

Bacteriologisch-chemische Untersuchungen einiger Spaltpilzarten

von

James Kunz.

Aus dem med.-chem. Laboratorium des Prof. M. Nencki in Bern.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. April 1888.)

Die Bacteriologie, die jüngste Schöpfung der medicinischen Forschung, hat nicht nur bei Medicinern die grösste Aufmerksamkeit erregt, sondern sie dürfte auch das wachsende Interesse der Botaniker und Chemiker immer mehr in Anspruch nehmen. Es war mir daher sehr willkommen, von Herrn Professor Nencki veranlasst zu werden, die vorliegenden Arbeiten auszuführen.

Die Reinculturen des *Bacillus strumitis* sowie des grünen Eiters wurden mir von Herrn Dr. Tavel, dem Entdecker des ersteren, bereitwilligst zur Verfügung gestellt. Den Bacillus der *Cholera asiatica* erhielt ich von Herrn Professor Brieger in Berlin durch die gütige Vermittlung des Herrn Professor Nencki. Den leuchtenden Microben endlich erhielt ich von Herrn Prof. Lichtheim.

Zu bemerken ist noch, dass alle Culturen vor ihrer Verarbeitung mittelst des von Petri abgeänderten Koch'schen Plattenverfahrens auf ihre Reinheit geprüft wurden.

I. Über den *Bacillus strumitis* Tavel.

Nach den persönlichen Mittheilungen des Entdeckers, Dr. Tavel in Bern, wurde dieser Bacillus bei zwei Strumitiden in der Punctionsflüssigkeit der Struma cystica gefunden, und beide Male betraf es Leute, die heftige febrile Darmkatarrhe überstanden hatten. Auch bei Thieren wurde er bei gewissen Abscessen gefunden, hier aber überwiegend in der Form von Diplococcen, während er sonst auch in Rasen oder Ketten geordnet

angetroffen wird. Seine Länge variirt zwischen 1 bis 1.5μ und die Breite zwischen 0.5 bis 0.6μ .

Auf Koch'scher Fleischwasserpeptongelatine wächst der Bacillus sehr gut und verflüssigt dieselbe nicht. Auf Agar und besonders zuckerhaltiger Agar ist sein Wachsthum ganz charakteristisch, dasselbe schreitet rasch vorwärts und es werden Gasblasen gebildet, welche oft so gross und so zahlreich sind, dass die Agar in Reagenzgläsern theilweise in die Höhe gehoben wird. Auch auf Kartoffeln gedeiht er ganz gut, nur bietet er da keine charakteristischen Merkmale dar. Auf allen Nährböden, wo er bis jetzt cultivirt wurde, entwickelte er nie einen üblen oder sonst eigenthümlichen Geruch. Der Bacillus ist äusserst beweglich. Was seine Färbung betrifft, so ist dieselbe ziemlich schwierig, am besten gelingt sie noch mit alkalischer Methylenblaulösung nach Löffler's Methode.

Um allfällige Producte dieses Bacillus zu untersuchen, züchtete ich denselben vorerst in 5procentiger Fleischwasserpeptongelatine, welcher noch 5% Traubenzucker beigegeben war. Bevor die Culturen in den Brütöfen gestellt wurden, hatten sie mehrere Tage bei Zimmertemperatur gestanden und auch da schon zahlreiche Gasblasen erzeugt. Um das auf diese Weise gebildete Gas zu untersuchen, wurden Culturen in besonderen Kolben angelegt, deren Hals in eine nach unten gebogene Röhre ausgezogen war und welche seitlich ein kurzes Rohr angeschmolzen hatten, um die Impfung zu ermöglichen.

Unmittelbar nach der Infection wurde dieses seitliche Rohr zugeschmolzen. Um das gebildete Gas auszutreiben, brauchten die Kolben einfach erwärmt zu werden. Durch die Analyse wurde das Gas als Kohlensäure erkannt. Die mittelst Barythydratlösung auf titrimetrischem Wege bestimmte Menge derselben zeigte an, dass $140.0g$ infectirte Gelatine, welcher nur 2% Traubenzucker beigegeben war, und welche nur drei Tage bei Zimmertemperatur und zuletzt zwölf Stunden bei 32° gestanden hatte, $0.0149g$ reine CO_2 producirt hatte.

Die Thatsache, dass Strumitisculturen schon nach verhältnissmässig kurzer Zeit deutlich eine saure Reaction zeigten, trotzdem die Nährgelatine vor der Infection stets schwach alkalisch gemacht wurde, bewies die Bildung einer Säure. Um dieselbe

einer Analyse unterwerfen zu können, wurden Culturen in Nährgelatine angelegt, welche 5% Traubenzucker enthielt. Nachdem dieselben einige Zeit im Brutofen gestanden hatten, wurden sie folgendermassen verarbeitet. Die Masse wurde mit ein paar Tropfen Salzsäure versetzt, um allfällig gebildete Salze zu zerlegen, und so viel destillirtes Wasser hinzugefügt, bis sie flüssig wurde. Hierauf wurde erwärmt, filtrirt und mit Äther ausgezogen. Derselbe hinterliess nach seinem Abdunsten eine gelbliche Flüssigkeit, welche nun mit überschüssigem Zinkoxyd gekocht, filtrirt und zur Krystallisation eingeengt wurde. Die Krystalle zeigten, unter dem Mikroskope betrachtet, die für Zinklactat charakteristischen, aus feinen Prismen bestehenden Krusten und Rosetten. Eine kleine Menge davon verbrannt, entwickelte den für Zinklactat specifischen Geruch. Nach öfterem Umkrystallisiren wurde der Krystallwassergehalt bestimmt, welcher ergab, dass hier die gewöhnliche Gährungsmilchsäure vorlag, was auch durch die nachherige Zinkbestimmung bestätigt wurde. Durch das mehrmalige Umkrystallisiren ging ein guter Theil des Lactates verloren, so dass die aus circa 1500·0 g Culturen gewonnene Menge Zinklactat schliesslich nur noch 0·353 g betrug.

