

Archiv  
für  
pathologische Anatomie und Physiologie  
und für  
klinische Medicin.

Bd. 163. (Sechzehnte Folge Bd. III.) Hft. 3.

---

XXII.

**Symbiose zweier pleomorpher Faeces-Bakterien.**

(Aus dem hygienischen Institut der Universität in Utrecht.)

Durch

Dr. J. H. F. Kohlbrugge,

Privatdocenten für Klimatologie und Tropenkrankheiten.

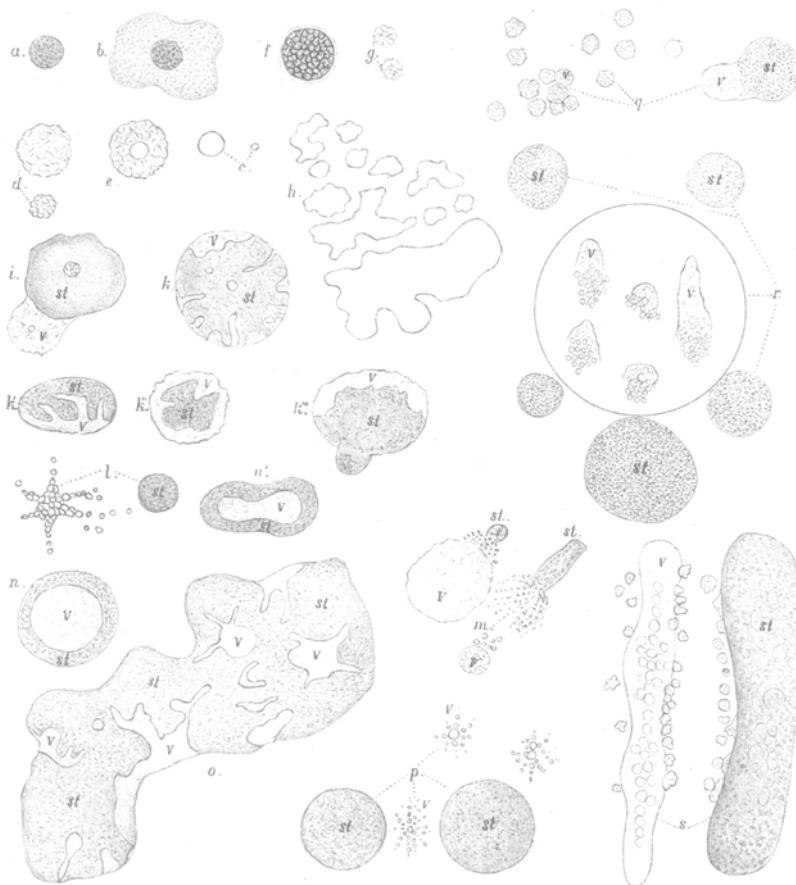
(Hierzu Taf. X.)

---

Bei der Untersuchung des diarrhoeischen Stuhles eines Patienten, der an Darm-Tuberkulose litt, in dem auch die Tuberkelbacillen nachgewiesen wurden, fertigte ich auch eine Gelatineplatte an, um Reinculturen der Faeces-Bakterien zu gewinnen. Bei Abstrich der Colonien in Gelatineröhrchen ergab sich nun nach einigen Tagen, dass zwei dieser Gläser eine Mischcultur zeigten.

Dieser Befund war an und für sich nicht erstaunlich, denn wenn z. B. die Aussaat etwas zu dicht ist, so können solche Mischculturen beim Ueberimpfen leicht entstehen. Ich hätte auch nicht weiter darauf geachtet und die Gläser zur Seite gestellt, wenn die Mischculturen nicht neben Kurzstäbchen (a) auch schöne, deutliche Vibrionen (b) gezeigt hätten. Da ich nun grade mit Vibrionen-Studien beschäftigt war, so wünschte ich den Vibrio zu isoliren.

Ich nannte das Kurzstäbchen a, den Vibrio b und machte dadurch zwischen beiden eine scharfe Trennung. Damit anti-



cipire ich allerdings eine erst später erlangte Sicherheit, denn Anfangs war ich, wie ich unten zeigen werde, oft nicht im Stande, a von b zu unterscheiden. Indem ich die Trennung gleich hier als eine vollzogene annehme, erspare ich aber anderen bei der Lectüre manches Kopfzerbrechen, dem ich während der ersten Monate dieser Untersuchungen ausgesetzt war.

Um den Kommbacillus zu isoliren, machte ich die gebräuchlichen Aussaaten in Agarschalen. In diesen entwickelten sich kleine, weisse Colonien, zwischen ihnen war der Agar mit einem feinen, grauen Schleier bedeckt. Die Colonien wurden in Gelatineglycerine übergeimpft, und in den Gläsern entwickelten sich nur kokkenförmige Bacillen (a); auch untersuchte ich den feinen Schleier durch gefärbte Präparate und fand in denselbigen nur Kokken und Kurzstäbchen (a + b<sup>1</sup>), wie sich später herausstellte, der Vibrio (b) fand sich aber nicht<sup>1</sup>). Es war mir unbegreiflich, wo der Vibrio geblieben sein könnte, und ich konnte nur schliessen, dass er sich nicht auf Agar entwickeln könne.

