

XV.

Bakteriologische Mittheilungen über das grüne Sputum und über die grünen Farbstoff producirenden Bacillen.

(Aus dem Laboratorium der medicinischen Klinik in Zürich.)

Von Adolf Frick, med. pract.
erstem Assistenzarzt der medic. Klinik.

Historisches.

Grüne Sputa wurden zuerst unter Traube's Aegide ausführlich beschrieben von Nothnagel¹⁾ im Jahre 1864.

Man hat darnach zwei Reihen von grünen Sputis zu unterscheiden:

A. Bei den grünen Sputis der ersten Reihe ist die grüne Färbung bedingt durch Gallenfarbstoffe. Diese Sputa werden dann expectorirt, wenn eine Erkrankung des Respirationsapparates, die Sputum producirt, complicirt wird mit Icterus, gleichgültig, welcher Provenienz. Bekannt war dies längst für die sogenannte biliöse Pneumonie. Traube machte darauf aufmerksam, dass auch einfache Bronchitiden das grüne Sputum liefern, sobald sie eben mit Icterus combinirt sind. In diesen Sputis kann das Biliverdin leicht durch die gewöhnlichen Reactionen nachgewiesen werden.

B. Die zweite Reihe der grünen Sputa erhält ihre Färbung durch Umwandlungsproducte des Hämoglobins im engeren Sinne²⁾, nach Traube durch Oxydationsproducte des Hämatins.

Drei pathologische Prozesse nennt Nothnagel, bei denen diese grasgrünen Sputa ohne eine Spur von Icterus vorkommen:

1) Die lytisch endigende fibrinöse Pneumonie.

2) Die fibrinöse Pneumonie im Begriff in Lungenabscess überzugehen.

¹⁾ Berl. klin. Wochenschr. I. 27 u. 28.

²⁾ Auch das Biliverdin ist ja schliesslich ein Abkömmling des Hämoglobin.

3) Den Beginn einer subacut verlaufenden käsigen Pneumonie, „gleichviel ob sie in Tuberculose übergeht oder nicht“.

Wenn bei diesen Prozessen die grüne Farbe erklärt werden soll, so muss man erst die Farben der Sputa bei der genuinen fibrinösen Pneumonie erklären. Andral hat behauptet, dass die Rostfarbe schon entstehe bei der innigen Mischung von unverändertem Blut mit Sputum. Traube aber zeigte, dass man durch experimentelle Mischung von Blut mit Gummi- oder Eiweisslösung weder Rost- noch Citronenfarbe erhält, dass also ein schon veränderter Blutfarbstoff im Spiele sein müsse. Bei dieser Veränderung ist die Reihenfolge der Farben dieselbe, wie bei subcutanen Blutungen, und da bei diesen nach der Citronenfarbe grün auftritt, so schloss Traube, dass das grüne Sputum nur ein weiter umgewandeltes (oxydirtes) rost- bzw. citronenfarbenes sei, und dass es daher überall da vorkomme, wo ein rostfarbenes Sputum längere Zeit zu stagniren Gelegenheit finde, also eben in den genannten Prozessen.

So richtig diese Ansicht sein mag, so lässt sich doch dagegen bemerken, dass man beim Stehenlassen rostfarbener Sputa, oder bei Behandlung derselben mit Oxydationsmitteln niemals grüne Sputa bekommen hat¹⁾.

Seit der Nothnagel'schen Arbeit sind nun noch andere grüne Sputa beschrieben worden, die sich sämmtlich von den schon besprochenen dadurch unterscheiden, dass sie erst nach der Expectoration, wenn sie einige Zeit an der Luft gestanden haben, die grüne Farbe annehmen.

Die erste Mittheilung darüber kam im Jahr 1875 von O. Rosenbach²⁾ der auf der medic. Klinik in Jena die Beobachtung machte, dass bei einem Pat. mit typischem Bronchialasthma das Sputum nach 24stündigem Stehen an der Luft eine prachtvoll grasgrüne Farbe annahm. Bei Zusatz von Kalilauge nahm die Färbung deutlich an Intensität zu. Rosenbach fand in dem Sputum neben ungemein zahlreichen, sich lebhaft bewegendenden Vibrionen leicht grün gefärbte Sporen und grössere Conglomerate von kleinen, stark lichtbrechenden, Sporenhaufen ähnlichen

¹⁾ Vergl. den Schluss dieses Abschnittes.

²⁾ Berl. klin. Wochenschr. XII. 48.

Körperchen. Rosenbach lässt sich nun eines weiteren über diese „Sporenhaufen“ aus, und glaubt, dass von ihnen die Färbung abhängt. Durch Hinzufügen einiger Tropfen dieses grünen Sputums zu dem schleimig-eitrigen Auswurf eines Tuberculösen gelang es in dem letztern eine leicht grünliche Färbung zu erzielen. Auf Milch, welche schwach alkalisch reagirte, entstanden 12 Stunden nach Auftropfen des grünen Sputums gelbgrüne Borken, die durch Kalilauge smaragdgrün wurden. Bei mikroskopischer Untersuchung der Milch fand man äusserst zahlreiche, stark grün gefärbte Sporen von der Grösse der Hefezellen.

Dass die Ursache der Färbung dieses Sputums Mikroorganismen sind, geht aus den gelungenen Impfversuchen zur Genüge hervor, und dass das Sputum in eine andere als die beiden von Nothnagel beschriebenen Kategorien gehört, liegt daher auf der Hand. Ueber die Natur der die Färbung verursachenden Mikroorganismen spricht sich Rosenbach nicht näher aus. Die von ihm beschriebenen grünen Körperchen von der Grösse der Hefezellen sind aber doch wohl keine Bakteriensporen.

Eine weitere Mittheilung kam 1882 von Curschmann¹⁾ gelegentlich seiner Arbeit über Bronchiolitis exsudativa und ihr Verhältniss zum Asthma nervosum.

Curschmann berichtet da, dass ihm häufig die Sputa seiner Asthmatiker nach 24stündigem Stehen grün geworden seien. An andern Sputis hat Curschmann das grün Werden nur äusserst selten beobachtet. In einer Anmerkung äussert er sich darüber noch, wie folgt: „Die Frage nach der grasgrünen Verfärbung des Asthmasputums habe ich bisher nicht so weit verfolgt, dass ich Abschliessendes darüber vorbringen könnte. Die schon von Rosenbach beschriebenen grünen pilzartigen Gebilde vermochte ich nicht mit Sicherheit wiederzufinden. Durch absoluten Alkohol gelang es, den Farbstoff zum Theil zu extrahiren, wenigstens wurde der abfiltrirte Alkohol deutlich grün gefärbt. Liess ich diesen verdunsten, so hinterblieb eine gelblich-grüne krystallinische Masse, entweder der Farbstoff selbst, oder eine andere, aus dem Sputum extrahirte, und durch diesen gefärbte Substanz.“ Diese kurze Mittheilung erlaubt nicht mit

¹⁾ Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. 32.

Sicherheit, das Sputum in die Reihe einzurubriciren, doch scheint es mit dem Rosenbach'schen übereinzustimmen.

Endlich fand Escherich¹⁾ 1883 bei einer Pat. mit Bronchitis fibrinosa, die in mehreren acut fieberhaften Anfällen auftrat, dass das Sputum an der Luft grün wurde.

„Bei längerem Stehen an der Luft trat in wechselnder Intensität eine lauchgrüne Färbung des Auswurfs ein, wie sie schon Curschmann für das Sputum bei Bronchiolitis exsudativa beschrieben hat. Dass wir es hier jedenfalls mit Oxydationsprozessen zu thun haben, geht daraus hervor, dass sich dieselbe Veränderung bei Zusatz von rauchender Salpetersäure sofort einstellte. Der grüne Farbstoff lässt sich mit Chloroform leicht völlig ausziehen, findet sich übrigens auch in anderen, namentlich stark bluthaltigen Sputis.“

Dieses Sputum von Escherich scheint den Reactionen noch von den beiden vorigen verschieden zu sein. Nach Escherich's nicht unwahrscheinlicher Annahme ist der Farbstoff hier ein Oxydationsproduct offenbar von Abkömmlingen des Hämatins. Das Sputum gehört daher in die Reihe B, und wäre dort aufzuführen unter

4) Bei Bronchitis fibrinosa. Das Sputum wird dabei erst nach der Expectoration durch den Sauerstoff der Luft allmählich oder künstlich und rasch durch oxydirende Reagentien grün und bildet somit ein Glied in der Beweiskette Traube's, auf dessen Fehlen oben aufmerksam gemacht wurde.

Eine neue Reihe grüner Sputa eröffnet also nur Rosenbach:

C) Grüne Sputa, deren Färbung durch Bakterien bewirkt wird. Diese sind die Analoga zu den eigelben, blauen, rothen u. s. w. Sputis, deren Farbe durch Bakterien erzeugt wird.

Da die betreffenden Bakterien erst nach der Expectoration wohl meist aus der Luft in das Sputum gelangen, so ist das Vorkommen der grünen Färbung stets ein rein zufälliges Ereigniss ohne alle pathologische Bedeutung. Dass die Färbung fast nur in Asthmasputis auftrat (Curschmann) dürfte ihr jedenfalls auch nur sehr geringen diagnostischen Werth verleihen, umso mehr als sich im Folgenden zeigt, dass noch viele andere Sputa fähig sind, den betreffenden Bacillen als Nährboden zu dienen.

¹⁾ Deutsche medic. Wochenschr. 1883.

Im Folgenden werden nun grüne Sputa beschrieben, die auf der medicinischen und chirurgischen Klinik in Zürich beobachtet wurden, und bei welchen es mir gelungen ist, die Ursache der Färbung in einem bestimmten Bacillus aufzufinden. Wahrscheinlich ist der Bacillus identisch mit den von Rosenbach als Vibrionen bezeichneten Gebilden, und sind daher diese und nicht die „Sporenhaufen“ als die Ursache der Färbung zu bezeichnen.

Die Sputa.

Zum ersten Male beobachtete ich ein grasgrünes Sputum am 12. Februar 1888. Dasselbe rührte von einem Pat. F. her, der wegen Emphysem und chronischer Bronchitis seit Mitte Januar auf der medic. Abtheilung lag. Anfangs hatte er ein ziemlich reichliches, schleimig eitriges Sputum expectorirt; unter dem Gebrauch eines Infus. Ipecac. war der Auswurf dann immer spärlicher geworden, und betrug Anfangs Februar kaum noch einige Esslöffel täglich. Auch war er reiner schleimig, ziemlich zäh. Mehrfach fanden sich in demselben schwarze Partikelchen, die ihm eine graue Farbe verliehen. Behufs mikroskopischer Untersuchung, welche die Annahme bestätigte, dass es sich um Kohle handle, wurde das Sputum am 9. Februar 1888 Morgens nach dem Laboratorium der Klinik gebracht, woselbst es einige Tage stehen blieb. Am 12. Februar war beinahe die ganze Menge des Sputums gelbgrün geworden, und im Verlaufe zweier weiterer Tage¹⁾ wurde es schön grasgrün. Fernerhin traten Veränderungen an dem Sputum nicht mehr ein. Es behielt seine Consistenz bei, bis es bei längerem Stehen nach und nach eintrocknete, wobei die Farbe wieder etwas heller wurde.