Um die Milchsäure leichter und in grösserer Menge zu erhalten, wurde ein Substrat combinirt, von dem zu hoffen war, dass es diesem Zwecke entsprechen würde. Dasselbe enthielt in 100 cm^3 Wasser

- 0·25 % Pepton
- 0·135 % NaCl und
- 5·0 % Traubenzucker.

Zur Bindung der entstandenen Säure wurde noch Calciumcarbonat beigegeben, da bekanntlich fast alle Microben bei Gegenwart freier Säure nicht weiter vegetiren können. Nachdem die sterilisirte Flüssigkeit geimpft war, wurde sie in den Brutofen gestellt, wo sich die Microben in diesem speciellen Nährmedium rasch vermehrten. Es entwickelten sich reichlich Gasblasen und nach acht Tagen war das Calciumcarbonat völlig gelöst. Die Massen wurden hierauf nach dem oben angegebenen Verfahren verarbeitet. Der Äther hinterliess jedoch dieses Mal bei seinem Verdunsten neben einer öligen gelben Flüssigkeit

noch sehr schön ausgebildete makroskopische Krystalle, welche eine schwach gelbe Farbe hatten und sauer schmeckten. Dieselben wurden abfiltrirt, umkrystallisirt und deren Schmelzpunkt bestimmt. Derselbe lag bei 180° . Auf dem Platinblech verbrannt, entwickelte die Substanz zu Husten reizende Dämpfe und hinterliess keinen Rückstand. Unter dem Mikroskope zeigten die Krystalle die für Bernsteinsäure angezeigten monoklinen Prismen und Tafeln. Die Krystalle waren in NH_3 leicht löslich und eine neutralisirte Lösung gab mit Fe_2Cl_6 einen röthlichbraunen Niederschlag von bernsteinsaurem Eisenoxyd. Aus $1500\cdot0$ g Nährlösung betrug die allein auf diese Weise mit Äther ausgezogene Menge Bernsteinsäure $1\cdot57$ g.

Das Filtrat, welches noch die Milchsäure enthielt, wurde vorerst von der gelösten Bernsteinsäure mittelst Eisenchlorid befreit. Hierauf wurde das Zinklactat dargestellt, welches $1\cdot77$ g betrug.

Um die Wirkung dieses interessanten und erst in neuester Zeit entdeckten Bacillus auf Milch zu studiren, wurde eine gewisse Quantität Milch mit Beobachtung aller nöthigen Cautelen während acht Tagen sterilisirt, und nachdem dieselbe während dieser Zeit ganz unverändert geblieben war, am neunten Tage inficirt. Um jeder Täuschung vorzubeugen, wurden endlich einige, auf gleiche Weise sterilisirte, aber nicht geimpfte Kolben Milch mit den ersteren in den Vegetationsapparat gestellt. Die Bacillen vermehrten sich in diesem Nährsubstrat, ohne dass sie jedoch die Milch zum Gerinnen brachten oder ihre Reaction veränderten, auch konnte kein auffallender Geruch bemerkt werden.

II. Über den *Bacillus pyocyaneus*.

Dieser Microbe ist die Ursache der blauen oder auch grünen Färbung des Eiters, welche oft ganz plötzlich auftritt. Deutsche Bacteriologen beschreiben ihn als ein kleines, schlankes Stäbchen, während ihn Crookshank als einen Micrococcus erwähnt, ohne indessen seine Grösse anzugeben. In jüngeren Reinculturen fand ich ebenfalls nur feine dünne Bacillen, welche sehr beweglich und oft zu zwei oder drei aneinandergereiht sind. Vorgenommene Messungen haben ergeben, dass der durchschnittliche Längsdurchmesser $3\cdot2$ μ und der Dickendurchmesser $0\cdot8$ μ

beträgt. In zwei und drei Monate alten Gelatineculturen dagegen fand ich wirklich molecularbewegliche, stark lichtbrechende Kügelchen und einzelne Stäbchen, welche letzteren an ihren beiden Enden etwas verdickt waren und an diesen Stellen ebenfalls hellglänzende, scharf contourirte Gebilde enthielten, die wohl nur als Sporen zu deuten sind. Auf frische Fleischpepton-Gelatine überimpft, wachsen aus diesen Sporen in kurzer Zeit bewegliche Stäbchen aus.

Das Pyocyanin hat bereits eine umfängliche Literatur. — Ausser den Arbeiten von Fordos, „Comptes rendus“ t. LI 1859, welcher zuerst den Farbstoff krystallinisch erhielt, und später von Girard, „Deutsche Zeitschrift für Chirurgie“ 1876, wären noch zu erwähnen die Abhandlungen von Wasserzug, „Annales de l'institut Pasteur“ 1887 und von Dr. Paul Ernst in der Zeitschrift für Hygiene 1887, II. Band.