Die Culturen blieben wegen anderer Arbeit einige Zeit stehen, nach 2 Monaten untersuchte ich wieder die alten verflüssigten Gelatinegläser und constatirte wieder Stäbchen (a) und Vibrionen (b). Wieder wurden Agar-Aussaaten angefertigt; in den weissen Colonien fanden sich nur Kurzstäbchen, welche die Gelatine schnell und zwar in Form einer Cholera-Luftblase verflüssigten, ich untersuchte die Gläser alle 8 Tage, stets zeigten sich nur Kurzstäbchen, der Vibrio war verschwunden.

Machte man neue Stichculturen aus der gemischten Stammcultur (a + b), dann sah man während der ersten Tage in Präparaten zwar häufig auch nur Kurzstäbchen (a + b<sup>1</sup>), aber am dritten Tage zeigten sich stets die Vibrionen (b), die stetig zunahmen, es wurde dies wiederholt constatirt; seltener zeigten die Stichculturen gleich am ersten Tage vereinzelte Vibrionen (b).

Es wurden nun Gelatineplatten gegossen. In diesen entwickelten sich kleine, runde, gelbe, scharf umgrenzte, feinkörnige Colonien, welche in der Tiefe der Gelatine lagen (Taf. X Fig. a). Die oberflächlichen waren grösser und etwas heller. Die tiefen wuchsen zur Oberfläche empor und erhielten dann einen sehr

<sup>1</sup>) b<sup>1</sup> ist die zweite Wuchsform des Vibrio b, die erst viel später als solche erkannt wurde.

hellen, buchtigen Hof (Fig. b); letztere zeigten sich meist erst nach 48 Stunden. Zu dieser Zeit traten in der Gelatine noch andere Colonien hervor. Sie waren sehr durchscheinend, fast ungefärbt, die tiefliegenden hatten einen scharfen Rand (Fig. c), die oberflächlichen waren sehr grobkörnig wie Cholera-Colonien (Fig. d). Die tiefen dieser hellen Sorte können auch später einen Hof erhalten (Fig. e). Drittens bemerkte man nach 48 oder 72 Stunden sehr dunkle, fast schwarze, grobkörnige Colonien; sie erhalten einen hellen kraterförmigen Hof und verflüssigen (Fig. f).

Von den gelben, den hellen und schwarzen Colonien wurden Präparate angefertigt, alle Sorten zeigten nur Kurzstäbchen (a+b<sup>1</sup>). Die schwarzen Colonien aber zeigten, wenn sie verflüssigten, Kurzstäbchen und Vibronen (a+b), war die Verflüssigung nach 72 Stunden in der Platte mehr verbreitet, dann fand man überall Vibronen (b). Impfte man von der verflüssigten Gelatine in frische Gelatineröhrchen, dann wurden auch diese schnell peptonisiert und zeigte Kurzstäbchen und Vibronen (a+b).

Ich hatte also in keiner einzigen Colonie eine Reincultur von Vibronen (b) gefunden.

Ich schloss daraus, dass die Vibronen sich auf Gelatineplatten erst dann entwickeln können, wenn das mit ihnen gepaarte Kurzstäbchen die Gelatine zu peptonisiren anfängt. Sie müssen also wohl in den Colonien potentia enthalten sein, lassen sich aber nicht nachweisen. Da nun Stichculturen zuweilen wohl einige Vibronen vor der Verflüssigung zeigten, so war also doch Verflüssigung zur Entwicklung nicht absolut erforderlich; es schien fast, dass Petri-Schalen den Vibronen weniger günstige Verhältnisse zur Entwicklung boten, zumal man bei Abstich der Colonien einmal verflüssigende und dann wieder nicht verflüssigende gemischte Culturen erhielt. Dieser Wechsel der Verflüssigung, der sich vor der Platten-Aussaat nie gezeigt hatte, war ein neues Räthsel.

Ich entschloss mich nun zunächst, da die Agarplatten nie Vibronen gezeigt hatten; (auch nicht nach Ueberimpfung in Gelatine), festzustellen, ob die Vibronen durch den Agarnährboden oder durch die Temperatur von 37° zu Grunde gingen. In Bouillon bei 37° verschwanden die Vibronen auch, die Kurzstäbchen zeigten aber Neigung zu langen Fäden auszuwachsen,

die oft die Gestalt grosser Vibrionen vortäuschten; aus solchen Bouillonculturen liess sich der Vibrio auch nicht beim Wechsel der Nährböden oder niederer Temperatur zurückfinden. Er war also abgestorben.

Ich machte aus diesen Culturen, die Vibriofrei schienen, auch Gelatineplatten und fand nach 24 Stunden nur die Colonien der Fig. a, nach 48 Stunden auch viele der Fig. b, und nach 86 Stunden zeigten sich auch schwarze, wie Fig. f. Diese verflüssigten, zeigten dann aber keine Vibrionen. Man bemerkte aus diesen Zeitangaben, dass die Ausbildung der Colonien und die Verflüssigung eine verlangsamte war, das Stäbchen war also nicht mehr so lebenskräftig, wenn ihm sein Kamerad, der Vibrio, fehlte, auf jeden Fall war die Bildung des peptonisirenden Ferments verlangsamt. Es werden später ähnliche Beobachtungen folgen.