Es lag sehr nahe anzunehmen, dass während des Aufenthalts im Laboratorium das Sputum gewissermaassen eine Infection mit Mikroorganismen erfahren hätte, welche die grüne Farbe erzeugten. Später wurden noch wiederholt Sputa von dem gleichen Pat. theils im Laboratorium, theils auf der Abtheilung stehen gelassen, aber nur einmal trat die grüne Farbe, und zwar diesmal bei einem im Krankensaal verbliebenen Sputum wieder

¹⁾ Die Temperatur im Laboratorium betrug in jener Zeit während des Tages 15—16°, früh Morgens vor dem Heizen meist nur 12—13°.

auf. Die Speigläser wurden dabei oft vom Krankensaal nach dem Laboratorium und, nicht genügend (in bakteriologischem Sinn) gereinigt, wieder in den Krankensaal gebracht.

Das weitere Schicksal des Pat. F. hat hier vielleicht noch einiges Interesse, Pat. hatte nemlich seit Jahren eine rechtsseitige Scrotalhernie, es stellten sich Zeichen von Incarceration ein, und Pat. musste zur Operation auf die chirurgische Abtheilung verlegt werden (16. März). Wenige Tage später (21. März) bekam ich von Herrn Dr. Brunner, Secundärarzt der chir. Abth. ein grünes Sputum zur Untersuchung. Dasselbe rührte von einem Pat. her, an welchem wegen Empyem eine Rippenresection mit Entleerung des Eiters vorgenommen worden war. Die Heilung zog sich sehr in die Länge, und Pat. expectorirte täglich ziemlich reichliche Mengen eines schleimig-eitrigen, etwas schaumigen Sputums, das ich schon früher mehrfach, aber stets mit negativem Befund, auf Tuberkelbacillen untersucht hatte. Das grün gewordene Sputum erinnerte lebhaft an das von Rosenbach beschriebene. Der Schaum war vollständig verschwunden. Auf dem Boden lagen blassgelbliche Eiterballen, die im Laufe der nächsten Tage krümelig zerfielen; darüber befand sich eine grün gefärbte, leicht fluorescirende etwas trübe Flüssigkeitsschicht. Späterhin wurde eine Grünwerden des Sputums bei diesem Pat. nicht mehr beobachtet. Wenn auch spätere Vorkommnisse zeigten, dass das Infectionsmaterial für grünes Sputum zu dieser Zeit im Spital sehr verbreitet sein musste, und wenn auch dieser Pat. nicht in demselben Saale lag, wie unser Pat. F., so ist doch die Möglichkeit wenigstens anzudeuten, dass Pat. F. die Organismen auf die chir. Abth. eingeschleppt und damit weitere Ansteckung hervorgerufen haben kann.

Eine Woche früher hatte ich von Herrn Dr. Schwarz, Secundärarzt der chirurg. Klinik, ein grünes Sputum bekommen. Es stammte von einer 26jährigen Phthisica, die wegen Wirbel-tuberculose und Caries cubiti sin. auf der chir. Frauenabth. (in einem andern Flügel des Spitalgebäudes) lag. Das Sputum hatte etwa drei Tage auf der Abtheilung gestanden, als die grüne Farbe bemerkbar wurde. Es war schleimig-eitrig, aber doch vorwiegend schleimig und sehr zäh, an die von Curschmann beschriebene zähschleimige Substanz erinnernd, umgeformt, mit mässig reich-

lichem Schaum. Nach dem Grünwerden hatte es seine physikalischen Eigenschaften nicht verändert, namentlich war es eher etwas zäher als dünnflüssiger geworden. Auch der gut erhaltene Schaum zeigte eine intensiv grüne Farbe, wie überhaupt die Farbe an diesem Sputum am schönsten frisch grasgrün war. Bis Ende April, also ca. $1\frac{1}{2}$ Monat wurde das Sputum dieser Pat. beim Stehenlassen regelmässig grün, und zwar wurde die grüne Farbe meist am 3. Tage deutlich bemerkbar, ab und zu wohl auch erst am 4. oder 5. Tage. Von da an verschwand die grüne Farbe eben so plötzlich wie sie gekommen war.

Endlich darf wohl mit diesen Vorkommnissen in Zusammenhang gebracht werden das Vorkommen von blaugrüner Verfärbung der Verbandstoffe bei einem an fistulöser Coxitis darniederliegenden Kinde. Das Kind hatte eine Zeitlang äusserer Verhältnisse wegen auf der chir. Frauenabth. gelegen, aber nicht im gleichen Saale mit der Phthisica, welche das eben erwähnte Sputum lieferte. Die blaugrüne Eiterung trat aber erst auf, als das Mädchen wieder auf der Kinderabtheilung lag. Leider gelang es nicht, den exacten bakteriologischen Nachweis zu erbringen, dass dieser Fall die gleiche Ursache habe mit den Fällen von grünem Sputum, da die Colonien auf den Platten äusserst langsam wuchsen (Schwächung des Wachstums durch das Sublimat der Verbandstoffe?) und die Platten vor genauerer Untersuchung durch ein Versehen entfernt wurden¹⁾.

An dieser Stelle sollte nun eigentlich die mikroskopische und chemische Untersuchung der Sputa folgen, doch sind die Resultate derselben unwesentlich, und es reihen sich auch hier leichter die Versuche an, die angestellt wurden, die Erzeuger des grünen Farbstoffs auf andere Sputa überzuimpfen. Da ich von Anfang an Mikroorganismen für die Ursache der grünen Verfärbung hielt, lag es nahe, diese Vermuthung zur Gewissheit zu erheben durch Ueberimpfen auf andere Sputa. Gelangen die

¹⁾ Gegen Ende September, als diese Arbeit beinahe vollendet war, kam grüne Verfärbung eines Sputums noch einmal zur Beobachtung, bei einem Tuberculösen im Absonderungshause. (Die Tuberculösen werden auf der Zürch. medic. Klinik bereits seit 4 Jahren als ansteckende Kranke isolirt.) Die bakteriologische Untersuchung dieses Sputums ergab ganz dieselben Resultate wie bei den früher beobachteten.

Impfversuche, so war die Natur der Verfärbung erkannt, denn an die Wirkung eines nicht organisirten Fermentes konnte nicht wohl gedacht werden, wegen der geringen Menge des jeweiligen übertragenen Materials. Die Anordnung der Versuche war eine äusserst einfache. Es wurden Sputa frisch von der Abtheilung her nach dem Laboratorium verbracht, und jedem eine Platinöse voll von einem der grün gewordenen Sputa zugesetzt, ohne irgend welche Vorsichtsmaassregeln.

Im Ganzen wurden über 50 Sputa dieser Behandlung ausgesetzt und beinahe zu $\frac{2}{3}$ derselben gelang die Uebertragung, wenn auch nicht jedesmal gleiche Intensität der Färbung erzeugt werden konnte, wie in den Originalsputis.

Unter diesen Sputis waren:

1) Ein Sputum von einem typischen Fall von Asthma bronchiale, fast rein schleimig, nur sehr spärliche Eiterflocken enthaltend. Es enthielt weder Curschmann'sche Spiralen, noch Charcot-Neumann'sche Krystalle. Die Farbe wurde nach der Impfung exquisit grasgrün (einmal untersucht).

2) Ein Sputum von einer Pat. mit Bronchiectasien ohne putride Bronchitis, Folge von pleurit. Schwarten mit Retraction. Es war ein deutlich vierschichtiges Sputum¹⁾, die oberste Schaumschicht stark entwickelt. Obgleich das Sputum dieser Pat. sehr oft der Impfung unterworfen wurde, gelang es niemals eine grüne Färbung zu erzielen. Auch trat sonst im Sputum im Verlaufe einiger Tage keine Veränderung ein, ausser Zusammensinken der Schaumschicht. Die Bacillen sind selbst durch Plattenculturen in dem Sputum nicht mehr nachzuweisen (5 Tage nach der Impfung) und sind offenbar nach der Impfung ziemlich rasch zu Grunde gegangen.

3) Sputa von Pneumonia fibrinosa.

Da im Frühjahr 1888 in Zürich eine kleine Epidemie von Pneumonien herrschte, war ich in der Lage Sputa aus allen Stadien der Pneumonie zu untersuchen, schön rostfarbene, zähe,

¹⁾ Eichhorst hat darauf aufmerksam gemacht, dass die von Traube als dreischichtig bezeichneten Höhlensputa eigentlich vier Schichten zeigen: eine unterste körnige Sedimentschicht, darüber eine Flüssigkeitsschicht, zu oberst eine Schaumschicht und unter dieser die Schicht der herunterhängenden Eiterballen.

mit wenig Schaum, stark schaumige, dünnflüssigere bei beginnendem Lungenödem und citronenfarbene Resolutionssputa. Eine Weiterentwicklung der Bacillen konnte in allen pneumonischen Sputis durch das Plattenverfahren nachgewiesen werden; doch wurde die Grünfärbung um so undeutlicher, je dünnflüssiger und blutreicher die Sputa waren, während bei den zähesten dieser Sputa die Farbe sehr schön grün wurde.

4) Sputa von Bronchitiden, von einer acuten fieberhaften, und von chronischen, mit Emphysem complicirten der verschiedensten Aetiologie. Und

5) Sputa von Phthisikern aus allen Stadien der Krankheit.

Diese letzteren können zusammengefasst werden, weil sie sich im Ganzen ähnlich verhielten. Eine grössere Anzahl von ihnen wurden im Verlaufe von 2—3 mal 24 Stunden schön grün. Andere bekamen wenigstens mehr oder weniger deutlich einen Stich in's Grüne und enthielten bei der Untersuchung durch das Plattenverfahren ziemlich reichlich die färbenden Bacillen. In einem Drittel dieser Fälle endlich (besonders von phthisischen Sputis) blieb jede Entwicklung der Bacillen aus.

Welche Eigenschaften dieser Sputa nun das Haften oder Nichthaften der Impfung bedingen, lässt sich nur schwer entscheiden. Offenbar spielen die bei der Impfung schon in dem Sputum vorhandenen Bakterien eine Hauptrolle, je nachdem sie Antagonisten oder Symbisten der geimpften Bacillen sind ¹⁾. Ausserdem kommen aber jedenfalls chemische und gewiss auch physikalische Eigenschaften der Sputa in Betracht. Am seltensten pflegte die Impfung anzuschlagen bei exquisiten Cavernensputis, auch bei stark schaumigem Auswurf blieb der Erfolg häufig aus. Dagegen waren die noch stark schleimigen, wenig schaumigen Sputa aus den Anfangsstadien der Phthise und von einfachen Bronchitiden ein sehr geeigneter Nährboden für die Bacillen, und selten blieb eine sehr schöne Entwicklung derselben auf diesen aus ²⁾.