Nichtsdestoweniger ist über die nähere Zusammensetzung desselben noch sehr wenig bekannt. Da die Ausbeute an Farbstoff aus Compressen und anderen Verbandstücken nur eine sehr geringe war, so beschloss ich, um einigermassen wägbare Mengen davon zu erhalten, künstliche Culturen auf Nährgelatine in grösserem Massstabe anzulegen. Die geimpfte Gelatine liess ich jeweilen 3—4 Tage bei Zimmertemperatur und hierauf eine Woche lang bei 35° im Thermostaten stehen. Sie wurde in wenigen Tagen verflüssigt und hatte eine schön grüne, fluorescirende Farbe angenommen. Bis jetzt wurde immer angenommen, dass die Farbstoffe des blauen und grünen Eiters die nämlichen seien. In der That konnten in diesen grünen Culturen nach dem gleichen Verfahren, welches Girard angegeben hatte, um die Farbstoffe des blauen Eiters zu isoliren, ebenfalls die beiden, in dem blauen Eiter enthaltenen Körper, nämlich Pyocyanin und Pyoxanthose erhalten werden. Auch der für diesen Eiter spezifische Geruch, dem Weissdorn nicht unähnlich, war deutlich bemerkbar. Allein nach der Isolirung der beiden genannten Farbstoffe behielt die Flüssigkeit noch immer einen grünen Schimmer, und nach Zusatz von ein paar Tropfen Ammoniak bot die beim durchfallenden Licht gelbe Flüssigkeit, beim auffallenden Licht eine prachtvolle grüne Fluorescenz dar, ganz ähnlich dem Fluorescin der Phtalsäure. Dieser fluorescirende Körper ist

nur in Wasser und Alkohol löslich und wird durch Kochen nicht zerstört. Durch Äther, Petroläther oder Amylalkohol lässt er sich nicht ausziehen. Concentrirtere Lösungen davon lassen nur die rothen und grünen Lichtstrahlen durch, beim Verdünnen hellt sich aber das ganze Spectrum auf, ohne dass bestimmte dunkle Linien auftreten. An eine Reindarstellung dieses Farbstoffes ist wohl nicht zu denken, weil er nur in ganz minimalen Mengen vorkommt.

Um das Pyocyamin in reinem Zustande zu erhalten, wurde die aus Chloroform auskrystallirte Base von Neuem in wenig Chloroform gelöst, und diese Lösung in alkoholfreien Äther hineinflüßtrirt; dadurch fällt das Pyocyamin fast vollständig aus, während die anhaftende Pyoxanthose (samt den andern allfälligen Verunreinigungen) in dem Äther sich löst. Das auf diese Weise erhaltene Pyocyamin ist durchaus nicht hygroskopisch, wie das nach der Girard'schen Methode erhaltene Präparat. Trotzdem ich über 6 Kilo Nährlösungen verarbeitet hatte, betrug schliesslich die Ausbente an Pyocyamin nur wenige Centigramm, so dass ich zur Erleichterung für spätere Untersuchungen das Material nur zur qualitativen Prüfung verwendet habe. Erhitzt man das auf obige Weise gereinigte Pyocyamin mit metallischem Natrium, so tritt zuerst ein der Pyoxanthose ähnlicher Geruch auf, welcher bald durch einen an verbranntes Eiweiss erinnernden Geruch verdrängt wird. Hiebei bildet sich ein gelbes Sublimat. Die Schmelze wurde in Wasser gelöst und ein Theil davon mit oxydhaltiger Ferrosulfatlösung erwärmt und darauf Salzsäure hinzugegeben, worauf sogleich ein reichlicher Niederschlag von Berlinerblau gebildet wurde, welcher die Anwesenheit von Stickstoff bewies.

Ein anderer Theil der Lösung wurde mit einigen Tropfen einer verdünnten Nitroprussidnatriumlösung versetzt. Die für Schwefel angezeigte violettrothe Farbe trat augenblicklich ein. Darnach wäre das Pyocyamin nicht allein stickstoff-, sondern auch schwefelhaltig, und die Feststellung seiner procentischen Zusammensetzung wird durch diesen Umstand noch complicirter.

Nach einer Mittheilung von Ledderhose (Tageblatt der Versammlung deutscher Naturforscher in Wiesbaden 1887 S.295) ist das Pyocyamin — zwei Kohlenwasserstoff- und zwei Stick-