Nun lag allerdings der Gedanke auf der Hand, dass die hellen Colonien (Fig. d, e u. c), welche hier fehlten, die Colonien des Vibrio sein müssten, aber wenn man aus solchen Colonien Präparate anfertigte, dann zeigten sie nur Kurzstäbchen, und zweitens bemerkte ich, dass die Platten, mit Culturen beschickt, in denen der Vibrio getötet worden war, nach der Verflüssigung auch viele kleine, helle Colonien zeigten (Fig. g), die den hellen (Fig. d, e, c) sehr ähnlich waren. Darum liess ich den Gedanken fahren, dass die hellen Colonien den Vibrionen entsprechen könnten und untersuchte sie nicht weiter. Später (wie, werde ich nachher zeigen) stellte sich allerdings heraus, dass diese hellen Colonien allerdings zum Vibrio gehörten, aber zu dessen zweiter Wuchsform (b<sup>1</sup>).

Es ist kaum nötig zu betonen, dass ich mich bei diesen und nachfolgenden Versuchen stets davon überzeugte, dass in den Ausgangs-Culturen sowohl Stäbchen, wie Vibrionen vorhanden waren; es wurden Versuche gemacht mit Mischculturen aus der Stammcultur, und solchen die aus den Colonien verflüssigter und nicht verflüssigte Gelatinplatten gewonnen worden waren u. s. w.

Immer zeigte sich, dass die Vibrionen in Bouillon und auf Agar abstarben, auch wenn die Bouillon bei 22° gehalten wurde; die Temperatur 37° war ihnen besonders schädlich, aber in besonders geeigneten Nährböden konnten die Vibrionen die Brüt-

temperatur vertragen. Ein solcher war namentlich dünnflüssige Gelatinelösung (Fleischwasser-Gelatine 1 pCt.). So wurde es begreiflich, dass der Vibrio sich in den Eingeweiden bei 37° hatte halten können, der dünnflüssige Koth war auch bei 37° ein geeigneter Nährboden gewesen.

Es war das Stäbchen also zu isoliren, aber nicht der Vibrio. Das Stäbchen liess sich leicht weiter züchten auf allen gebräuchlichen Nährböden. Es peptonisiert Gelatine, ist sehr beweglich, wie Typhusbacillen, die Culturen zeigten immer einen unangenehmen fäcalen Geruch. Dabei war es ziemlich polymorph, bei 37° in Bouillon und Fleischwasser zeigten sich lange, dicke, gekrümmte Fäden; auf Agar und in Peptonwasser Kurzstäbchen und Kokkenformen, auf Glycerine-Kartoffel bildete sich ein gelber, glänzender Rasen, in diesem zeigten sich Kurzstäbchen und ganz runde Kokken, in verflüssigter Gelatine sind die Stäbchen (ohne Fadenbildung) wohl am längsten.

Dieser Polymorphismus und der fäcale Geruch geben dem Stäbchen eine Stelle unter den Fäulniss-Bakterien (Proteus von Hauser u. s. w.); er unterscheidet sich aber von diesen dadurch, dass er, statt der vielen Geisselfäden an beiden Längsseiten, nur einen Faden an jeder Schmalseite zeigt. Er coagulirt Milch.

Noch immer galt es: den Vibrio zu isoliren. Es konnte nur mit Hülfe der Gelatineplatten gelingen; aber ich fand ihn nicht in den Colonien, fand ihn auch nicht bei Stichen in die Zwischenräume zwischen den Colonien. Strich ich aber mit einer Platina-schlinge quer über eine ganze Platte, dann fanden sich einzelne Vibrionen im Präparat.

Es musste der Vibrio also hier und da in anderen Colonien leben, hatte ich doch zuweilen bei Abstich einer Colonie Misch-culturen erhalten. Es musste also Symbiose vorliegen, solche Colonien entwickelten sich also nicht aus einem Bakterium, wie man sonst annimmt. Vielleicht entwickelte sich der Vibrio nur dann, wenn er zufällig mit einem Stäbchen zusammentraf, darum zeigten denn auch die meisten abgestochenen Colonien nur Stäbchen und keine Vibrionen.

Ich wandte mich nun an Herrn Drs. S. L. Schouten mit der Bitte, durch sein neues mechanisches Verfahren den Vibrio isoliren zu wollen. Dieses Verfahren ist kurz folgendes:

In einer kleinen Glaskammer wird ein Tropfen Nährstoff (z. B. Gelatine) auf die untere Fläche des Deckgläschen gebracht, und von diesem entfernt bringt man einen Tropfen Cultur auf dieselbe Fläche des Deckgläschen. Nun legt man das Gläschen auf die Kammer; da sie feucht ist, bildet sich ein mikroskopischer, feiner Dampfniederschlag auf der beschickten Fläche des Deckgläschen, wodurch gleichsam eine kettenähnliche Verbindung zwischen den beiden Tropfen hergestellt wird. In die Kammer ragen zwei feine Häckchen hinein, deren Spitzen etwa  $5\text{ }\mu$  dick sind, und die durch Mikrometerschrauben hin- und herbewegt werden können. Unter der Oel-Immersion wird nun mit dem einen der Häckchen ein Bakterium aus dem Culturtropfen herausgezogen. Man ergreift genau das Bakterium, welches man zu isoliren wünscht, und bringt es in den nächsten mikroskopisch feinen Wassertropfen. Nun ergreift man es mit dem zweiten Häckchen, das mit der Cultur nicht in Berührung gewesen war, und führt es von Tröpfchen zu Tröpfchen bis zu dem grossen Nährstoff-Tropfen. Damit ist die Isolirung abgelaufen. Man kann nun weiter beobachten, wie das Bakterium sich theilt, eine ganz kleine, sich stets vergrössernde Colonie bildet.