¹⁾ Speciell zu den Tuberkelbacillen konnte ich keinerlei Beziehungen finden, trotz zahlreicher Untersuchungen in dieser Hinsicht.

²⁾ Ueber diese orientirenden Bemerkungen hinaus weiter darauf einzugehen, welche Sputa die Impfung aufgehen lassen, welche nicht, dürfte ohne eingehende chemische und bakteriologische Untersuchungen er-

Endlich erwähne ich noch, dass ich auch Uebertragung auf Eiter vornahm. Der Eiter stammte einmal von einem grossen Abscess in der Kniegegend, mehrmals von Empyemen. Die Bacillen gelangten darin ausnahmslos zu ganz guter Entwicklung, und erzeugten sehr deutlich, wenn auch nicht so schön wie in manchen Sputis, die grüne Farbe.

Diese Impfversuche wurden natürlich nicht alle von den s. v. v. Originalsputis gemacht, sondern jedes nach der Impfung grün gewordene Sputum wurde wieder als Ausgangspunkt für neue Impfungen benutzt. Endlich sei noch bemerkt, dass alle diese Versuche später in der Art wiederholt wurden, dass die Impfung mit Reinculturen der gezüchteten Bacillen ausgeführt wurde, und dass dabei so ziemlich dieselben Resultate erzielt wurden.

Der Bacillus.

Bevor ich zur Beschreibung des gefundenen Bacillus übergehe, muss ich noch kurz beschreiben, wie derselbe isolirt wurde. Es ist selbstverständlich, dass dazu die modernen Methoden benutzt wurden, welche von Robert Koch zur Trennung der verschiedenen Arten in einem Bakteriengemenge angegeben sind. Das Plattenverfahren wurde in ausgiebigster Weise in Anwendung gebracht, und mit demselben alle „Originalspata“ sowie die meisten nicht grün gewordenen und ein grosser Theil der grün gewordenen geimpften Sputa untersucht; bei den übrigen nach dem Impfen grün gewordenen Sputis wurde angenommen, dass die grüne Farbe ein genügender Beweis sei für die Entwicklung der Bacillen und dass daher eine weitere Untersuchung unnöthig sei. Ausser dem im Folgenden zu beschreibenden Bacillus fanden sich in den verschiedenen Sputis, bald in grösserer, bald in geringerer Arten- und Individuenzahl andere Mikroorganismen vor, deren Mannigfaltigkeit sehr bald jede genauere Berücksichtigung verbot. Weiter gezüchtet wurden also nur diejenigen Colonien, die auf der Platte eine grüne Farbe erzeugten. Von möglichst isolirten solchen Colonien wurden Stichculturen ange-

folglos sein. So zeitraubende Untersuchungen würde der Erfolg aber gewiss nicht lohnen, da ja nach dem Gesagten klar ist, dass sich keinerlei diagnostische Bedeutung ergeben würde.

legt, und diese erst nach mehrfachem Umzüchten auf der Platte und genauer Controle als Reinculturen betrachtet und zu weiteren Versuchen benutzt. Wo im Folgenden von Culturen gesprochen wird, sind immer Reinculturen gemeint, wo speciell von „Reinculturen“ die Rede ist, sind die betreffenden Culturen nach dem Abimpfen durch das Plattenverfahren geprüft und als rein erfunden worden.

Unter Bouillon verstehe ich Fleischwasser (500 g Fleisch auf 1000 g Wasser, 24 Stunden stehen gelassen, ausgepresst und filtrirt) mit 1 pCt. Peptonum siccum und 0,5 Natr. chlorat. versetzt, durch kohlen-saures Kali auf einen möglichst geringen Grad der Alkalescenzenz gebracht, gekocht und filtrirt;

unter Gelatine: solche Bouillon mit Zusatz von 10 pCt. Gelatine;

unter Agar statt Gelatine 2 pCt. Agar-Agar.

Kartoffeln sind genau nach der Koch'schen Vorschrift zubereitet. Wo andere Nährmedien zur Verwendung kamen, sind sie speciell besprochen.

Nach dieser Methode fand sich in allen grünen Sputis stets nur derselbe Mikroorganismus als Erzeuger der grünen Farbe. Keiner der sonst in den Sputis beobachteten Organismen brachte grüne Färbung hervor, auch bei langem Stehenlassen.

Der gefundene Spaltpilz konnte daher mit Sicherheit als der alleinige Erzeuger der grünen Farbe betrachtet und als solcher allein berücksichtigt werden.

Morphologie.

Die morphologischen Eigenschaften der Spaltpilze sind im Allgemeinen bei den verschiedenen Arten so ähnlich, und morphologisch einander scheinbar sehr nahestehende Arten zeigen so bedeutende physiologische Differenzen, dass heute wohl allgemein anerkannt wird, dass die morphologische Beschreibung eines Spaltpilzes sehr wenig Werth hat, dass sie zur Wiedererkennung der betreffenden Art sehr wenig beitragen kann. So steht die Systematik der Spaltpilze noch auf schwachen Füßen, und nur die gröberen Eintheilungen konnten auf die morphologischen Differenzen basirt werden. Darnach ist der hier zu beschreibende Pilz unzweifelhaft als *Bacillus* zu bezeichnen.

Die Dimensionen eines Spaltpilzes zu messen ist bekanntlich mit grossen Schwierigkeiten verbunden und ohne complicirte Apparate nicht genau möglich. Auch ist es selten dem, der einen Bacillus zu bestimmen wünscht, möglich, diese Messungen nachzumachen; daher haben die Messungen für die Diagnostik überhaupt wenig Werth. Giebt ja auch Eisenberg in seiner bakteriologischen Diagnostik unter 118 Spaltpilzen nur bei 38 Maassangaben; und auch bei diesen zeigt sich häufig genug, wie gering der Werth derselben ist, da Angaben vorkommen wie 1—4 μ Länge und 0,3—0,5 μ Breite und bei den Mikrokokken der Mastitis der Kühe gar ein Durchmesser von 0,2 bis 0,5 μ . Ernst findet die Länge seines neuen Bacillus des blauen Eiters gleich 2—4 μ , in Ausnahmefällen gleich 5—6 μ . Wenn die Maasse bei einer und derselben Art so different ausfallen können, so rechtfertigt dies gewiss, wenn die Angaben überhaupt etwas allgemein gehalten werden. Ueberdies ist zu bemerken, dass es bei genauen Maassangaben vor Allem darauf ankäme, Messungen an frischen, feuchten, lebenden Bacillen auszuführen, da die Schrumpfung im Canadabalsam ganz enorme Veränderungen bewirkt.

Ich kann mich daher mit folgenden morphologischen Angaben begnügen:

Der Erzeuger des grünen Sputums ist ein schlanker Bacillus, nur wenig länger und dünner als der Bacillus des Typhus abdom. (Gaffky). Die Länge übertrifft die Breite wohl um das 6—7fache an lebenden Exemplaren, in Canadabalsam eingeschlossene dagegen erscheinen kürzer und dicker, 4—5mal so lang als breit.

Die Enden der Stäbchen sind etwas abgerundet. Sporenbildung habe ich an diesen Bacillen niemals beobachtet, obgleich zu diesem Behufe ältere und ganz alte Gelatine, Agar, und Kartoffelculturen untersucht wurden, die zum Theil bei Zimmertemperatur, zum Theil im Brütofen stehen gelassen worden waren. Auch wurden an den Bacillen niemals Bewegungsorgane, Geisselfäden gesehen¹⁾.

¹⁾ Da mir nur die Linsen Oelimmersion Leitz $\frac{1}{12}$ und ein ausgezeichnetes Hartnack'sches Trockensystem No. 8 zur Verfügung standen, konnte ich auch nicht erwarten, so ausserordentlich feine Gebilde zu Gesicht zu bekommen.

Biologisches.

Das Verhalten im hängenden Tropfen.

Bringt man eine Spur von einer Cultur der Bacillen in einen hängenden Bouillontropfen und beobachtet diesen unter dem Mikroskop, so bemerkt man, dass die Bacillen sich darin äusserst lebhaft bewegen; sie schiessen hin und her, schlangenartige Bewegungen ausführend, und oft lassen sich einzelne durch mehrere Gesichtsfelder verfolgen, als ob sie zielbewusst bestimmte Bahnen verfolgten; sie kreuzen ihre Wege und auch daraus geht hervor, dass es Eigenbewegungen sind, welche wir vor uns haben, im Gegensatz zur Brown'schen Molecularbewegung und zu Bewegungen in Folge von Flüssigkeitsströmungen¹⁾.

Diese lebhafte Beweglichkeit macht es wahrscheinlich, dass der Bacillus doch 1—2 Geisseln besitzt, wenn dieselben auch nicht gesehen wurden. Wenn man das Präparat Stunden und Tage lang stehen lässt, so tritt sehr massenhafte Vermehrung der Bacillen ein, bis der Tropfen von ihnen dicht erfüllt und dadurch weisslich gefärbt ist; die Beweglichkeit der einzelnen Bacillen bleibt dabei Tage lang gleich lebhaft, so dass ein so dicht erfüllter Tropfen unter dem Mikroskop aussieht wie ein Ameisenhaufen oder ein Bienenschwarm. Selbst bei Impfung eines Tropfens destillirten Wassers tritt äusserst reichliche Vermehrung der Bacillen ein, und zwar sogar dann, wenn ein Wassertropfen zur Uebertragung auf den zweiten, dieser zur Uebertragung auf den dritten und so fort benutzt wurde, so dass ein Uebertragen von Nährmaterial mit den geimpften Bakterien nicht möglich ist.

¹⁾ Häufig kommt es vor, dass in einem hängenden Tropfen unmittelbar nach der Impfung die Bacillen unbeweglich scheinen, wenn das Impfmaterial von Agar- oder Gelatineculturen genommen wurde, dass sich aber ihre Beweglichkeit mehr oder weniger rasch einstellt, wenn der Tropfen bei geeigneter Temperatur stehen gelassen wird. Dies kommt auch bei vielen anderen beweglichen Bacillen vor, und rührt wohl daher, dass die Bacillen in der alten Cultur durch ihre eigenen Stoffwechselproducte in einen Zustand der Müdigkeit oder Lähmung gerathen sind, von dem sie sich in dem neuen Nährmaterial erst allmählich erholen, wenn nicht gar erst ihre Nachkommen wieder bewegungsfähig werden. Vielleicht ist auch eine Art Shockwirkung bei der plötzlichen Veränderung der Lebensbedingungen im Spiele.

Verhalten auf Gelatineplatten.

Werden *lege artis* Gelatineplatten von dem *Bacillus* des grünen Sputums gegossen und bei Zimmertemperatur¹⁾ stehen gelassen, so entwickeln sich die Colonien auf denselben wie folgt.