stoffbestimmungen der prikrinsauren Verbindung zufolge — nach der Formel $C_{14}H_{14}N_2O$ (in dem Tageblatt ist wohl durch einen Druckfehler $C_{14}H_{14}N_2C$ angegeben) zusammengesetzt. Eine ausführlichere Mittheilung darüber wird an anderer Stelle in Aussicht gestellt. Wird der *Bacillus pyocyaneus* in 2^o/_o zuckerhaltiger Gelatine cultivirt, so nehmen die Culturen ebenfalls eine grüne Farbe an, bilden dabei aber keine Gasblasen. Ist die Verflüssigung der zuckerhaltigen oder gewöhnlichen Nährgelatine schon sehr vorgeschritten, so sinkt die Hauptmasse der gebildeten Bacterienwucherungen in dicken, weisslichen und schleimigen Fäden zu Boden, während die darüber befindlichen Schichten sich entfärben und nur auf der Oberfläche noch eine grüne Zone bleibt. Schüttelt man aber solche Culturen mit Luft, so tritt die grüne Farbe augenblicklich wieder auf und bleibt auch während einiger Stunden. Aus diesem Verhalten lässt sich schliessen, dass das grüne Pigment höchst wahrscheinlich aus einer chromogenen, von den Bacterien gebildeten Substanz durch die Einwirkung des Sauerstoffes der Luft producirt wird. Das Pigment selbst fehlt in den Zellen der Bacterien. Sammelt man die zusammengeballten Bacterienmassen älterer Culturen, so erscheinen dieselben rein weiss und es lässt sich kein Farbstoff aus ihnen darstellen.

In Gelatineculturen verschwindet die grüne Farbe bei Zimmertemperatur allmählig nach zehn bis fünfzehn Wochen und macht einem dunklen rothbraunen Farbenton Platz. Der spezifische Geruch ist in solchen Culturen völlig verschwunden und die Reaction stark alkalisch, ohne dass ein besonderer Geruch bemerkbar wäre. Schüttelt man mit Chloroform aus, so nimmt dasselbe keine Farbstoffe mehr auf, dieselben scheinen völlig zersetzt zu sein. Eine Überimpfung mit solchen ganz rothbraun gewordenen Culturen gelingt nicht mehr. Agarculturen dagegen behalten die grüne Farbe bedeutend länger.

In der beim *Bacillus strumitis* angegebenen Zucker-Pepton-Nährlösung wachsen die Bacillen ganz gut, das Substrat bleibt aber völlig farblos. Die Eigenschaft, Farbstoff zu produciren, haben aber solche Bacillen nicht für die Dauer eingebüsst. Bringt man sie in ein der Farbstoffbildung günstiges Medium, wie Gelatine

oder Agar, so tritt die chromogene Function in wenigen Stunden wieder ein.

Die weiter unten zu erwähnende Pancreasnährlösung ist ein ganz guter Nährboden, sowohl für das Wachsthum dieser Bacterien, als auch für die Farbstoffbildung.

In sterilisirter Milch ruft der *Bacillus pyocyaneus* schon am zweiten Tage eine gelblich grüne Farbe hervor, welche intensiv grün wird, sobald man ein paar Tropfen Ammoniak zusetzt.

III. Über das *Bacterium phosphorescens*.

Eine Reincultur dieses photogenen Microben wurde mir von Professor Lichtheim gütigst übermacht und ich stellte mir die Aufgabe, einigen Aufschluss über das Wesen dieses Schizomyceten zu erhalten, und wo möglich das leuchtende Princip näher zu untersuchen.

In der Literatur findet sich schon 1830 eine Abhandlung von Michaelis, „Über die Phosphorescenz der Nordsee“ und in Gilb. Ann. 1861 gibt Tuckey an, dass eine „schleimartige organische Substanz“ die Ursache des Meerleuchtens sei. 1875 machte Pflüger Mittheilungen „Über die Phosphorescenz lebender Organismen“ und Nüesch, „Über phosphorescirendes Fleisch“ Gaea 1877. Ferner beschreibt Lassar „Die phosphorescirenden Micrococcen“, Pflüg. Arch. XXI. 1880, und Nüesch, „Die leuchtenden Bacterien“ 1885. Ludwig liefert in seiner Publication „Die bisherigen Untersuchungen über photogene Bacterien“, Centralblatt für Bacteriologie 1877 den Beweis, dass es verschiedene leuchtende Bacterien gibt, und Fischer, Centralblatt für Bacteriologie 1888, berichtet: „Über einen neuen lichtentwickelnden Bacillus“, den er im westindischen Ocean angetroffen hat. Eine ganz kurze Darstellung der wichtigsten Thatsachen der neueren Forschungen auf diesem Gebiete findet sich in der „Revue critique des bactéries phosphorescentes“ Annales Pasteur 1887.

Wie es jetzt feststeht, lassen sich die photogenen Bacterien schon zum Theil durch die Farbe ihres Leuchtens unterscheiden. So ist das Licht des *Bacterium Pflügeri* weiss, dasjenige des *Bacillus phosphorescens Fischeri* bläulich, während das Licht des *Bacterium phosphorescens* entschieden einen grünlichen