Ich kann hier nicht weiter auf dieses bewundernswerthe Verfahren eingehen. Es arbeitet mit absoluter Sicherheit, man darf es ein Wunderwerk feinster Technik nennen.

In dieser Weise wurde nun der Vibrio von dem Kurzstäbchen getrennt, jeder Vibrio entwickelte sich zu einer Colonie, wobei diese schnell beweglichen Formen, auch noch nach drei Tagen in den Colonien schönste Kommaformen zeigten. Die Isolirung der Vibrionen wird dadurch erschwert, dass sie, wie Cholera-Vibrionen, durch das Gesichtsfeld schießen.

Ich lege Nachdruck darauf, dass in diesen Isolirkammern eine hohe Feuchtigkeit herrscht, sie sind mit Wasserdampf gesättigt; und gerade dort, wo die mikroskopisch feinen Wassertropfen auf dem Nährstofftropfen sich niederschlagen, entwickelt sich der Vibrio am liebsten. Er sucht also die Feuchtigkeit auf. Darauf komme ich zurück.

Es war also bewiesen, dass der Vibrio isolirt und danach sich in Gelatine weiter entwickeln könne.

Aus der Vibrio-Colonie wurden nun Impfungen in Fleischgelatine gemacht; es entwickelten sich äusserst feine, helle, durchscheinende Culturen (heller und durchscheinender als Cholera-Culturen), im Stich entwickeln sie sich längs des ganzen Stichcanals, sie verflüssigen die Gelatine nicht. Die Entwicklung war aber immer nur eine spärliche, magere; schnell folgte Austrocknung. Präparate aus diesen Gelatine-Culturen zeigten nur Kurzstäbchen, wenn die Gelatine hart und trocken war (Gelatine 15 pCt.), sie zeigten neben den Kurzstäbchen einige, zuweilen recht zweifelhafte Vibrionen, wenn die Gelatine weicher war (10 pCt.). Die Kammern Schouten's zeigten nach einigen Tagen Kurzstäbchen neben den Vibrionen, und zwar waren die Vibrionen in der Ueberzahl, wenn die Kammer feucht gehalten wurde, während die Stäbchen zunahmen, wenn die Kammern austrockneten.

Damit war bewiesen, dass dieser Vibrio ein vollkommener Proteus ist mit zwei Wuchsformen (b und b<sup>1</sup>), und so wurde es nun begreiflich, warum ich ihn früher nicht hatte isoliren können, da ich ihn stets in der Vibrio-Form gesucht hatte.

Impft man von den Gelatine-Culturen der Kammern auf sehr verdünnte Fleischgelatine (1 pCt.), dann sieht man sehr viele Vibrionen neben den Kurzstäbchen, impft man auf Peptonwasser (1 pCt.), dann sieht man fast nur Vibrionen<sup>1</sup>). Bringt man die Gelatine-Culturen, die nur Kurzstäbchen zeigten, auch auf flüssigen Nährboden, dann tritt die Vibrio-Form immer mehr hervor und die Kurzstäbchenform nimmt ab. In Fleischwasser ohne Pepton und Salz wächst der Vibrio zu langen, dicken, gekrümmten Stäben oder Fäden.

Dieser Vibrio-Proteus zeigt also nur auf flüssigem Nährboden oder auf sehr weicher Gelatine die Vibrio-Form. Bringt man in harte Gelatine-Culturen ein Bacterium, welches peptonisirendes Ferment bildet, dann tritt die Vibrio-Form sofort deutlich zu Tage. Sie ist in peptonisirter Gelatine immer am schönsten und reinsten. Bei längerem Verweilen in dem Brütofen sterben die Vibrionen ab, und zwar wohl nur, weil die Culturen darin zu schnell austrocknen, denn in dünnflüssigen und mageren Nährböden sterben

<sup>1</sup>) Auch in jeder Cholera-Cultur sieht man ja Stäbchen.

sie bei 37° nicht immer. Der Vibrio coagulirte Milch nicht, zeigte auch keine Cholera-Rothreaction, er zeigt einen oder zwei Geisselfäden.

