

## **Ueber Spaltungsprodukte der Bacterien.**

Von

**Prof. Dr. L. Brieger.**

Assistent der I. medicinischen Uuiversitäts-Klinik zu Berlin.

---

Aus dem Laboratorium der medic. Klinik des Herrn Wirkl. Geh. Ober-Medicinalraths  
Prof. Dr. von Frerichs.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. Juli 1884.)

### **Zweite Mittheilung.**

In meiner letzten Mittheilung hatte ich mich nicht näher über die Methode ausgelassen, deren ich mich zur Gewinnung von bacteritischen Reinkulturen aus menschlichen Fäeces bediente. Obwohl die bekannten Koch'schen Untersuchungsmethoden Jedem, der sich mit diesem Gegenstande beschäftigt, ohne Weiteres den Wegweiser zur Reinzüchtung von Bacterien abgeben, so sehe ich mich doch, um Missverständnissen zu begegnen, veranlasst, den von mir eingeschlagenen Weg zur Isolirung der in den menschlichen Excrementen enthaltenen Bacterien hier genauer zu schildern. Zu meinen Versuchen wählte ich nicht die zu allererst austretenden Kothballen, um nicht etwa von aussen in den After eingedrungenen Bacterien zu züchten, sondern die erst gegen Ende der Defæcation entleerten festen Seybala. Dieselben wurden mit einem ausgeglühten Messer durchgeschnitten und mitten in diese Bruchstellen durch drehende Bewegung eine geglühte Platinnadel möglichst tief hineingewühlt. Die an dieser Nadel haften bleibenden Kothpartikelchen wurden in einem bei 200° C. sterilisirten mit einem Wattepfropf verschlossenen Kolben von  $\frac{1}{2}$  Liter Inhalt, der mit durch längere Zeit ausgekochtem Brunnenwasser fast gefüllt war, abgespült, und durch Schütteln in dem Wasser möglichst

fein vertheilt. Alsdann wurden sofort 20—30 ccm. dieser infizirten Wassermasse in eine flache Schale gegossen, auf deren Boden ca. 200—300 ccm. durch kurzes Erwärmen flüssig gemachte Koch'sche Fleischwasserpeptongelatine sich befanden und durch vorsichtiges Umschwenken eine möglichst gleichmässige Mischung von Gelatine und Wasser bewerkstelligt. Die mit Nährflüssigkeit versehene Schale war durch eine andere umgekehrt darüber gestülpte grössere Schale allseitig abgeschlossen und um vor jedem Eindringen von in der Luft befindlichen Bacterien absolut sicher zu sein, unter eine gläserne Butterglocke, wie sich deren Koch auch zu seinen Versuchen bedient, gebracht.

Selbstverständlich kamen nur sorgfältig sterilisirte Apparate und Nährlösungen zur Verwendung. Die nunmehr in obiger Weise präparirten und beschickten Gefässe wurden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es entwickelten sich nun auf der mittlerweile wieder erstarrten Gelatine einzelne Keime, die leicht isolirt herausgehoben werden konnten. Durch wiederholte Uebertragung derartiger isolirter Keime in nach obiger Weise präparirten Schalen gelang es stets immer und immer wieder die gewünschte Species von Bacterien rein zu züchten. Mittelst dieser Methode ist es mir nun gelungen, aus den Fæces verschiedene Bacterienarten zu isoliren, welche ganz specifische chemische Wirkungen entfalten.

In meiner letzten Mittheilung habe ich Bacterienarten beschrieben, welche Kohlehydrate stets in der gleichen Richtung zerlegen. Zunächst hatte ich einen Coccus geschildert, der sowohl aus Trauben-, als auch aus Rohrzuckerlösung stets Aethylalkohol abspaltet. Dieser Coccus ist aber nicht, wie man etwa glauben könnte, hinsichtlich seines Nährmediums nur auf Kohlehydrate angewiesen. Er gedeiht auch auf Eiweissstoffen, wie gekochtem Hühnereiweiss, Serum-eiweiss, Fibrin, doch ist dieser Coccus nicht im Stande, diese Eiweissarten, selbst nach monatelangen Wachsthum, weder bei Bruttemperatur noch bei Stubenwärme zu verflüssigen oder eine irgendwie nachweisbare chemische Alteration der eiweisshaltigen Nährsubstrate hervorzurufen. Auch der von

