich der morphologisch-biologischen Eigenschaften dieser Kulturen, die auf Grund der sonstigen Grundcharaktere als typische Vertreter der Proteusgruppe erscheinen, ergab die Untersuchung folgendes:

Die Proteen lassen bei Anwendung der Neißer'schen Körnchenfärbungsmethode Babès-Ernst'sche Körperchen erkennen. Als ausgesprochene Basenbildner verändern sie ferner weder Neutralrot noch Fuchsin, noch Lackmusfarbstoff in den speziellen Nährböden; Curcumanährböden werden ebenfalls nicht verändert, hingegen wird Curcumapapier bei nur gelinder Erwärmung flüssiger Nährböden durch entweichende N-haltige Gase intensiv gebräunt.

3. Die Kulturversuche auf Nährböden, welche mit Kupfersulfat imprägniert waren, zeigen, daß der

Zusatz dieses Salzes zu Konservengemüsen, insbesondere Bohnen und Erbsen, nicht nur die Farbe vorteilhaft beeinflusst, sondern auch wachstumshindernd für *Proteus* ist. Es dürfte demnach der von den Konservenfabriken geübte Usus des Kupfersalzzusatzes in minimaler Menge aus diesem Grunde jedenfalls nicht zu verbieten sein. Der Zusatz ungiftiger Anilinfarben hingegen beeinträchtigt, wie die Versuche mit dem Azofarbstoff Methylorange zeigten, das Bakterienwachstum in keiner Weise.

4. Soviel steht auch hinsichtlich meiner Versuche fest, daß *Proteus vulgaris* ein steter Begleiter der Eiweißfäulnis ist.

5. In allen faulenden Substraten meiner Versuche konnten neben Kokken Bazillenarten gefunden werden, die durch typische Merkmale als Vertreter der *Proteus*gruppe wohl charakterisiert sind und sich von einander durch die von mir herangezogenen kulturellen Methoden nicht differenzieren ließen. Es liegt somit kein Grund zu der Annahme vor, daß bei der Eiweißfäulnis verschiedene Arten von *Proteus vulgaris* mitwirken. Auch Spielarten oder besondere Rassen des *Proteus vulgaris* wurden von mir nicht gefunden.



Versuchsreihen	Zeit des Wächstums	Proteus vulgaris			Proteus mirabilis			Subtilis			El Tor			Coli			Typhus			Paratyphus			Kontrolle		
		Bouillon Nr.	1	2	3	Bouillon Nr.	1	2	3	Bouillon Nr.	1	2	3	Bouillon Nr.	1	2	3	Bouillon Nr.	1	2	3	Bouillon Nr.	1	2	3
I. 6. II. 07	24 Stunden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II. 6. II. 07	3×24 Stunden	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
III. 27. II. 07	24 Stunden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV. 27. II. 07	2×24 Stunden	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V. 2. III. 07	3×24 Stunden	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VI. 6. III. 07	24 Stunden	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VII. 8. III. 07	2×24 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VIII. 9. III. 07	3×24 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IX. 11. III. 07	2×24 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
X. 12. III. 07	22 Stunden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Obige Tabelle stellt die ersten Versuche dar, welche mit der Proteus- und Coligruppe unternommen wurden.

Anmerkung: 0 bedeutet: Farbstoff nicht verändert.

— " : schwach entfärbt.

+ " : ganz entfärbt.

± " : sehr schwach entfärbt.

I.  
Typhus.

Stamm I	St. II.	St. III.	St. IV.	St. V.	St. VI.	St. VII.	St. VIII.	St. VIII.	St. IX.	St. X.	St. XI.	St. St.	St. St.	St. St.
			Bouillon							Bouillon		XII. XIII. XIV		
1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
				1. nach 24 Stunden Brutzeit:										
				2. nach 2×24-stündiger Brutzeit:										
				3. nach 3×24-stündiger Brutzeit:										

Anmerkungen: 0 bedeutet: Farbstoff nicht verändert.  
 " : Farbstoff schwach bzw. halb entfärbt.  
 " : Farbstoff vollständig zerstört.



III.

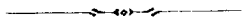
Paratyphus. Coli. Kontrollen.

VIII.	IX.	X.	XI.	XII.	XIII.	Stamm I.	II.	III.	IV.	V.	Nr. 1.	Nr. 2.	Nr. 3.
								Bouillon			Bouillon		
1	2	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2
+	+	+	+	+	+	nach 24-stündiger Brutzeit:							
						0	0	0	0	0	0	0	0
						nach 2×24-stündiger Brutzeit:							
						+	+	+	+	+	+	+	+
						nach 3×24-stündiger Brutzeit:							
						+	+	+	+	+	+	+	+

Ich erfülle an dieser Stelle die angenehme Pflicht, folgenden Herren meinen verbindlichsten Dank auszusprechen:

Herrn Prof. Dr. Tavel für Überlassung des Themas dieser Arbeit, dem Direktor des bakteriologischen Instituts der Universität Bern, Herrn Prof. Dr. Kolle für seine Ratschläge während der Anfertigung der Arbeit, den Herren Assistenten desselben Instituts für ihre Mithilfe und Anleitung.

Ferner sage ich herzlichsten Dank Herrn Prof. Dr. Studer für das mir stets entgegengebrachte Wohlwollen, Herrn Prof. Dr. Tambor, I. Assistenten am organischen Laboratorium, für seine treffenden Ratschläge auf organisch-chemischem Gebiet, den frühern Assistenten am anorganischen Laboratorium der Universität Bern, Herrn Dr. Gubler und Herrn Dr. Barteczko für ihre sachgemäßen Ratschläge, endlich der Konservenfabrik vormals Fritz Brenner Devant les ponts bei Metz für die liebenswürdige Überlassung des vegetabilischen Untersuchungsmaterials.





3187