Auf Gelatineplatten ausgesät, zeigte der Vibrio immer nur die Wuchsformen der Figuren d, e und c. Hatte man die Gelatine in den Petrischalen erst erstarren lassen und goss nun eine Vibrionen-Cultur auf die Gelatinefläche, dann zeigte sich die Figur h, es ist die Oberfläche der Gelatine dann besonders feucht. Gleiches erhält man, wenn man trockne Gelatineschalen in eine feuchte Kammer setzt, die Culturen bedecken dann schnell die ganze Platte. Mit Hülfe derselben Methode wurde nun auch das Stäbchen isolirt. Es zeigte nach der Isolirung einen auffallenden Unterschied von den Stäbchen, welche durch Brüttemperatur von dem Vibrio getrennt worden waren. Es verflüssigte die Gelatine nicht mehr. Auf Gelatine entwickelte sich ein dicker, weisser Belag mit buchtigen, runden Rändern. In den Stäbchen-Culturen zeigten sich niemals Vibrionen. Die Culturen haben immer den unangenehmen Geruch der Fäulnissbakterien, dieser war bei erster Isolirung aus den Faeces aber weit stärker, als später.

Anfangs konnte ich die Stäbchenform der Vibrionen (b<sup>1</sup>) nicht von den wahren Stäbchen der Fäulnissbakterien (a) unterscheiden; nur hatte ich bemerkt, dass in Carbolfuchsin das Fäulnissbakterium sich immer viel dunkler färbt, als die Vibrionen; nachdem beide isolirt worden waren, war es leicht, festzustellen, dass die Stäbchenform der Vibrionen (b) länger, schlanker und heller war, als das Fäulnissbakterium. Meist waren sie hierdurch leicht zu unterscheiden. In verflüssigter Gelatine wurde das Fäulnissbakterium aber gestreckter, und dann konnte oft nur die Vibrio-Form von den Fäulnissbakterien unterschieden werden. Am leichtesten war die Unterscheidung dort, wo das Fäulnissbakterium die sich ganz dunkel färbende Kokkenform zeigte, welche der hellere Vibrio nie annimmt.

Nach der Isolirung regte sich bei mir der Zweifel, ob wirklich bei meinen früheren Versuchen in einer Gelatine-Colonie beide Formen vorhanden gewesen seien. Wenn ich nehmlich die verschiedensten Colonien abstach, dann erhielt ich verflüssigende und nicht verflüssigende Culturen. Könnten letztere nun nicht allein aus Vibrionen in beiden Wuchsformen bestanden haben? (dadurch

würde sich das Gemisch von Vibrionen und Stäbchen erklären), erstere dagegen nur aus Stäbchen?

Den Einwand konnte ich aber beseitigen, denn ich hatte die nicht verflüssigten Gelatine-Culturen, welche deutlich Vibrionen zeigten, bei  $37^{\circ}$  schmelzen lassen, und dadurch mussten alle Vibrionen in beiden Wuchsformen abgetötet sein, das Glas hätte dann also steril sein müssen. Dem war aber nicht so, denn solche Gläser zeigten noch das Fäulnissbakterium, es war also in derselben Colonie mit dem Vibrio gewesen. Man könnte nun noch behaupten, es seien doch nur Vibrionen in dem Glase gewesen, sie seien aber durch die Brüttemperatur so verändert worden, dass sie hinförst nur noch die Stäbchen-Wuchsform zeigen könnten, die ich nun für das Fäulnissbakterium ansah<sup>1</sup>). Dem ist aber zu begegnen mit der Bemerkung, dass die Vibrionen bei  $37^{\circ}$  unter allen Erscheinungen der Plasmolyse thatsächlich absterben, und zweitens, dass nach der Isolirung auf mechanischem Wege (durch Herrn Schouten) sich herausstellte, dass das isolirte Stäbchen eine ganz andere Wuchsweise auf Gelatine zeigt, als der Vibrio, wodurch die früher durch Brüttemperatur erlangten Isolirungen des Stäbchens nun controlirt werden konnten. Streicht man die ursprüngliche Mischcultur auf Gelatine aus, dann überwiegt meist das Stäbchen derart, dass man nur dessen Wuchsform (den dicken weissen Belag) auf Gelatine sieht.

Nachdem ich in dieser Weise bewiesen habe, dass tatsächlich beide Bakterien sich in einer kleinsten Colonie finden lassen, wird man mir vielleicht glauben, wenn ich jetzt die Anfangs gemachte Aufzeichnung anführe, nach welcher eine Gelatineplatte der ursprünglichen Faeces-Cultur, nur die Colonien Fig. a und b zeigte, erst später, nachdem die Cultur lange Zeit fortgezüchtet worden war, traten auch die Colonien Fig. d, e, c in Gelatineschalen hervor, sodass man schliessen muss, dass Anfangs der Vibrio sich nur zusammen mit dem Stäbchen entwickeln konnte, stets also mit ihm zu einer Colonie vereinigt war, und später erst an grössere Selbständigkeit sich gewöhnte.

<sup>1</sup>) In einer anderen Arbeit habe ich gezeigt, dass polymorphe Bakterien constante Formen annehmen können (Panmorphismus und erbliche Variationen. Centralbl. f. Bakt. u. s. w. 28. Bd. 1900. S. 833).

Später angelegte Platten aus dem Gemisch zeigten fast immer beide Colonie-Arten gesondert, die Ausnahmen folgen unten.