Nach 24 Stunden. Die 1. Platte ist schon ganz grün geworden, bedeckt mit zahllosen äusserst feinen Pünktchen, die sich unter dem Mikroskop als scharfumrandete kreisrunde Colonien erweisen. Auf den übrigen Platten ist noch keine Spur einer grünen Färbung zu bemerken. Die unter der Oberfläche der Gelatine liegenden Colonien sind vollkommen scharf contourirt; da sie stark lichtbrechend sind, erscheinen die Ränder dunkel, die inneren Partien heller; doch ist das Centrum wieder etwas dunkler, bräunlich gefärbt. Die Colonie fein granulirt. Auch die oberflächlichen Colonien sind absolut scharfrandig, aber nicht kreisrund, nur der Kreisform sich nähernd, mit etwas unregelmässigen Contouren. Die Randpartien der einzelnen Colonien zeigen eine Andeutung von feinen Liniensystemen. Die Colonien sind ganz flach, prominiren nicht über das Niveau der Platte, ihre Oberfläche ist fein chagrinirt, die Farbe ist ziemlich gleichmässig glashell, nur in einzelnen Colonien ist das Centrum um eine Nuance dunkler.

2 mal 24 Stunden. Die 1. Platte hat sich gar nicht verändert. Auf den übrigen Platten sind die Platten nur da zu vollständig freier Entwicklung gelangt, wo sie weit auseinander liegen; wo ihre Distanz gering ist, bleiben sie ganz bedeutend kleiner, ohne zusammen zu fliessen. Die grüne Färbung der Platte dagegen wird um so intensiver, je dichter die Colonien beisammen stehen. Meist ist nach 2 mal 24 Stunden die 2. Platte (1. Verdünnung) auch schon vollständig grün geworden. Die 3. Platte (2. Verdünnung) dagegen wird meist nicht mehr in toto grün, sondern nur in der Umgebung der sehr dünn gesäten Colonien. Die einzelnen Colonien sehen auf der 2. und 3. Platte im Ganzen gleich aus, nur sind die der 3. Platte, entsprechend dem grösseren zur Verfügung stehenden Raume weiter gewachsen; auch bei weiteren Verdünnungen konnte ich aber noch stärkere Entwicklung nicht erhalten. Die Colonien sind hier alle an die

¹⁾ Unser Laboratorium zeigte fast immer eine Temperatur von 16° Cels.

Oberfläche gedrunken und haben sich da vollkommen flach ausgebreitet, die Contouren sind noch immer vollständig scharf, aber sehr zart, etwas unregelmässig, lappig. Der Durchmesser einer Colonie beträgt 2,0—2,5 mm (auf der 3. Platte, auf der 2. Platte ist er sehr verschieden, je nach dem Raume). Im Centrum der Colonien sieht man nicht selten, aber durchaus nicht constant, ein feines Knöpfchen, das aussieht wie ein Schildbuckel, oder Nabel. Wenn es überhaupt vorkommt, findet es sich meist auf fast allen Colonien der Platte¹⁾. Die grüne Farbe ist in der Umgebung der Colonie noch schwach, während die Colonie selbst im auffallenden Lichte stark grün erscheint, im durchfallenden bläulich irisierend oder höchstens blass gelbgrün. Die Granulirung der Oberfläche ist etwas deutlicher geworden; die oben erwähnten Liniensysteme dagegen sind äusserst fein. Ausserdem finden sich noch senkrecht zu diesen Liniensystemen und ziemlich parallel zum Rande der Colonie abwechselnd dunklere und hellere Streifen, die von verschiedener Dicke an verschiedenen Stellen der Colonie herzurühren scheinen.

3mal 24 Stunden. Keine wesentlichen Veränderungen mehr auf den ersten Platten; wo die Colonien weit auseinander liegen, sind sie noch gewachsen, so dass ihr Durchmesser jetzt 3—5 mm beträgt. Namentlich aber sind sie dicker und succulenter geworden, viel saftiger grün, und die grüne Farbe ist gleichmässig über die Colonie verbreitet; auch im durchfallenden Lichte erscheinen die Colonien deutlich grün, und ebenso ist die grüne Farbe deutlich geworden in der Umgebung der Colonie.

Bei längerem Stehenlassen, selbst bis zu einigen Wochen bleiben die Platten gleich, die grüne Farbe persistirt in ihrer ursprünglichen Frische, die Liniensysteme am Rande der Colonie bleiben zart.

Niemals tritt auch nur eine Spur von Verflüssigung der Gelatine ein. Nach 2—3 Tagen tritt ein deutlicher Geruch nach Trimethylamin auf, ähnlich wie bei Platten des *Bac. (Microc.) prodigiosus*.

Ab und zu schiessen nach 1—2 Tagen Salzkristalldrüsen

¹⁾ Ein solcher Nabel findet sich auch bei anderen Bakteriencolonien auf der Platte. Am häufigsten habe ich ihn gesehen beim *Bacillus neapolitanus* von Emmerich.

auf, wie sie besonders häufig beim Emmerich'schen *Bacillus neapolitanus* beobachtet werden. Dieselben scheinen aber völlig bedeutungslos zu sein, da sie auch auf stehengelassenen sterilen Platten nicht zu selten vorkommen.

Stichculturen.

Nach 24 Stunden ist meist kaum erst eine Spur von Entwicklung der Cultur zu sehen.

2mal 24 Stunden. Auf der Oberfläche der Gelatine breitet sich um die Einstichstelle eine vollkommen flache, den Plattencolonien ähnliche Auflagerung aus, von ca. 3 mm Durchmesser. Im Stichkanal ist gerade nur eine Spur von Wachsthum wahrzunehmen, in Form einer Kette feinsten graulicher Pünktchen. Um die Einstichstelle herum zeigt die Gelatine eine leicht gelbgrünliche Färbung.

4mal 24 Stunden. Das Wachsthum schreitet an der Oberfläche fort, aber die Auflagerung bleibt dünn und zart, graulich gefärbt, während die Gelatine bis an das Glas hin und bis 1 cm tief eine intensiv grüne Farbe angenommen hat.

Weiterhin wird die Ausbreitung noch etwas grösser; die peripherischen Enden der lappigen Ausbreitung können dabei confluiren, während die centralen Theile der Lappen getrennt bleiben, so dass inselartige sterile Partien auf der Oberfläche zu sehen sind. — Die kleinen Colonien im Stichkanal entwickeln sich nicht weiter. Die Colonie ist feucht, grün, die Gelatine in der Umgebung 2—3 cm tief intensiv grün gefärbt und die grüne Farbe bleibt wochenlang in der ursprünglichen Intensität bestehen, wird dann mehr gelbgrün und zuletzt nach und nach braun, aber mit starker grüner Fluorescenz. So bleibt die Colonie 5—6 Monate lebens- und fortpflanzungsfähig.

Legt man auf schräg erstarrter Gelatine Impfstiche an, so entwickelt sich im ganzen Strich eine unregelmässig contourirte lancettförmige Colonie, die sich nach und nach über die ganze Gelatinefläche bis an's Glas hin ausbreitet. Die Auflagerung bleibt ziemlich zart, fein chagriniert, ganz analog den Plattenculturen. Die Gelatine nimmt auch hier im Verlaufe weniger Tage grüne Färbung an, und verhält sich nachher ganz wie bei den Stichculturen, indem die Farbe durch gelbgrün und

gelbbraun in braun mit starker grüner Fluorescenz übergeht und dies Monate lang bewahrt.

Sauerstoffbedürfniss.

Schon aus dem Verhalten der Stichculturen geht hervor, dass der Bacillus des grünen Sputums ein strenger Aërobe ist; denn die Spur einer Entwicklung im Stichkanal lässt sich wohl durch beim Impfen mitgerissene Luft erklären; dies genauer zu untersuchen wurden folgende Versuche angestellt.

Sterile Gelatine wurde auf sterilisirte Platten ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden eine Anzahl paralleler Impfstriche über die ganze Breite der Platten gezogen, und sofort über die Mitte der Impfstriche ein sterilisirtes Glimmerplättchen gelegt, derart, dass auf beiden Seiten die Enden der Impfstriche freiblieben, während ihre Mitte von den der Gelatine fest anhaftenden Glimmerplättchen bedeckt war. Es entwickelten sich nun auf den freigebliebenen Enden der Impfstriche Colonien ganz wie bei den Strichculturen, mit grüner Verfärbung der Umgebung, während die bedeckten Partien vom Sauerstoff der Luft abgeschlossen, völlig steril blieben. Wurde nachträglich das Glimmerstückchen vorsichtig entfernt, so wuchsen auch dort Colonien, als Beweis, dass nur der Abschluss von der Luft die Entwicklung gehemmt hatte.

Ferner wurden Stich- und Strichculturen in Gelatine und Agar angelegt, darüber etwas verflüssigte aber möglichst abgekühlte Gelatine gegossen, und nach dem Erstarren dieser noch etwas Oel daraufgeschüttet. Die Luft wurde durch die Gelatine und die Oelschicht vollständig abgehalten, das Oel konnte nicht an sich schädlich wirken durch die Gelatineschicht hindurch, und in der letzteren konnten keine, die beim Aufschütten allenfalls sich losgelöst hätten von der Einstichstelle, nicht zur Entwicklung gelangen, und so ein Wachsthum in der Tiefe vortäuschen, weil sie auch dort von der Luft abgeschlossen waren. Auch bei dieser Anordnung wurde nie eine Spur von Wachsthum oder Grünfärbung beobachtet.

Bouilloneulturen.

Nach 24 Stunden hat sich die geimpfte Bouillon schon ziemlich stark getrübt, die obersten Schichten der Bouillon sind bis

nahezu 1 cm tief grün gefärbt. Auf der Oberfläche liegt eine ziemlich dünne Kahlhaut von perlgrauer Farbe und glatter Fläche, die bis an den Rand des Gläschens reicht. Lässt man das Röhrchen so länger stehen, so wird die Kahlhaut noch etwas dicker (sie färbt sich dann auch wohl gelblichgrün) die grüne Farbe dringt noch etwas tiefer bis ca. 1,5 cm, aber weitere Veränderungen treten nicht ein. Schüttelt man dagegen das Röhrchen etwas, so löst sich die Kahlhaut von dem Gläschen, und zieht sich gegen die Mitte zu einem Knäuel zusammen, ohne aber unterzusinken; nur durch starkes und anhaltendes Schütteln gelingt es, die Kahlhaut zum Sinken zu bringen, und zwar immer erst dann, wenn die Haut längst durch das Schütteln in Fetzen zerrissen, und die grüne Farbe in der ganzen Flüssigkeit vertheilt ist, so dass die Bouillon wieder ganz oder fast ungefärbt erscheint. Bis zum nächsten Tage hat sich aber dann eine neue Grünfärbung der oberen Schichten und eine neue, etwas dickere Kahlhaut gebildet. Beim Schütteln wiederholt sich dasselbe Spiel wie das erste Mal, nur dass die Kahlhaut immer zerreislicher wird. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Behandlung kann man schliesslich den ganzen Inhalt des Röhrchens intensiv grün gefärbt bekommen. Endlich aber bildet sich keine neue Haut mehr, zum Zeichen, dass eben für eine weitere lebhaft Vermehrung der Bacillen Hindernisse da sind (giftige Stoffwechselproducte). Dies ist das Verhalten bei Zimmertemperatur (ca. 16° C.). Stellt man die Bouillonröhrchen in den Brütschrank, so wiederholen sich im Ganzen dieselben Erscheinungen, aber das Wachsthum erreicht früher sein Ende, die Bouillon ist früher mit Bacillen s. v. v. gesättigt; die grüne Färbung der Bouillon wird nicht so intensiv, kurz es zeigt sich, dass die Bacillen zwar bei 37° C. noch vegetiren, dass aber ihre Lebensfunctionen weit besser vor sich gehen bei tieferen Temperaturen (siehe Agarculturen). Dieses Verhalten des Bacillus in Bouillonröhrchen ist sehr charakteristisch.