Farbenton hat. Einige dieser Microben verflüssigen die Gelatine, andere nicht. Zu diesen letzteren gehört auch das *Bacterium phosphorescens*. Dasselbe bildet eigentliche Kurzstäbchen; der eine Durchmesser der Zellen übertrifft den andern nur um Weniges, so dass man auf den ersten Blick glauben könnte, Kokken vor sich zu haben, bei genauer Einstellung sieht man aber, dass die Zellen nicht isodiametrisch sind. Nach meinen Messungen beträgt der längere Durchmesser 1·3 bis 1·9 μ , der kürzere 1·1 bis 1·7 μ . Die einzelnen Individuen sind von einer deutlich wahrnehmbaren Zoogloeahülle umgeben und beweglich. Sie bilden keine längeren Verbände, sind aber nicht selten zu zweien verbunden. Es gelang mir, sie nach der Gram'schen Methode und noch besser mit Ziehl'scher Lösung — Erwärmen des Deckglases auf dem Wasserbade 5 Minuten lang in der Lösung und nachheriges Entfärben mit Alkohol — zu färben. Um einigen Aufschluss über das Wesen dieses Microben zu erhalten und wo möglich die leuchtende Substanz zu isoliren, legte ich zuerst Culturen in Fleischwasserpeptongelatine an. Bei Zimmertemperatur beginnt das Wachsthum bei Stiehculturen am zweiten oder dritten Tage sichtbar zu werden, indem sich an der Oberfläche vom Stich aus eine weisse dünne Haut bildet, die sich nur langsam ausbreitet und im Dunkeln leuchtet. Längs des Impfstiches ist das Wachsthum kaum zu bemerken, falls nicht zufällig eine dicke Impfnadel einen Kanal gebildet hat, der mit der Atmosphäre communicirt, in welchem Falle sich auch längs des Kanals ein weisser Überzug bildet. Dieses ausschliessliche Oberflächenwachsthum beweist deutlich, dass das *Bacterium* zu den Aeroben gehört.

Erwärmt man eine Cultur in der hohlen Hand bis die Gelatine schmilzt und die Bacterien zu Boden fallen, so hört alles Leuchten auf, während die Bacterien noch lebensfähig bleiben und, auf neue Nährmedien übertragen, dort wieder leuchten. Es scheint somit das Leuchtvermögen vom freien Zutritt des Sauerstoffes abhängig zu sein.

Auf Gelatine mit 2^o/_o Traubenzucker wächst dieser Microbe ebenfalls, leuchtet und bildet kleine Gasblasen.

Auf Gelatine cultivirt, bleibt das *Bacterium phosphorescens* monatelang lebensfähig und sogar 3 Monate alte Culturen leuch-

ten noch ganz deutlich. Da wie vorhin angedeutet, das Wachstum auf Gelatine ziemlich beschränkt ist, so versuchte ich, ein diesem Bacterium wahrscheinlich besser zusagendes Substrat herzustellen, indem ich durch Auflösen des käuflichen Meersalzes in destillirtem Wasser 2-, 3- und 4procentige Meersalzlösungen unter Zusatz von je $\frac{1}{4}$ Procent Pepton herstellte und dieselben in gewohnter Weise sterilisirte. Solche Lösungen reagiren völlig neutral, wie überhaupt alkalische Reaction des Nährsubstrates, z. B. der Gelatine, durchaus nicht nothwendig ist. Ich übertrug nun Microben von der Gelatine in diese Lösungen und liess die Kolben bei Zimmertemperatur stehen. Nach 20 Stunden mikroskopirte ich und fand zu meinem Erstaunen, dass in diesem Nährmedium, wo die Bacterien nach allen Seiten ungehindert und unbeschränkt wachsen konnten, die eingesäten kokkenähnlichen Gebilde zu dicken Stäbchen ausgewachsen waren, welche meist in der Zweitheilung begriffen waren und sich lebhaft bewegten. Die durchschnittliche Länge dieser Stäbchen beträgt 2 bis 2.9 μ , ihre Dicke 0.9 bis 1.2 μ . Die Eigenschaft auf einigen Substraten in rundlicher Form und in anderen, wo sie sich frei bewegen können, als Stäbchen zu wachsen, ist übrigens z. B. auch den Friedländer'schen Pneumonekokken eigen.

Alle Meerwasserculturen und besonders die 3- und 4procentigen, leuchteten schon am Tage nach ihrer Aussaat ganz deutlich, und nach 3 Tagen war das Leuchten so stark, dass die Zeiger einer Taschenuhr sammt dem Secundenzeiger ganz deutlich abgelesen werden konnten, sobald man dieselbe in die Nähe eines Kolbens brachte.

Das Licht ist bedeutend intensiver als dasjenige aller mir bekannten phosphorescirenden unorganischen Körper. Sogar die Lichtstärke einer Lösung von Lophin in Amylalkohol unter Zusatz von caustischem Kali erreicht bei weitem nicht diejenige solcher Culturen. Beim Schütteln nimmt die Lichtstärke ganz bedeutend zu, weil dadurch der Sauerstoff der Luft direct mit den unteren Schichten in Berührung kommt. Als beim Schütteln einmal ein Wattepfropf benetzt wurde, leuchtete derselbe ebenfalls für mehrere Tage. Auf 0° abgekühlt, nimmt das Leuchtungsvermögen nur ganz wenig ab; erwärmt man während weniger Augenblicke auf 35°, so verschwindet alles Leuchten, kehrt aber

beim Abkühlen wieder, dauert jedoch das Erwärmen auf 35° etwa eine Viertelstunde, so büßen die Culturen ihr Leuchtvermögen dauernd ein.

Macht man von einer leuchtenden Meerwassercultur einen „hängenden Tropfen“ und betrachtet denselben bei völliger Dunkelheit unter dem Mikroskope, so ist das Licht der einzelnen Bakterien nicht stark genug, um wahrgenommen zu werden, hingegen sieht man das Leuchten des ganzen Tropfens so deutlich, dass man die Ränder desselben sehr gut wahrnehmen kann, wenn man das Präparat auf dem Objectische verschiebt.