Die Colonien der Fig. g, welche mich Anfangs so verwirrten, zeigten sich, wie gesagt, nur in halb verflüssigter Gelatine, sie zeigen einfach, dass die beweglichen Stäbchen in halb flüssigem Milieu nicht zu runden Colonien sich zusammenschliessen können. Nach einigen Controlversuchen mit anderen Bakterien scheint mir der Schluss erlaubt, dass der grobkörnige Charakter (Glasstückchen) einer Colonie von der Schnelligkeit abhängig ist, mit der die Bakterien sich bewegen können, weiter von dem Feuchtigkeitsgehalt der Gelatine und der Schnelligkeit der Peptonisirung der Gelatine. Es erfordert diese Bemerkung aber noch eine strengere Controle, als ich bisher übte.

Ich habe die beiden Bakterien nun einzeln weiter studirt.

Zunächst wünschte ich zu wissen, warum die Symbiose stets peptonisirende Fermente bildete, während die Bakterien nach der Trennung, einzeln oder zusammengebracht, die Gelatine nicht mehr verflüssigen konnten.

Ich habe sie in verschiedenster Weise gemischt, Tage lang in flüssigen Nährböden verschiedenster Art wieder zusammenwachsen lassen, aber die Gelatine verflüssigten sie nicht wieder. Ich strich auch den Vibrio auf Gelatine aus und liess ihn später mit einem Strich des Stäbchens zusammenwachsen, oder machte es umgekehrt, kurzum, versuchte in jeder Weise, aber die Verflüssigung erlangte ich nicht wieder.

Die Stäbchen aber, welche nicht auf mechanischem Wege, sondern durch Brüttemperatur von den Vibrionen getrennt worden waren, verflüssigten die Gelatine stets. Es war das Stäbchen also der Ferment-Bildner, der diese Eigenschaft bei der einen Art der Isolirung verlor, bei der anderen nicht. Ich versuchte nun, ob dem Stäbchen auch in anderer Weise die Ferment-Bildung genommen werden könnte, und da Liborius<sup>1)</sup> beobachtete, dass Traubenzucker die Bildung des proteolytischen Ferments bei einigen Bakterien aufheben könne, so brachte ich das durch Brüttemperatur isolirte Stäbchen in Gelatine-Glucose. Durch diesen Nährboden verlor das Stäbchen bleibend die Eigenschaft,

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Hygiene, Th. 1, S. 156.

Gelatine zu verflüssigen, sie kehrte auch auf geeigneten Nährböden nicht zurück. Ebenso verlor eine geringe Culturmenge, auf neutrale Gelatine gebracht, die Bildung des peptonisirenden Ferments, und so erklärt sich, dass ich auch aus den Gelatineschalen einmal verflüssigte und dann wieder nicht verflüssigte Culturen erhielt; die benutzte Gelatine war öfter kaum alkalisch gewesen. Ein Geringes genügt also, um dem Stäbchen das proteolytische Ferment zu rauben. Das wissen wir allerdings von manchen polymorphen Fäulnissbakterien, auch vom *Bacillus fluorescens* Jäger's<sup>1)</sup>), aber bei diesen ist der Grund des Schwankens der Gelatine-Verflüssigung kaum zu ergründen, denn von vielen Gläsern, die mit gleichzeitig zubereiteten Nährstoffen beschickt sind, verflüssigt bei diesen häufig die eine Hälfte, die andere aber nicht. Das geschieht aber nie bei meinen Stäbchen, aus einer verflüssigten Cultur übergeimpft, oder von einer Agar-cultur erhält man stets in allen Gläsern Verflüssigung, oder in allen Gläsern nicht, wenn die Gelatine neutral war; Ausnahmen kommen nur vor bei den geringen Mengen, die man aus Gelatineplatten-Culturen überimpft, wenn die Gelatineplatte schon mit weniger geeigneter Gelatine beschickt worden war. Der schädigende Einfluss der mechanischen Isolirung Schouten's erklärte sich durch den Einfluss des Deckgläschens auf den Nährstofftropfen, der erst alkalisch wurde, während er auf dem Gläschen neutral war.

Oben wurde bereits hervorgehoben, dass die Stäbchen kräftiger functioniren, wenn sie mit dem *Vibrio* vereinigt sind. Das zeigte sich auch in der Gelatine-Glucose; denn wenn man beide zusammen in die hiermit beschickten Gläser brachte, dann verloren die Stäbchen nicht nur nicht die Eigenschaft, Fleischgelatine zu verflüssigen, sondern sie verflüssigten sogar die Gelatine-Glucose.

Es ist der *Vibrio* „isolirt“ von geringer Lebenskraft: Culturen auf Gelatine trocknen schnell aus, die Vibrionen verlieren ihre Beweglichkeit und sterben ab. In flüssigen Nährböden halten sie sich aber gut, auch auf feucht gehaltener Gelatine; wenn man diese in eine mit Feuchtigkeit gesättigte Kammer stellt, dann breitet die Cultur sich schnell aus. Der *Vibrio* hat also ein

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Hygiene, 1892, Bd. 12, H. 4.

grosses Bedürfniss nach Feuchtigkeit. Auf recht feuchtem Agar kann er sich darum noch 24 Stunden bei  $37^{\circ}$  halten, wenn auch die meisten, wie in Bouillon, Plasmolyse zeigen; steht der Agar länger im Brütofen, dann stirbt der Vibrio vollständig ab, wie oben erwähnt. In Gegenwart des Stäbchens kann der Vibrio auch auf trockenem Nährboden die Vibrio-Form zeigen und sich in dessen Colonierhalten, aber nicht bei  $37^{\circ}$ . Auf schräg gestellter Gelatine entwickelt sich ein Strich erst oberflächlich, trocknet die Gelatine aus, dann dringt er in die tieferen Lagen der Gelatine ein, während die oberflächliche Cultur abstirbt.