Agarculturen.

Impfstriche auf schräg erstarrtem Agar gelangen ausnahmslos zu üppiger aber nicht charakteristischer Entwicklung. In der ganzen Ausdehnung des Impfstriches wächst eine etwas

trocken aussehende, weisslich glänzende Masse, die im Centrum ziemlich dick, gegen die Ränder zu allmählich flacher wird. Nach 3—5 Tagen hat das Wachstum bei Zimmertemperatur bereits sein Ende erreicht. Nur selten wächst die Colonie in Form einer flachen, weisslichen Auflagerung bis an den Rand des Gläschens hinan, anscheinend dann, wenn durch das Condensationswasser eine Verschleppung der Keime auf die ganze Oberfläche stattgefunden hatte; gewöhnlich überschreitet die Colonie nicht die Breite von 4—5 mm. Das Agar selbst nimmt meist schon am 2. Tage eine leicht grüne Färbung an, die dann im Laufe der nächsten 2—3 Tage intensiv wird; später macht die Farbe denselben Wechsel durch wie bei allen Gelatine-culturen.

Bei Stichculturen in Agar finden wir im Ganzen das entsprechende Verhalten; die weisslich glänzende Auflagerung um die Einstichstelle bleibt aber meist etwas dünn und erreicht nicht über 4—5 mm Durchmesser. Der Stichkanal bleibt natürlich nahezu steril. Die grüne Farbe kommt dabei entschieden sehr langsam zur Entwicklung und bleibt auch sehr sparsam.

Werden Agarculturen im Brütoven verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, so ist die Entwicklung am üppigsten bei 20 bis 25°, die grüne Farbe wurde dabei am intensivsten. Bei 30 bis 40°, namentlich bei letzterer Temperatur ist das Wachstum ein ganz erheblich schlechteres, namentlich wird die Cultur auch in längerer Zeit niemals so üppig wie bei 20°. Genauere Untersuchungen über das Temperaturoptimum sind nicht gemacht worden. Auf Agarculturen wachsen die Bacillen nicht zu Fäden aus, sondern vermehren sich als einzelne oder zu wenigen zusammenhängenden Stäbchen. Sporenbildung konnte auch auf alten Agarculturen nicht beobachtet werden, gleichviel, bei welcher Temperatur sie gewachsen waren.

Kartoffelculturen.

Werden l. a. Kartoffelculturen von dem *Bacillus* angelegt, so bildet sich im Laufe von zwei Tagen an der Impfstelle eine bräunliche, etwa nussfarbene, an Apfelgelee erinnernde ca. 1 mm dicke Auflagerung. Meist ist dieselbe scharf begrenzt, und bis an den Rand hinaus gleich dick, dort steil abfallend. Das

Wachsthum bleibt fast immer auf die Impfstelle beschränkt; nur selten wächst über die Impfstelle hinaus eine ganz flache, dünne Masse bis an den Rand der Kartoffelfläche, wahrscheinlich dann, wenn vom Deckel der Glaskammer herabfallende Wassertropfen die Keime dahin verschleppt haben. In der Umgebung der Colonie ist die Kartoffelfläche in einer 1,0—1,5 cm breiten Zone schmutzig violett verfärbt. Der Einfluss der Temperatur ist auch hier ein geringer. Bei Temperaturwechsel innerhalb 15—35° ist kaum eine Verschiedenheit des Wachstums zu constatiren, geht die Temperatur aber höher, so ist die Entwicklung eine langsamere und geringere. Untersucht man die apfelgeléartige Masse im hängenden Tropfen, so zeigt sich, dass die Bacillen auf der Kartoffel ähnlich den Typhusbacillen zu langen Fäden auswachsen, die sich in continuo schlangenartig bewegen; doch muss man natürlich beim Eintragen der Probe in die Bouillon vorsichtig sein, weil man sonst mit dem Platindraht die Fäden zerreisst, und nur noch ganz kurze Fäden oder einzelne Bacillen findet.

Milheulturen.

Milch ist bekanntlich schwer absolut keimfrei zu machen, und die für Gelatine allgemein gebräuchliche Art der Sterilisation genügt dafür nicht. Ich habe die benutzte Milch stets an drei aufeinander folgenden Tagen je eine Stunde lang im Dampfkochtopf der Temperatur von ca. 100° C. ausgesetzt. Die sonst fast ausschliesslich verwendeten Reagensgläschen sind für Milheulturen ganz unzweckmässig, da sich in ihnen eine hohe Rahmschicht¹⁾ bildet, welche, an sich als Nährboden schlecht, von den tieferen Schichten der (abgerahmten) Milch die Luft abhält, und damit die Entwicklung von aëroben Bakterien hemmt. Man verwendet daher am besten Erlenmeyer'sche Kölbchen, in welche man die Milch nur 1—2 cm hoch hineinfüllt. Die Rahmschicht fällt dann sehr dünn aus und kann leicht durchstossen oder durch Schütteln entfernt werden. Die Milch wurde theils ohne Zusatz, durch das Sterilisiren leicht gelblich gefärbt, oder mit Zusatz von ca. 10procentiger wässriger Lakmuslösung versetzt, verwendet. Regelmässig trat nach der Impfung eine

¹⁾ wegen der relativ bedeutenden Tiefe der Milchschieht.

ziemlich starke klumpige Coagulation des Caseins ein. Die Klumpen des letzteren blieben dann zunächst mehrere Tage unverändert, um hernach allmählich kleiner zu werden, bis sie schliesslich wieder fast ganz verschwanden, und nur noch eine gelbliche, wässrige Molke zurückblieb, in welcher kleine Caseinflöckchen schwammen. In dem Filtrat liess sich stets Pepton nachweisen. Die älteren Milhculturen ohne Lakmusedzusatz reagierten ausnahmslos sauer durch Bildung von Milchsäure. In denjenigen jedoch, welchen Lakmus zugesetzt worden war, konnte ich saure Reaction nur dann nachweisen, wenn die Menge des zugesetzten Lakmus eine geringe war. Sowie die Blaufärbung der Milch eine ausgesprochene war, so blieb sie unverändert oder wandelte sich höchstens in Blauviolett um, während schwache Blaufärbung entweder in einen röthlichen Ton umschlug oder ganz entfärbt wurde.

Wenn die Culturen sehr lange Zeit stehen gelassen wurden, so färbten sich nicht selten die Molke und namentlich die darauf schwimmenden Caseinflöckchen gelblichgrün.

Chemisches.

Die eben beschriebenen Wachstumserscheinungen auf den gebräuchlichsten Nährböden (Blutserum stand mir leider während dieser Untersuchungen nicht zu Gebote) genügen zur Diagnose eines Spaltpilzes; es ist aber zur genauen Kenntniss eines solchen von grosser Wichtigkeit, auch über gewisse physiologische Eigenschaften Aufschluss zu bekommen, und dazu mussten eine Reihe anderer Nährböden hergestellt werden. Es ist ja nach den Untersuchungen eines Pasteur und zahlreicher anderer Forscher vollkommen zweifellos, dass bestimmte Mikroorganismen ganz bestimmte chemische Wirkungen auf die sie umgebenden Substanzen ausüben, sei es nun auf directem Wege, indem sie dieselben bei ihrem Stoffwechsel gewissen Veränderungen unterziehen, oder aber indirect, indem bei ihrem Stoffwechsel Producte entstehen, welche an sich, getrennt von den Bakterien, chemisch auf die betreffenden Körper einwirken. Es ist daher für jeden Mikroorganismus zu untersuchen, ob solche Wirkungen, die wir im Allgemeinen als Fermentwirkungen, solche chemischen Vorgänge, die als Gährung, Fäulniss u. s. w. im Haushalt der Natur

eine ungeheure Rolle spielen, auch durch ihn angeregt werden, und welches die chemischen Vorgänge sind, die speciell mit seiner Lebensthätigkeit verbunden sind. Diese Prozesse sind sehr mannichfaltig; es kommen vor: hydrolytische Spaltungen, z. B. die Spaltung der Stärke in Zucker, der combinirten in einfache Zuckerarten, der Fette in Glycerin und Fettsäuren, die Spaltung der Eiweisskörper in Peptone, und weiter dieser in die sogenannten Fäulnisproducte (Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure und Glutaminsäure, Ammoniak u. s. w.), einfache Spaltungen (wenigstens scheinbar einfache; die Nebenproducte dieser Zersetzungen zeigen, dass die chemischen Vorgänge dabei wohl viel complicirter sind) z. B. die Zerlegung der einfachen Zucker in Alkohol und Kohlensäure, (Glycerin, Bernsteinsäure u. s. w.), oder in Milchsäure. Oxydationsvorgänge, so die Verwandlung des Alkohols in Essigsäure; complicirter ist die Verwandlung der Milchsäure in Buttersäure, besonders eigenthümlich die unter Wasseraufnahme erfolgende Umwandlung des Harnstoffs in kohlen-saures Ammonium.

Ein bestimmter Mikroorganismus kann nun eine einzelne oder mehrere solcher Umsetzungen bewirken. Bei Bakterien ist von derartigen chemischen Prozessen weitaus am häufigsten beobachtet die Verflüssigung der Gelatine. Da sie bei dem hier in Frage stehenden *Bacillus* niemals beobachtet wurde, wird sie hier nicht weiter besprochen.

Dagegen ist die Erzeugung des grünen Farbstoffs in gewissen Nährsubstanzen zweifellos ein solcher Vorgang¹⁾, und es ist daher an dieser Stelle über den Farbstoff und über die Bedingungen seiner Entstehung zu berichten.

Der Farbstoff ist in den ersten Tagen intensiv frisch grasgrün im auffallenden Lichte, im durchfallenden mehr gelbgrün; nach längerer Zeit (mehreren Wochen) wird er allmählich gelblich- oder bräunlichgrün, nach Monaten gelbbraun oder braun; aber stets behält er eine ganz intensiv dunkelgrüne Fluorescenz. Der Farbstoff dringt durch Diffusion in Gelatine und Agar tief ein, im Gegensatz z. B. zum Farbstoff des *Bac. prodigiosus*. Das Spectrum seiner Lösung enthält keine charakteristischen

¹⁾ Schröter nennt den Vorgang der Farbstoffbildung geradezu Pigmentgährung (Cohn, Pflanzenphys. Beiträge).