Nach 2 bis 3 Wochen verlieren die Culturen ihre Leuchtkraft allmählig, indem sie eine gelbe Trübung erleiden, ohne dass die neutrale Reaction sich verändert oder ein Geruch sich bemerkbar macht. Nach mehreren Wochen hört das Leuchten ganz auf, ohne dass die Bakterien absterben.

Das Leuchtvermögen des *Bacterium phosphorescens* ist von einer vorausgegangenen Insolation völlig unabhängig, indem Culturen, welche ich sogleich nach der Impfung im Dunkeln gehalten hatte, ebenso stark leuchteten wie solche, welche dem Tageslicht ausgesetzt gewesen waren.

Schüttelt man leuchtende Meerwasserculturen mit Äther, Alkohol, Amylalkohol, Benzol oder Chloroform, so verschwindet das Leuchten augenblicklich, sowie auch beim Mischen mit verdünnten Säuren, wie: Essigsäure, Salzsäure oder Schwefelsäure. Bringt man Mandelöl zu den erwähnten Culturen und schüttelt, so erleidet das Leuchten keinen Abbruch, auch kleine Quantitäten einer schwachen Natriumcarbonatlösung bewirken keine Veränderung, während durch Zusatz einer concentrirten Lösung das Leuchten ebenfalls verschwindet. Es muss somit das Leuchten des *Bact. phosphorescens* ein vitaler Process sein, da alle Reagentien, welche das Zellprotoplasma tödten, auch zugleich das Leuchten vernichten. Der leuchtende Stoff lässt sich demnach nicht isoliren.

Ich versuchte auch dieses halophile *Bacterium* in anderen Salzlösungen zu cultiviren. Zu diesem Zwecke bereitete ich 3procentige Lösungen von Chlornatrium, von Magnesiumsulfat und von Natriumsulfat, welche noch jeweilen $\frac{1}{4}$ Procent Pepton

enthielten. In allen drei Substraten wuchs der Pilz gut und die prächtige Phosphorescenzerscheinung trat auch hier ein.

Wenn die Reinheit der Culturen nicht in Betracht kommt und man nur das Leuchten haben will, so ist es nicht einmal nothwendig, die Salzlösungen zu sterilisiren, sobald sich aber die Fäulniss des Peptons bemerkbar macht, verschwindet das Leuchten.

Impfungen auf Urin gelangen mir ebenfalls, dagegen kommt das Bacterium in sterilisirtem Quellwasser nicht fort.

Sterilisirte Milch inficirte ich mit Erfolg mit Stäbchen aus einer Meerwassercultur. Wegen ihrer Undurchsichtigkeit leuchtete sie aber bei weitem nicht so intensiv wie die Salzlösungen. Unter dem Mikroskope sah ich ausschliesslich rundliche Formen des Microben sich zwischen den Milchkügelchen bewegen, als ich aber davon in künstliches Meerwasser aussäete, wuchsen sie wieder zu Stäbchen aus.

IV. Zur Kenntniss des Koch'schen Kommabacillus.

Der unzweifelhafte Erreger der Cholera asiatica ist heutzutage sogar dem grossen Publicum unter dem Namen Koch'scher Kommabacillus bekannt. Dass diese Bacillen nicht als solche die gefürchteten Zustände im menschlichen Organismus hervorrufen, wie z. B. die Tuberkelbacillen, sondern dass sie toxisch wirkende Stoffe produciren, ist wohl mit Bestimmtheit anzunehmen. Auf peptonhaltiger Bouillon und in Nährgelatine rufen die Cholera-bacillen solche chemische Vorgänge hervor, wie sie bis jetzt noch von keinen andern Bacterien beobachtet worden sind, und welche in neuerer Zeit von Bujwid zu einer Cholerareaction benutzt worden und sogar zur Diagnose empfohlen wurden.

Trotz der zahlreichen Versuche, die toxischen Stoffe zu isoliren, sind bis jetzt noch keine sicheren Resultate darüber bekannt. Ohne Zweifel übt auch die Verschiedenheit der Nährsubstrate einen sehr grossen Einfluss auf die Bildung der Ptomaine aus. Um eine reichlichere Production toxischer Stoffwechselproducte zu erhalten, glaubte ich ein Nährsubstrat herstellen zu müssen, welches dem von den Bacillen im menschlichen Organismus bevorzugten Nährboden am nächsten steht. Nun ist es aber erwiesen, dass bei Cholera asiatica der Dünndarm, und zwar die