So ist es erklärlich, dass, wenn man nun mit der Oese über die Fläche der Gelatine hinfährt, um neue Culturen zu machen, nichts sich entwickelt, kratzt man aber in die Gelatine hinein, dann erhält man sofort die entwicklungsfähigen Vibrionen.

Dieses Bedürfniss des Vibrio nach Feuchtigkeit ist meiner Meinung nach auch der Grund der Symbiose; das Stäbchen wächst in dicker feuchter Schicht, und darum kann der Vibrio sich in Gesellschaft des Stäbchens besser entwickeln. Nun erklärt sich auch der grau-weiße Schleier auf den Agarplatten; ich pflege nehmlich die Culturlösungen auf den bereits erstarrten Agar auszugiessen und dann abfliessen zu lassen. Dadurch ist die Oberfläche feucht, und es entwickeln sich nur dort die Vibrionen, bis sie absterben, etwa wie in Fig. h, aber noch durchsichtiger, weil die Vibrionen, sobald die Flüssigkeit der Oberfläche verdampfte, auf Agar und bei  $37^{\circ}$  aufgelöst werden. Darum wachsen die Colonien der Vibrionen auch den Stäbchen zu und wachsen in die Colonien der letzteren hinein, das Stäbchen hingegen wächst nie dem Vibrio zu, ausser in verflüssigter Gelatine, aus mir unbekannten Gründen.

Obiges werden die nachfolgenden Studien an Gelatineplatten, (in Petrischalen) näher beleuchtet.

Mischt man Vibrionen mit Stäbchen zu einer Platte, dann findet man häufig ausser den Figuren a und b nur die tiefe Form der Vibrio-Colonie (Fig. c), ich nehme an, dass die Oberfläche der Gelatine dem Vibrio zur Entwicklung zu trocken war.

Hat man den Vibrio mit dem Stäbchen ausgesät, (in die Gelatine, nicht oberflächlich aufgegossen), dann zeigen sich zwar öfter wohl die oberflächlichen Colonien des Vibrio (Fig. d), aber

diese verschwinden später wieder, es bleiben nur die tiefen Colonien erhalten, da sie in der Tiefe der Gelatine vor dem Aus trocknen gesichert waren, und weiter noch diejenigen oberflächlichen Colonien, welche sich mit denen des Stäbchens vereinigt hatten (Fig. i).

Lässt man eine gemischte Platte<sup>1)</sup> einige Tage stehen, dann vereinigen sich die oberflächlichen Colonien des Vibrio so viel wie möglich mit denen des Stäbchens, und es entstehen dann Figuren, wie  $k$ ,  $k^1$ ,  $k^2$ ,  $k^3$ . Es zeigen diese wohl genügend, dass hier meistens nicht ein Zusammenwachsen zweier benachbarter Colonien vorliegt, was nur für  $i$  und  $k^3$  gelten könnte, sondern es wandern die Bakterien über die Gelatineplatte, sterben ab, wenn sie keine Stäbchen-Colonie erreichen; gelingt ihnen dies aber so bilden sie einen äusseren Ring um — oder eine äussere Anlagerung an die Stäbchen-Colonie; durch weiteres Wachsthum derselben entstehen nun die merkwürdigen Figuren, die auch einem Hineinwachsen der Vibrionen in die Stäbchen-Colonie zu verdanken sind.

Es senden die hellen Colonien der Vibrionen Schwärmer aus zu den Stäbchen-Colonien (Fig. l). Warum beobachtet man nun aber nicht einen Strich Cultur von der Colonie des Vibrio bis zu der des Stäbchens, ein ununterbrochenes Umsichgreifen, wie in Fig. h, statt der von einander getrennten kleinsten Colonien? Ich vermuthe, dass die beweglichsten Vibrionen einer Colonie über die Platte wandern und dort eine Colonie bilden, wo sie durch irgend ein Hinderniss festgehalten werden, oder auch, dass von den vielen wandernden Vibrionen nur diejenigen zur Entwicklung gelangen, welche ein feuchteres Plätzchen auf der Gelatine trafen. Es wandern die Vibrionen nach allen Seiten (Fig. l), aber zahlreich sind die kleinen Colonien nur in der Richtung einer Stäbchen-Colonie. In verflüssigenden Gelatineplatten wandern auch die Stäbchen, welche ja zunächst verflüssigend wirken, sie bilden dann die Colonien der Fig. g, oder zuweilen strahlen sie auch pinselartig in der Richtung der Vibrionen-Colonien aus (Fig. m), wobei die Vibrionen ihnen zuweilen auch Ausläufer entgegensenden.

Zuweilen ereignete es sich, dass die Platten nur isolirte

<sup>1)</sup> In den Figuren der Tafel X bezeichnet v den Vibrio, st das Stäbchen.