Absorptionsstreifen. Der Farbstoff ist unlöslich in Alkohol, Aether, Chloroform, leicht löslich in Wasser, namentlich in stark alkalischem Wasser (durch Kali oder Natronlauge oder Ammoniak). In stark alkalischer Lösung erscheint die grüne Farbe am intensivsten. Durch Säuren wird der Farbstoff zerstört, so dass die Lösung vollständig farblos ist, aber offenbar doch nicht wesentlich verändert, da sich durch Alkalisiren der Lösung jederzeit die grüne Farbe wiederherstellen lässt. Lässt man eine wässrige Lösung des Farbstoffs (reine salzfreie Lösungen konnte ich nicht herstellen) verdunsten, so hinterbleibt ein amorpher, schmutzig grüner Rückstand. Krystallinisch habe ich den Farbstoff nicht erhalten. Beim Kochen bleibt die Lösung unverändert; der trockene Rückstand verkohlt beim Erhitzen ohne auffällige Erscheinungen.

Leider bin ich nicht in der Lage mehr über den Farbstoff mitzutheilen, schon weil durch die oben angegebenen Löslichkeitsverhältnisse die Isolation derselben sehr erschwert ist.

Auch über die Bedingungen der Bildung des Farbstoffs konnte ich nicht viel eruiren. Die physikalischen Bedingungen stimmen mit den Lebensbedingungen des Bacillus völlig überein. Bei jeder Temperatur, bei welcher der Bacillus überhaupt zur Entwicklung kam, producirte er in geeignetem Nährmaterial auch den grünen Farbstoff. Dies ist nicht bei allen Bakterien der Fall. Schottelius¹⁾ hat nachgewiesen, dass man von *Micrococcus prodigiosus* im Brutschrank bei gewissen Temperaturen sehr üppige, aber völlig farblose Culturen erhält auf Kartoffeln, die doch sonst gerade besonders geeignet sind, den Farbstoff in reichster Menge zu erzeugen. Auch das Licht hat wie bei den meisten Pigmentbakterien gar keinen Einfluss, ganz im Gegensatz zu der Production von Farbstoffen, speciell von Chlorophyll bei den höheren Pflanzen. In absoluter Dunkelheit entwickelte sich die grüne Farbe gerade so schön und so rasch als im hellsten Tageslichte. Dieses Verhältniss, das sich bei fast allen Pigmentbakterien wiederholt, findet ein Analogon in der Farbenproduction der Tiefseethiere. Einzig der von Prove²⁾ entdeckte *Micrococcus ochroleucus* weicht von diesem Verhalten ab. Er

¹⁾ Biolog. Untersuchungen über den *Microc. prodigiosus*. Leipzig 1887.

²⁾ Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. IV.

producirt im Dunkeln keinen, im Licht einen schwefelgelben Farbstoff.

Von den chemischen Einflüssen wurde die Bedeutung des Sauerstoffs bereits besprochen. Bei Sauerstoffabschluss wächst überhaupt der Bacillus nicht.

Von entscheidendem Einflusse dagegen ist die Zusammensetzung des Nährmaterials. Die erste Frage war: Hat der Bacillus die Fähigkeit aus anorganischen oder einfachen organischen Verbindungen die jedenfalls hoch complicirte chemische Verbindung, den Farbstoff aufzubauen? Die im hängenden Wassertropfen beobachtete Vermehrung der Bacillen schien dafür zu sprechen, und ebenso Cohn's¹⁾ Angabe, dass er bei *Micrococcus luteus* und *aurantiacus* reichliche Production der Farbstoffe in eiweissfreien Nährlösungen beobachtet habe. Neelsen²⁾ sah in einer Lösung von Aschensalzen und milchsaurem Ammoniak den Farbstoff der blauen Milch entstehen, und schliesst daraus, dass der *Bac. syncyaneus* seinen Farbstoff auch in der Milch aus Milchsäure (nach Zersetzung des Milchzuckers) und Ammoniak (aus Zersetzung des Caseins) synthetisch darstelle.

Erdmann³⁾ dagegen lässt die Bakterienfarbstoffe durch analytische Vorgänge aus Eiweisskörpern entstehen.

Es wurde nun zunächst eine schwach alkalische Lösung von Aschensalzen hergestellt entsprechend den Angaben von F. Cohn⁴⁾ und als in dieser eine nennenswerthe Entwicklung von Bakterien nicht statt hatte, wurde ihr 1 pCt. weinsaures Ammonium zugesetzt. Diese letztere Lösung wurde dann zur Grundlage benutzt für eine Reihe weiterer Nährsubstrate, indem dieser Normalsalzlösung je 3—5 pCt. Amylum, oder 3 pCt. Milchzucker, 3 pCt. Rohrzucker, 3 pCt. Traubenzucker, 1—5 pCt. Harnstoff zugesetzt wurden. Dann wurde auch Normalsalzlösung das eine Mal mit 10 pCt. Gelatine, das andere Mal mit 2 pCt. Agar-Agar versetzt, und diese letzteren Mischungen theils so, theils nach Zusatz von 3 pCt. einer Zuckerart, benutzt. Alle

¹⁾ Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. I. Untersuchungen über Bakterien.

²⁾ Cohn, Beitr. Bd. III. Studien über blaue Milch.

³⁾ Journal f. prakt. Chemie. 1866. Ueber die Bildung von Anilinfarben aus Proteinkörpern.

⁴⁾ Beiträge zur Biologie der Pflanzen. I. Untersuchungen über Bakterien.

diese Lösungen wurden auf schwach alkalische Reaction gebracht und gründlich sterilisirt¹⁾. Auf all diesen Substraten fand eine geringe bis mässige Vermehrung der Bacillen statt; besonders deutlich war dieselbe nachweisbar auf den (durch Gelatine und Agar) festen Nährböden. Längs den Impfstrichen entwickelte sich auf diesen ein spinnwebartig dünner, aber ziemlich ausgebreiteter, stets vollkommen farbloser Belag. Niemals war auch nur eine Spur von grüner Färbung zu sehen. Wurden von solchen Culturen aus wieder Gelatineplatten gegossen, so entwickelte sich auf diesen stets wieder nur der eine in seinen Eigenschaften völlig unveränderte Bacillus.

So hatte es den Anschein, als ob der Mangel an Eiweiss die Bildung des Farbstoffs hintangehalten hätte. Es wurde daher neuerdings ein Nährboden hergestellt, bestehend aus Normalsalzlösung, 10 pCt. Gelatine und 1 pCt. Pepton (Pept. siccum). Darauf war die Entwicklung entschieden eine recht üppige, fast wie auf gewöhnlichem Agar; allein trotz alledem blieb jede Spur von grüner Färbung aus.

Daraus geht mit Sicherheit hervor, dass der Bacillus wachsen und sogar üppig gedeihen kann, ohne den grünen Farbstoff zu produciren, und dass mithin die Production des grünen Farbstoffes eine Luxusleistung des Bacillus ist, welche nur unter ganz bestimmten Verhältnissen auftritt. Diese Verhältnisse konnte ich leider nicht eruiren, sicher aber hängen sie rein vom Nährmaterial ab, und wahrscheinlich kann der Bacillus den Farbstoff nur aus hochcomplicirten Verbindungen abspalten.

Wie geringe Differenzen in der Zusammensetzung des Nährmaterials aber genügen, die Production des Farbstoffes hintanzuhalten, oder zu befördern, geht daraus hervor, dass in Decoctum althaeae reichlich grüner Farbstoff entsteht, in Mucilago salep jedoch gar keiner; und doch ist der Gehalt an Schleim, Stärke, stickstoffhaltigen Substanzen und Salzen bei beiden fast gleich.

¹⁾ Bei der Harnstofflösung ist das Sterilisiren etwas schwierig, weil durch anhaltendes Erhitzen in alkalischer Lösung der Harnstoff sich zersetzt. Ich sterilisirte daher zuerst die Salzlösung für sich und setzte nachher vorsichtig reinen Harnstoff zu. Darauf wurden die Röhren mehrere Tage stehen gelassen und nur diejenigen benutzt, welche vollkommen klar geblieben waren.

Die oben geschilderte Mannichfaltigkeit der Nährlösungen war aber auch gewählt worden, um den Bacillus auf andere „Gährwirkungen“ im weitesten Sinne des Wortes zu prüfen. Es fanden sich dabei weder diastatische, noch invertirende Fähigkeiten; Traubenzuckerlösungen bleiben dadurch völlig unverändert, jedoch vermag der Bacillus wenigstens in Milch den Milchzucker zu zersetzen unter Bildung von Milchsäure, daher tritt saure Reaction der Milch ein.

Die oben beschriebenen Nährsubstrate mit Milchzucker gaben dagegen keine Milchsäuregährung. Ich setzte daher zu gewöhnlicher Nährbouillon noch 2—3 pCt. Milchzucker und impfte hier den Bacillus hinein. In dieser Lösung erhielt ich stets neben grüner Färbung Production von Milchsäure, bis zu mässig stark saurer Reaction. Also auch diese Luxusleistung tritt nur unter bestimmten Verhältnissen ein, und die spärlichen Nährstoffe, die noch genügen Leben und Vermehrung des Bacillus zu unterhalten, reichen nicht aus, ihn zur Zersetzung des Milchzuckers zu veranlassen. Es ist daher in diesen beiden Fällen nicht die Noth, welche den Bacillus treibt Dinge anzugreifen, die er in besseren Verhältnissen verschmähen würde, sondern es ist eine für ihn selbst vielleicht ganz indifferente, ja im zweiten Fall wohl direct schädliche Nebenleistung.

Weitere durch den Bacillus angeregte chemische Umsetzungen konnte ich nicht nachweisen. Harnstoff wurde nicht zersetzt, selbst wenn er wie der Milchzucker direct zu Bouillon zugesetzt wurde. Zum blossen Vegetiren bedarf der Bacillus im Nothfall nur Wasser, Aschensalze und weinsaures Ammonium, um den Bedarf an C und O zu decken.

Färbemethoden.

Die Färbung eines Mikroorganismus ist eigentlich nichts als eine chemische Reaction und die Färbungen werden deshalb erst hier besprochen. Es ist darüber wenig zu sagen. Der Bacillus ist mit den gewöhnlich gebräuchlichen Lösungen der Anilinfarben leicht zu färben. Mit Fuchsin und Methylenblau gefärbt bleibt er schlank, aber die Färbung ist etwas blass. Gentianaviolett giebt eine sehr intensive Färbung; die Bacillen erscheinen darnach etwas dicker. Eine ganz gute Färbung erhält man nach der

Methode von Gram. Die Ehrlich'sche Tuberkelbacillenfärbung nehmen die Bacillen nicht an.

Einer specifischen Färbung habe ich nicht nachgeforscht.

Systematische Beschreibung der grünen Farbstoff producirenden Bacillen.