untere Hälfte, der eigentliche Mittelpunkt der pathologischen Vorgänge ist, und bei Choleraleichen soll sich der Dünndarminhalt sehr oft nahezu als Reincultur von Kommabacillen erweisen. Die gewöhnlichen Nährmedien, wie Fleischbrei, Bouillon oder Fleischwasserpeptongelatine waren nicht zweckentsprechend und ich bereitete deshalb eine Nährflüssigkeit, welche dem Dünndarminhalt ziemlich nahe kommt, und welche mit einigen Abänderungen nach einer Vorschrift hergestellt war, welche Herr Prof. Nencki in seiner Schrift „Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses bei der Fäulniss mit Pancreas“ mittheilt. Das Verfahren war folgendes: 300 g trockenes Serumeiweiss und vier frische, fein zerhackte Ochsenpancreasdrüsen wurden mit 6 l Wasser bei Brutttemperatur während 16 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurde die Masse mit Essigsäure schwach angesäuert, erwärmt und durch ein Tuch colirt. Die Flüssigkeit wurde nun mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht, filtrirt und in gewohnter Weise sterilisirt. Eine solche Nährflüssigkeit riecht dem Dünndarminhalt sehr ähnlich und ist fast farblos, so dass man das Wachsen von Bacterien sehr leicht wahrnehmen kann. Die Cholera bacillen wachsen darin sehr rasch und trüben die klare Flüssigkeit schon nach wenigen Stunden. Mit solchen Culturen gelingt auch die Cholera reaction sehr gut. Aber auch anderen Bacterien, wie z. B. den Typhusbacillen scheint dieser Nährboden sehr zu behagen.

Um auf Choleraptomäne prüfen zu können, inficirte ich 3 l dieser Pancreasflüssigkeit mit Kommabacillen, liess dieselben während drei Tagen bei 35° stehen und verarbeitete sie hernach nach der von Brieger in seinen „Untersuchungen über Ptomäne III. Theil“ angegebenen Methode. Die Culturen wurden nämlich mit Salzsäure ganz schwach angesäuert und aufgeköcht. Alsdann wurde filtrirt, das Filtrat auf dem Wasserbade zur Syrupconsistenz abgedampft und mit 95%igem Alkohol aufgenommen. Von den niedergeschlagenen Bestandtheilen wurde abfiltrirt, zum Syrup eingedampft und wieder mit Alkohol aufgenommen. Diese Procedur wurde noch einmal wiederholt und der Auszug mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgenommen, durch Schwefelwasserstoff zersetzt, das Schwefelquecksilber abfiltrirt und das Filtrat durch

Soda soweit abgestumpft, bis es nur noch ganz schwach sauer reagirte. Darauf wurde eingedampft und mit absolutem Alkohol erschöpft. Der Alkohol wurde verjagt, der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit einer alkoholischen Lösung von Platinchlorid ausgefällt. Der Niederschlag war von orangegelber Farbe und krystallinisch. Er wurde aus heissem Wasser zweimal umkrystallisirt. Ein kleiner Theil des Platinsalzes, das aber keineswegs homogen war, und das jedenfalls aus einem Gemenge mindestens zweier Salze bestand, wurde durch Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, die freie Salzsäure mit Natriumcarbonat sorgfältig abgestumpft, eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen. Nachdem der Alkohol verjagt war, wurde 0·01 *g* des Rückstandes einem Frosch subcutan injicirt. Derselbe zeigte aber keine anormalen Symptome. Die gleiche Quantität einer Maus injicirt, bewirkte bei derselben schon nach 5 Minuten Lähmungserscheinungen, welche bald zunahmen. Nach einer Stunde legte sich das Thier auf den Bauch und war nicht mehr fähig, sich fortzubewegen. Nach zwei Stunden trat der Tod ein.

Einem Kaninchen, das 1100 *g* wog, wurden 0·02 *g* der nämlichen Substanz injicirt. Nach zwei Stunden bekam dasselbe heftigen Speichelfluss, wurde sehr träge und es trat profuse Diarrhoe ein. Später erholte sich das Thier wieder und blieb dauernd gesund.

Nachdem also durch Thierversuche die Gegenwart eines giftigen Ptomaïnes erwiesen wurde, suchte ich durch wiederholte Krystallisation des Gemisches ein homogenes Salz darzustellen. Dies gelang mir insofern, als der in Wasser am schwersten lösliche Theil der Chloroplatinate nach dreimaligem Umkrystallisiren ein homogenes, in rhombischen Blättchen krystallisirendes Salz lieferte. Das lufttrockene Salz verlor bei 100—105° nichts an Gewicht und ergab bei der Verbrennung folgende Resultate:

0·2238 *g* der Substanz ergaben

CO₂ 0·0800 *g*

H₂O 0·0600 *g*

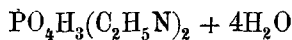
0·224 *g* hinterliessen beim Glühen 0·0876 *g* Platin = 39·1 %.

Zu einer Stickstoffbestimmung reichte die übrige Menge nicht mehr aus. Der Rest, 0·12 g wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Chlorid einem Meerschweinchen subcutan injicirt. Es traten jedoch keine toxischen Erscheinungen auf. Der giftige Körper muss demnach in dem in Wasser leichter löslichen Antheil der Chloroplatinate enthalten sein.

Aus der procentischen Zusammensetzung des analysirten Salzes berechnet sich die Formel $(C_2H_5N)_2, 2HCl PtCl_4$. Eine Base von der Zusammensetzung C_2H_5N , als Fäulnisproduct thierischer Gewebe, ist bereits seit längerer Zeit bekannt.

Schreiner beobachtete im Sputum, im menschlichen Sperma, sowie auf anatomischen, in Alkohol aufbewahrten Präparaten, die durch ihre gypsähnliche Krystallform — Combination von prismatischen und pyramidalen Formen — ausgezeichnete Substanz, und stellte durch Analysen fest, dass die Krystalle das phosphorsaure Salz der Base C_2H_5N waren.