Stäbchen-Colonien zeigten und keine gesonderten Vibrionen-Colonien, doch hatten die Vibrionen sich wohl entwickelt, sie lagen aber in der Mitte einiger Stäbchen-Colonien (Fig. n und n<sup>1</sup>). Ich vermuthe, dass in solchen Fällen die verwendete Gelatine vielleicht sehr trocken war, und dass darum sich der Vibrio nur dort entwickeln konnte, wo er zufälliger Weise mit einem Stäbchen zusammentraf.

Solche Colonien zeigen deutlich, mit welchen fast unüberwindlichen Schwierigkeiten man bei der Trennung zweier an Symbiose gewöhnten Bakterien zu kämpfen hat. Ist man einmal auf solche Colonien aufmerksam geworden, dann hilft natürlich ein Klatschpräparat, um den Sachverhalt festzustellen; denkt man daran nicht, dann wird man solche Colonien als helle mit dunklem Rande beschreiben, vielleicht abstechen und nun eine Mischcultur erhalten. Ich verweise übrigens auf das oben über die Colonie Fig. f Mitgetheilte, in der sich zuweilen auch beide Bakterien fanden. Solche Thatsachen lehren, dass das Zählen der Colonien nicht mit einem Zählen der Keime in der ausgesäten Flüssigkeit identifiziert werden darf; die Zahl der Colonien wird meist wohl weit geringer sein, als die Zahl der Keime.

Wenn man mit einer Schlinge Striche mit der Mischung beider Bakterien auf eine Gelatineplatte macht, dann entstehen Mosaik-artige Figuren, wie Fig. o.

In trockenen Gelatineplatten, auf denen sich keine oberflächlichen Colonien des Vibrio entwickeln konnten, zeigten die Tiefen oft sternförmige Figuren, wohl wegen des Eindringens der Vibrionen in die Gelatine, wodurch jede feuchtere Stelle ausgenutzt wurde und Strahlen zwischen den braunen Stäbchen-Colonien gebildet wurden. Die Strahlen bestehen aus feinen Punkten, wohl kleinsten Colonien (Fig. p).

Das Ausschwärmen einer Vibrionen-Colonie zeigt auch Fig. q; jeder Schwärmer entwickelt sich zu einer vollen Colonie, das Schwärmen steht nicht unter dem directen Einfluss des Stäbchens; trifft einer der Schwärmer aber eine Stäbchen-Colonie, dann gelangt er zu breiter Entfaltung, wie in Fig. q, und wandert dann nicht weiter; solche Colonien zeigen keine Veränderungen mehr.

Beschreibt man nun einen Kreis auf die Rückseite einer Gelatineplatte, und macht an der Innenseite eine Anzahl Striche

aus einer Vibrionen-Cultur, und um den Kreis Punkte mit dem Stäbchen, dann sieht man, dass die Schwärmer der Vibrionen-Culturen sich alle dorthin richten, wo die Stäbchen-Colonien der Peripherie des Kreises am nächsten liegen (Fig. r).<sup>1)</sup>

Oder man macht neben einem Vibrio-Strich einen Stäbchenstrich, dann entwickeln sich zwar Anfangs SchwärmeColonien an beiden Seiten des Vibrio-Striches, aber nur an dem dem Stäbchen zugekehrten Rande schreitet die Entwicklung weiter fort, nicht in gleichmässigen Bahnen, denn man sieht eine Häufung kleiner Vibrionen-Colonien neben dem Rande des Stäbchens entstehen oder sich mit diesem vereinigen. Der Zwischenraum wird so zu sagen übersprungen. Bringt man solche mit Strichen versehene Platten in eine feuchte Kammer, dann wachsen beide Bakterien sehr schnell und breiten sich aus (ähnlich Fig. h). Dabei zeigt das Stäbchen ein symmetrisches Wachsthum, der Strich des Vibrio hingegen entwickelt sich hauptsächlich einseitig in der Richtung des Stäbchens.

Obgleich in der Literatur sich manche Beobachtungen darüber finden, dass die Entwicklung eines Bakterium durch ein anderes gefördert werden kann, so fand ich doch keine Mittheilungen über Symbiose, wie sie hier vorliegen. In den meisten Lehrbüchern wird das Wort Symbiose bei Bakterien nicht erwähnt.

Ich vermuthe, dass diese aber nicht so selten ist, sondern einfach nicht beachtet wurde, schon darum, weil man in der Bakteriologie nur mit Reinculturen arbeiten will. Bei solchen Studien ist das mechanische Versfahren der Bakterien-Isolirung fast unentbehrlich. Auch möchte ich dem Gedanken Ausdruck geben, dass vielleicht manche Krankheiten, deren Erreger bisher nicht entdeckt wurden, durch Symbiose zweier Bakterien hervorgerufen werden könnten. Es würde sich vielleicht lohnen, in dieser Richtung zu forschen.

<sup>1)</sup> Die Fig. r ist verzeichnet; der Zeichner hat die oberen, entfernten Colonien viel zu nahe an den Kreis gezeichnet; der Figur nach müssten also auch diese die Vibrionen anziehen, was thatsächlich nicht geschah, da sie von allen Vibrionen-Colonien weiter entfernt waren, als die unteren.