Es handelt sich nun darum, den im Vorhergehenden beschriebenen Bacillus zu recognosciren: Ist der Bacillus des grünen Sputums ein schon bekannter und beschriebener oder haben wir eine neue Art vor uns. Die Frage ist nicht leicht zu entscheiden; denn häufig sind die in der Literatur gegebenen Beschreibungen lückenhaft und viel zu kurz, als dass man daraufhin ein sicheres Urtheil abgeben könnte. Ich untersuchte daher selbst alle grünen Farbstoff producirenden Bacillen, deren ich habhaft werden konnte¹⁾.

So gelang es mir neben einander zu cultiviren und auf's Genaueste zu vergleichen 7 Bacillen, welche auf den meisten der gebräuchlichen Nährböden einen grünen Farbstoff produciren.

In den folgenden Tabellen sind diese 7 Bacillen neben einander gestellt, ähnlich wie in den Eisenberg'schen Tabellen. Die daselbst stehenden Angaben beruhen alle auf eigener Beobachtung. Die gebrauchten Namen sollen, soweit es nicht aus der Literatur entlehnte sind, durchaus nur vorläufige sein, um eine Verständigung zu erzielen; würden statt derselben nur Zahlen angewandt, B₁, B₂ u. s. w., so würden leicht Verwechslungen vorkommen. Die Systematiker mögen die beschriebenen Arten dann mit bleibenden Namen versehen.

Vergleichen wir diese Tabelle mit den Angaben in der Literatur, so stimmen die Beschreibungen der die Gelatine verflüssigenden Arten vollkommen überein.

Es ist der Bac. pyocyaneus β identisch mit B. pyocyaneus β , welcher von Ernst in der Zeitschrift für Hygiene Bd. 2, 1887 beschrieben wurde. Meine Culturen waren auch Abkömmlinge solcher, die Ernst nach Zürich gebracht hatte. Was die Verwandtschaft zwischen B. pyocyaneus α und β betrifft, so möchte ich doch bezweifeln, dass sie eine so nahe sei, wie es

¹⁾ Durch die Güte der Herren Prof. Flügge in Breslau und Dr. C. Fränkel in Berlin erhielt ich mehrere Culturen solcher Bacillen zugesickt.

Ernst behauptet. Denn die morphologische Aehnlichkeit oder Congruenz, wie es Ernst nennt, wird schwerlich ausreichen, die nahe Verwandtschaft der Bacillen aufrecht zu erhalten, wenn wir die Verschiedenheit der physiologischen Eigenschaften berücksichtigen. Die Farbstoffe, welche diese beiden Bacillen produciren, sind nemlich ganz differente. Der β -Farbstoff dunkelt beim Schütteln mit Luft (Sauerstoff) ganz auffällig nach, der α -Farbstoff nicht. β röthet sich mit Säuren ähnlich wie Lakmus und wird wieder grün mit Alkalien, α wird durch Säuren völlig entfärbt, durch Alkalien ebenfalls wieder grün.

Wenn wir diese Reactionen berücksichtigen, so finden wir sofort, dass das Pyocyanin der französischen Autoren Fordos¹⁾ und Gessard²⁾ mit dem β -Farbstoff identisch ist, dass diese Autoren also den *Bac. pyocyaneus* β vor sich hatten. Auch der Farbenwechsel beim Schütteln der Culturen mit Luft ist in Gessard's Arbeit erwähnt und erklärt: „une zone étroite seulement à la surface est colorée en bleu, tandis que la partie inférieure est jaune sale. Cependant par l'agitation le tout devient uniformément bleu; puis par le repos, la separation en deux couches se forme de nouveau (p. 37). Gessard macht darauf aufmerksam, dass das auch reine Pyocyanin durch reducirende Substanzen in einen schmutzig gelbgrünen (jaune sale) Farbstoff umgewandelt werden könne, und dass in den Culturen die Verwandlung des blauen Farbstoffs in den gelbgrünen durch die (reducirende) Thätigkeit der Bakterien bewirkt werde. Um dies zu beweisen, hemmte er die Thätigkeit der Bakterien nach dem Umschütteln durch Zusatz von Ammoniak, oder filtrirte in anderen Experimenten die Bakterien ab und fand dann stets, dass die Flüssigkeit schön blau blieb. Nach all dem ist es zweifellos, dass die älteren Autoren den *B. pyocyaneus* β gesehen und seinen Farbstoff beschrieben haben. In den neueren Beschreibungen von Reinculturen ist aber der α -Bacillus beschrieben, nur sind die Angaben über den Farbstoff falsch, weil sie den Arbeiten über den β -Bacillus entnommen sind.

Der α -Farbstoff stimmt ziemlich überein mit dem Farbstoff des grünen Sputums, des *Bacillus virescens* und der übrigen in

¹⁾ Compt. rendues de l'acad. de science. Vol. 51.

²⁾ De la pyocyanine et de son microbe. Thèse de Paris 1882.

der Tabelle beschriebenen Bakterien. Der *B. pyocyaneus* β steht daher ganz allein da mit seinem von allen anderen verschiedenen Farbstoff, und darauf darf wohl die Behauptung gegründet werden, dass die Verwandtschaft zwischen α und β keine nahe sei, dass wir hier mindestens nicht „Spielarten“ vor uns haben.

Der *Bac. pyocyaneus* α stimmt mit den Beschreibungen des *Bac. pyocyaneus* bei Flügge, Eisenberg und Fränkel genügend überein; nur die Bemerkungen über den Farbstoff sind den Angaben über den β -Bacillus entnommen und daher falsch. Ferner heisst es bei Flügge, dass die Kartoffeln, welche Culturen dieses Bacillus enthalten, durch Ammoniak oder durch langes Liegen an der Luft grün werden. Dies hängt offenbar gar nicht mit der Entwicklung der Bacillen zusammen. Ich habe diese Erscheinung bei vielen Bakterien beobachtet, besonders deutlich wenn Kalilauge auf die Kartoffeln aufgeträufelt wurde, z. B. beim Emmerich'schen *B. neapolitanus*, und ebenso bei Kartoffeln, die ich absichtlich längere Zeit steril aufbewahrt hatte. Auch Schröter¹⁾ hat die spontane Bildung eines dunkel saftgrünen Farbstoffes auf Kartoffeln gesehen, ohne dass er Mikroorganismen dabei betheiligt finden konnte.

Was die pathogene Wirkung des *Bac. pyocyaneus* (α) betrifft, so sind die Mittheilungen darüber neueren Datums. Die erste Notiz darüber findet sich in den Eisenberg'schen Tabellen (Meerschweinchen sterben, Kaninchen bleiben am Leben). Eisenberg giebt übrigens die Autorschaft dieser Angaben Koch.

Dann hat Ledderhose²⁾ darüber berichtet. Bei seinen Experimenten gingen die Meerschweinchen und Kaninchen, denen er Bacillen in die Bauchhöhle injicirte, an sero-fibrinöser Peritonitis innerhalb 12—36 Stunden zu Grunde. Der Farbstoff an sich ist nach Ledderhose nicht giftig. (Gessard giebt vom β -Farbstoff an, dass Injection von 2 mg Pyocyanin bei Vögeln vorübergehendes Unwohlsein erzeugte.)

Meine Versuche betreffen zwei Meerschweinchen. Dem einen wurde eine Platinöse voll von einer Reincultur von *B. pyoc.* α in einem Gramm sterilisirten Wassers aufgeschwemmt, in die

¹⁾ Cohn, Pflanzenphysiologische Beiträge. Bd. I.

²⁾ Tageblatt der Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Wiesbaden. Ueber den blauen Eiter.

Bauchhöhle injicirt. Dieses Thier starb nach 30 Stunden. In der Bauchhöhle fand sich viel seröse, ganz leicht getrübtte Flüssigkeit, die sehr sparsame Rundzellen, aber äusserst reichliche Bacillen enthielt. Auch im Herzblut fanden sich die Bacillen, und im Gewebssaft der Leber und Milz, wenn auch nicht so reichlich. Der seröse Ueberzug der Leber zeigte einen starken fibrinösen Belag, derjenige der in der Nähe der Injectionsstelle gelegenen Darmschlinge war getrübt; bei den weiter entfernt liegenden Darmschlingen spiegelte die Serosa. Sonst kein pathologischer Befund. Dem anderen Meerschweinchen wurde möglichst wenig einer Cultur, ebenfalls in sterilisirtem Wasser, in die Bauchhöhle injicirt. Das Thier schien mehrere Tage krank, frass nichts, erholte sich aber ziemlich bald und schien dann gesund. Erst nach mehr als 3 Monaten begann es wieder zu kränkeln, hörte auf zu fressen und ging zu Grunde nach fast 4 Monaten. Auch hier fand sich eine Peritonitis, aber ausgedehnter, mit Verwachsungen und in der Lebergegend mehrere abgesackte Abscesse, welche einen dicken, fast citronengelben Eiter enthielten. Die Bacillen konnte ich weder im Eiter, noch im Blut oder in den Organen mehr nachweisen, da ich aber sonst keinen Grund für die Affection fand, glaube ich doch annehmen zu dürfen, dass sie die Peritonitis angeregt haben, wenn sie auch später zu Grunde gegangen sind. Die übrigen Organe waren intact. Weitere Untersuchungen konnte ich leider nicht anstellen, doch wären solche, namentlich für den *B. pyocyaneus* β , sehr erwünscht.

Was den *Bac. fluorescens liquefaciens* betrifft, so stimmt derselbe in allen Punkten überein mit dem von Flügge unter demselben Namen, von Eisenberg unter dem Namen „Grün-gelber Bacillus“ in der Reihe der verflüssigenden (No. 8. 2. Aufl.) beschriebenen. Fränkel spricht von zwei verschiedenen Bacillen, die der Bezeichnung *Fluorescens liquefaciens* entsprechen, die sich aber durch die Form ihrer Colonien auf Platten u. s. w. unterscheiden (*B. fluor. liq.* α und β). Da er aber keine genaueren Angaben macht, so konnte dies vorläufig nicht berücksichtigt werden.

Schwieriger ist die Sache bei den nicht verflüssigenden Arten,

Nur einen, den *Bac. fluorescens*, konnte ich mit Sicherheit identificiren mit dem bei Eisenberg unter dem Namen „fluorescirender Bacillus“ unter den nicht verflüssigenden (No. 30. 2. Aufl.) beschriebenen. Derselbe Bacillus ist auch bei Fränkel¹⁾ kurz beschrieben. Flügge dagegen spricht nicht von ihm.

Dagegen findet sich bei Flügge die Beschreibung eines *Bacillus fluorescens putridus*. Er ist lebhaft beweglich, verflüssigt nicht, bewirkt auf Platten starken Geruch nach Häringslake. Offenbar ist dieser Bacillus identisch entweder mit *B. virescens* oder mit *B. viridis pallescens*, wahrscheinlich mit ersterem, weil nichts davon angegeben wird, dass die Farbe bald erblasst, denn auch weil bei diesem der Geruch nach Häringslake, wenn auch nicht sehr auffällig, doch immerhin deutlich war, bei letzterem dagegen fast ganz ausblieb.