Von Schreiner wurde keine Formel für das phosphorsaure Salz aufgestellt. Aus der Analyse von Schreiner lässt sich für das wasserhaltige Salz die Formel



berechnen. Bei 100° getrocknet, verliert das Salz 3 Molecüle Krystallwasser,

<u>Berechnet</u>	<u>Gefunden</u>
21·09 %	21·15 %

und verlangt dann einen Gehalt von

$$15·3 \% P$$

und

$$13·86 \% N.$$

Schreiner fand in dem bei 100° getrockneten Salze

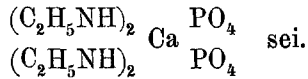
$$15·3 \% P$$

und

$$14·03 \% N.$$

In einer soeben erschienenen Mittheilung (Berichte d. deutschen chemischen Gesellschaft XXI. Jahrg. Nr. 4, 1888) haben Ladenburg und Abel constatirt, dass „eine kleine Probe des von Schreiner analysirten Präparates auf dem Platinblech

verbrannt, einen deutlichen anorganischen Rückstand hinterliess, der aus phosphorsaurem Kalk bestand.“ Darauf hin vermutheten die beiden Autoren, dass das Schreiner'sche Salz ein Doppelsalz von der Formel



Eine solche Formel würde 9·85 % Ca verlangen, respective beim Veraschen über 25 % phosphorsauren Kalk zurücklassen müssen. Dass eine so grosse Menge phosphorsauren Kalkes übersehen worden wäre, ist kaum anzunehmen. Auch die übrigen Eigenschaften des künstlichen Äthylenimins stimmen nicht mit den Eigenschaften der Schreiner'schen und der von mir aus Cholera-culturen erhaltenen Base überein. So ist das von mir erhaltene Platinsalz, wenn auch wenig, so doch in Wasser löslich und wurde durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser rein dargestellt.

Das Chloroplatinat der Base von Ladenburg und Abel dagegen ist in Wasser ganz unlöslich. Auch vermisste ich leider in den Mittheilungen von Ladenburg und Abel die Beschreibung des phosphorsauren Salzes ihres Äthylenimins, was doch ein Hauptkriterium der Verschiedenheit oder Identität der beiden Basen ist.

Dieses Salz war übrigens schon lange vorher unter dem Namen „Charcot'sche Krystalle“ bekannt und es ist ein Verdienst Schreiner's, die Identität dieser Krystalle mit der von ihm analysirten Base festgestellt zu haben. Ausser der Krystallform des phosphorsauren Salzes wird von Schreiner als charakteristisch für die Verbindung angegeben, dass Salze der Base mit Magnesium behandelt, intensiv den Geruch nach frischem menschlichem Sperma verbreiten. Ganz die gleiche Erscheinung habe ich auch bei Zusatz von Natronlauge zu dem von mir analysirten Chloroplatinate beobachtet. Es trat auch hier ein intensiver Geruch nach menschlichem Sperma auf. Als ich eine concentrirte Lösung des salzsauren Salzes mit Natriumphosphat und Ammoniak versetzte, erhielt ich Krystalle von der gleichen prismatischen Form wie sie von Schreiner in den Annalen der Chemie, Bd. CXCV, S. 76, abgebildet wurden. Die Schreiner'sche Base unter dem

Namen Spermin oder Spermatin bekannt, ist entweder Äthylenimid $\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \end{matrix} \rangle \text{NH}$ oder Äthylidenimid $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{NH}$. Die von mir erhaltenen Zahlen entsprechen der obigen Formel folgendermassen:

	<u>Gefunden</u>		<u>Berechnet</u>
C	9·77	C	9·65
H	2·53	H	2·61
Pt	39·10	Pt	39·56.

Zu bemerken wäre noch, dass Brieger aus faulem Fleisch das giftig wirkende Äthylidendiamin $\text{CH}_3 - \text{CH} = (\text{NH}_2)_2$ erhalten hat. Immerhin ist es von Interesse, dass durch Kommabacillen das Spermin gebildet wird. Ich setze übrigens die Untersuchung weiter fort, namentlich in der Absicht, die zweite toxisch wirkende Base, deren Salz in Wasser leichter löslich ist, zu isoliren.

Um zu erfahren, ob das Spermin von den Cholerabacillen producirt worden oder schon in der Pancreasnährlösung vorhanden gewesen sei, wurde ein Parallelversuch gemacht. Die oben angegebenen Mengen Eiweiss und Wasser wurden mit Pancreasdrüsen, welche 24 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten, während 16 Stunden bei 35° digerirt und hernach in der gleichen Weise behandelt wie die Choleraeulturen. In dem Plattniederschlag war jedoch kein Spermin nachzuweisen, so dass dasselbe von den Cholerabacillen gebildet worden sein muss.

Da die Kommabacillen in Milch cultivirt das Casein in sehr kurzer Zeit abscheiden, so versuchte ich dieselben in der beim Strumitisbacillus angegebenen Zuckerpeptonlösung zu züchten, um auf gebildete Milchsäure zu prüfen. Auch inficirte ich Pancreasnährlösungen, welchen 5% Traubenzucker und Calciumcarbonat beigegeben war. Aber in keinem Falle war Milchsäure gebildet worden, hingegen erhielt ich in geringen Mengen Bernsteinsäure, die ich durch Schmelzpunktbestimmung und Darstellung des Eisensalzes identificirte.