Endlich finden sich in der Literatur überall Angaben über einen *Bacillus erythrosporus*²⁾, den ich leider nicht in Originalcultur zur Vergleichung bekommen konnte, der aber mit keinem der oben beschriebenen Bacillen übereinzustimmen scheint.

Er ist beweglich, verflüssigt die Gelatine nicht; bei Stichculturen findet sich nach Flügge und Eisenberg im Stichkanal reichliche, nach Fränkel wenigstens mässige Entwicklung, darnach wäre der *Bac. erythrosporus* ein facultativer, die von mir beschriebenen Arten dagegen sind strenge Aëroben. Den Namen *Erythrosporus* hat der Bacillus daher, dass (bei Zimmertemperatur) in jedem Stäbchen 2—8 grosse, ovale, z. Th. über den Contour des Bacillus herausragende Sporen von eigenthümlich rothglänzender Farbe entstehen. Der Bacillus muss darnach beträchtlich grösser sein als die in der obigen Tabelle beschriebenen.

Die Farbe wird (bei Flügge und Eisenberg) als im durchfallenden Licht grün, im auffallenden Licht gelb beschrieben (also umgekehrt als bei allen anderen).

Die folgende Tabelle giebt die Beschreibung des *Bac. ery-*

¹⁾ Grundriss der Bakterienkunde. 1. Aufl. Berlin 1887. S. 186.

²⁾ Aeltere Beschreibungen von Eidam in Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen Bd. I. und Wernich, ebendasselbst Bd. III. Neuere bei Fränkel, o. c. S. 186. Flügge, Mikroorganismen. S. 288. Eisenberg, Bakteriolog. Diagnostik. No. 33.

throsporus in der gleichen Form wie die der übrigen Arten, entnommen den Angaben der oben citirten Autoren.

Bacillus erythrosporus.

Morphologisches.	Schlanke Bacillen mit abgerundeten Enden, oft kurze
Form. Anordnung.	Fäden bildend. Viel grösser als <i>B. virescens</i> u. s. w.
Beweglichkeit.	Lebhaft beweglich.
Wachsthum auf Platten.	Weissliche Colonien mit unregelmässiger, aber scharfer Begrenzung. Später gefurchter und gefalteter Belag, der Rand gebuchtet. Schwache radiäre Streifung der Oberfläche. Grünlichgelb fluorescirende Färbung um jede Colonie.
Stichculturen.	Gelatine. Reichliches Wachsthum im Stichkanal, noch mehr auf der Oberfläche. Allmählich bei durchfallendem Licht grüne, bei auffallendem gelbe Färbung der Gelatine.
Bouillonculturen.	— — —
Kartoffeln.	Anfangs röthliche, später mehr nussfarbene Auflagerung.
Milch.	— — —
Temperaturverhältnisse.	Gedeiht nicht bei höherer Temperatur.
Sporenbildung.	Bildet bei Zimmertemperatur in jedem Stäbchen 2—8 grosse, ovale Sporen, die theilweise über den Contour des <i>Bacillus</i> hinausragen und deutlich schmutzig rothe Farbe zeigen.
Sauerstoffbedürfniss.	Keine Angaben, aber nach dem Wachsthum im Stichkanal ist der <i>Bacillus</i> ein facultativer Anaërobe.
Verflüssigung der Gelatine.	Verflüssigt nicht.
Production von Farbstoffen.	Producirt einen grünlichgelb fluorescirenden Farbstoff, der im durchfallenden Lichte grün, im auffallenden gelb erscheint.
Pathogenesis.	Nichts bekannt.

Schliesslich finden sich in der Literatur noch mehrere Angaben über Mikroorganismen, welche grüne Farbstoffe produciren; Engelmann hat ein „*Bacterium chlorium*“ beschrieben, von Thieghem ein „*Bact. viride*“ und einen „*Bacill. vireus*“, Cohn einen „*Micrococcus chlorinus*“; allein alle diese Angaben entsprechen nicht einmal den geringsten modernen Anforderungen

an die Beschreibung eines Mikroorganismus, so dass es fruchtlos wäre, sich systematisch weiter mit ihnen zu beschäftigen.

Es bleiben daher als gegenwärtig wenigstens so weit bekannt, dass sie mit Sicherheit wiedererkannt werden können

8 Bacillen, welche auf den meisten der gewöhnlich gebrauchten Nährböden einen grünen oder gelbgrünen Farbstoff produciren. Die folgende analytische Tabelle kann als Schlüssel dienen zum Bestimmen der Arten, wenn als gemeinsames Merkmal aller eben die Production der grünen Farbe genommen wird.

- Bacillen, welche auf Agar und Gelatine von der oben angegebenen Zusammensetzung grünen Farbstoff produciren. 1.
1. a) Die Gelatine verflüssigend. 2.
 - b) Die Gelatine nicht verflüssigend. 4.
 2. a) Bouillonculturen und verflüssigte Gelatineculturen werden beim Schütteln (Sauerstoffzutritt) erheblich dunkler grün (Chamäleonphänomen, Ernst). Der Farbstoff wird durch Säuren roth, durch Alkalien wieder grün. *Bac. pyocyaneus* β .
 - b) Beim Schütteln der Culturflüssigkeiten bleibt die Farbe völlig unverändert. Der Farbstoff wird durch Säuren entfärbt, durch Alkalien auch wieder grün. 3.
 3. a) Die Colonien auf Platten niemals scharfrandig; die Contouren verschwommen, durch feine radiäre Fäserchen (ähnlich den Rhizopoden), welche sehr dicht stehen. *Bac. pyocyaneus* α .
 - b) Die Colonien auf Platten zuerst scharfrandig, unregelmässig lappig, flach, mit fein granulirter Oberfläche, später als dunkles unregelmässiges Häufchen in die Tiefe der Verflüssigungsgruben sinkend.
Bac. fluorescens liquefaciens.
 4. a) Bacillen beweglich. Die Bouillonculturen bilden Kahlmhäute und die Bouillon nimmt wenigstens etwas grüne Färbung an. 5.
 - b) Bacillen unbeweglich. Auf Bouillon entstehen keine Kahlmhäute. Die Bouillon bleibt ungefärbt. 6.
 5. a) Die grüne Farbe der Gelatineplatten blasst rasch (24—48 Stunden) ab zu einem hellblau-grünen Farbenton, die Colonien wachsen auf der Platte bis zu 2,5 cm Durchmesser. Die Bouillon wird nur blass bläulich-grün gefärbt, die Kahlmhaut sinkt beim Schütteln leicht unter.
B. viridis pallescens.
 - b) Die grüne Farbe der Gelatineplatten bleibt wochenlang bestehen. Die Colonien bekommen höchstens 1,5 cm Durchmesser. Die Kahlmhaut der Bouilloncultur sinkt leicht unter. Die Bouillon wird intensiv saftgrün gefärbt. . . . *B. virescens*¹⁾. (*B. fluorescens putidus* Flügge?)

¹⁾ Es mag auffällig erscheinen, dass die geringen Differenzen zwischen *B. virescens* und *B. v. pallescens* als zur Trennung in zwei Arten ge-

- c) (In die Gruppe 5 gehört wahrscheinlich auch *Bac. erythrosporus*, der sich von den beiden anderen leicht durch das Wachsthum im Stichkanal, eventuell auch durch die Sporen unterscheidet.)
6. a) Die Colonien auf der Platte hügel förmig prominirend, fast kreisrund, auf der Oberfläche glatt, glänzend. In den Bouilloneulturen ein deutlicher irisirender Ring auf dem Glase in der Höhe des Flüssigkeitsniveaus. B. Iris.
- b) Die Colonien auf der Platte vollkommen flach, nicht prominirend, unregelmässig lappig, aber scharf begrenzt. Die Oberfläche fein granulirt. In Bouilloneulturen kein solcher Ring; die Bouillon wird etwas dicklich. B. fluorescens.

Und zum Schlusse noch einmal auf den Anfang zurückzukommen, mag hier erwähnt werden, dass ich mit all diesen 7 Bakterienarten noch Impfungen auf Sputa ausführte, und dass ich bei allen Arten Vermehrung und Production des grünen Farbstoffs darin bekam mit Ausnahme des *B. pyocyaneus* β'). Es können also verschiedene Bakterien die nachträgliche Grünfärbung der Sputa bewirken, wenn sie eben nur Gelegenheit haben, hineinzugelangen. Ueber die Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen Arten besitzen wir jedoch keine Vorstellung.

Endlich kann auch hier noch einmal hervorgehoben werden, dass dieser nachträglichen „Infection des Sputums“ keinerlei klinische Bedeutung zukommt.

Grüne Sputa bei Lungentumoren.

Die letzten Mittheilungen über grüne Sputa betreffen Fälle von Lungentumoren. Elliot²⁾ beobachtete 1875 zuerst grüne Sputa bei Lungencarcinom, Janssen³⁾ 1879 bei einem von den

nügend erachtet wurden, allein die Berechtigung dazu wurde aus der absoluten Constanz dieser Differenzen abgeleitet. Es ist jedenfalls zweckmässiger auf Gebieten, wo der Begriff der Art und der Gattung noch so wenig fixirt ist, von getrennten Arten zu sprechen, als von Varietäten, Unterarten, Formen u. s. w.

¹⁾ Ich will aber damit nicht sagen, dass es nicht Sputa geben könne, in denen doch gelegentlich auch dieser Bacillus zu reichlicher Entwicklung gelangen könnte, nur scheint er etwas andere Lebensbedingungen zu verlangen als die übrigen.

²⁾ British med. Journal. 1875. Primary cancer of the lung.

³⁾ Ein Fall von Lungensarcom mit grasgrünem Auswurf. Inaug.-Diss. Berlin 1879.

Mediastinaldrüsen ausgegangenen Lungensarcom. Endlich hat Rütimeyer¹⁾ 1886 noch einen Fall von Lungensarcom mit grünem Auswurf beschrieben. Die Sputa von Elliot und Rütimeyer waren mehr olivgrün, das von Janssen dagegen exquisit grasgrün. Selbstverständlich gehören auch diese Sputa in die Reihe B. von Nothnagel²⁾, wo sie aufzuführen sind als

5)³⁾ Bei Lungentumoren (Carcinom und Sarcom). Das Sputum wird schon grün (olivgrün oder grasgrün) gefärbt expectorirt.

Damit ist wohl die Reihe des Vorkommens grüner Sputa, soweit dasselbe heute bekannt ist, erschöpft.

Es erübrigt mir noch die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer und Chef, Herrn Prof. Dr. H. Eichhorst für die Anregung zu dieser Arbeit und die Förderung derselben, so wie für die vielfache Belehrung während meiner Assistentenzeit, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

¹⁾ Ein Fall von primärem Lungensarcom. Correspondenzbl. f. Schweizer Aerzte. 1886. No. 7.

²⁾ Op. cit.

³⁾ Das Sputum v. Escherich.