mir geschilderte Bacillus, welcher in eigenthümlich typischer Anordnung in unregelmässig concentrisch gruppirtter Ringform auf Koch'scher Fleischwasserpeptongelatine wächst und, Meerschweinchen injicirt, die Thiere in kürzester Zeit ausnahmslos tödtet, vermag nicht aus den complexen Eiweissstoffen einfach zusammengesetzte Körper abzuspalten, obwohl sich Eiweiss für diesen Bacillus als ein sehr gutes Nährmedium erweist. Eigenthümlich ist es, dass Kulturen dieses auf Koch'scher Nährgelatine gezüchteten Bacillus nach längerem Stehen in ihren centralen Partien eine gelb-weiße Beschaffenheit annehmen, die von Incrustationen mit Salzen herrührt und die die eigenthümliche concentrische Gruppierung des Bacillus noch sehr wohl erkennen lässt. Dieser Bacillus übt stets, gleichgültig ob er bei höheren (40 C°.) oder niederen (10° C.) Temperaturen, ob er auf Kohlehydraten oder Eiweissstoffen cultivirt wird, Meerschweinchen injicirt, eine deletäre Wirkung aus, während, wie schon früher angegeben, Mäuse und Kaninchen meistens refraktär dagegen sind. Die aus sterilisirten Traubenzuckerlösungen bei Temperaturen von 36—38° C. durch diesen Bacillus abgespaltenen Säuren sind, wie ich schon in meiner ersten Mittheilung nachgewiesen habe, vorzugsweise Propionsäure. Ich habe jetzt noch wiederholt Traubenzuckerlösungen mit diesem Bacillus beschickt, um mir noch grössere Mengen dieser Säuren zu verschaffen und aus den leicht zu reinigenden Silbersalzen die Natur dieser Säuren endgültig festzustellen. Eine grössere Menge derartiger Säuren aus mehreren Kulturen gesammelt, gab, mit Silberoxyd gekocht, nach wiederholtem Umkrystallisiren ein in feinen glänzenden Büscheln krystallisirendes Silbersalz von 60,44 % Ag. Propionsaures Silber verlangt 59,67 % Ag. Der genannte Bacillus bildet somit aus Traubenzuckerlösung vorzugsweise Propionsäure, der minimale Mengen Essigsäure beigemischt sind.

Andere Bacterienarten, welche ich noch aus menschlichen Fäces isolirt habe, sind vorläufig noch nicht in genügender Weise auf ihre chemische Energie von mir geprüft worden. Mir schien es gegenwärtig viel wichtiger, die che-

mische Wirksamkeit von pathogenen Bacterien weiter zu erforschen. Wie ich in meiner ersten Mittheilung nachwies, gedeiht der von Friedländer als Erreger der croupösen Pneumonie angesprochene Coccus ganz vorzüglich auf Trauben- und Rohrzuckerlösungen, die mit frisch gefälltem Kalk versetzt sind, und denen, wie ich hier noch bemerken will, geringe Mengen stickstoffhaltiger Substanzen (Fibrin) und Nährsalze (Chlornatrium, phosphorsaures Kali, schwefelsaures Magnesium) selbstverständlich beigelegt werden müssen.

Am zweckentsprechendsten erwiesen sich mir 5 proc. Traubenzuckerlösungen, die auf  $\frac{1}{2}$  Liter Flüssigkeit 3 bis 4 ccm. nach Koch'scher Vorschrift angefertigte Fleischwasserpeptongelatine gelöst enthalten. Mit  $\frac{3}{4}$  Liter derartig zubereiteter Mischung wurden sechs bei  $150^{\circ}$  sterilisirte Kolben gefüllt, vier Tage lang je  $\frac{1}{2}$  Stunde lang gekocht und dann beim Erkalten eine Suspension von kohlen saurem Kalk, die vorher ca. eine Stunde lang über freiem Feuer in einem sterilisirten Gefässe gekocht hatte, heiss hinzugegossen. Erst nach völligem Erkalten dieses Gemisches wurde mittelst geglühter Platinnadel eine minimale Menge von Pneumonie-Coccen, die einer möglichst frischen Kultur entnommen worden waren, hineingebracht. Diese Kulturen, im Brutofen bei  $36-38^{\circ}$  C. stehen gelassen, trübten sich bald, ohne dass aber wieder die früher geschilderten Erscheinungen der Dunkel färbung mit der rapiden Gasentwicklung zur Beobachtung kamen. Es entstiegen innerhalb acht Stunden schon langsam Gasblasen aus dem auf dem Boden des Kolbens sich befindlichen kohlen sauren Kalkes. Nach zwölfstündigem Stehen wurde die Gasentwicklung reichlicher, und die Kulturen verfärbten sich mehr und mehr schmutzig-gelb und wurden dabei völlig undurchsichtig. Diese Gasentwicklung dauerte bei zwei Kolben, welche während zwei Monate im Brutofen bei  $36-38^{\circ}$  C. gehalten wurden, unterbrochen an, ohne dass aber eine Aenderung in dem schmutzig-gelben Aussehen der Kultur je zu constatiren war. Nur der am Grunde des Gefässes gelagerte kohlen saure Kalk nahm allmählich ab. Bei Temperaturen über  $40^{\circ}$  C. hörte die Gasentwicklung bald

auf, um aber bei niederen Temperaturen bald wieder aufzutreten. Injektionen, die mit diesen Kulturen zu verschiedenen Zwecken, selbst nach zwei Monate langem Stehen in die Brust von Meerschweinchen oder Mäusen gebracht wurden, erzeugten bei allen Mäusen Pleuritiden, verbunden hie und da mit lobulärer Pneumonie, nie aber mit lobärer Pneumonie. Die Meerschweinchen zeigten sich viel resistenter, indem nur eine sehr geringe Zahl nach der Injektion an Pleuritis zu Grunde ging. Die in den Exsudaten von Meerschweinchen und Mäusen gefundenen Coccen und kleinsten Stäbchen präsentirten sich stets in ihrer charakteristischen Kapsel. Wurden nun die mit Pneumoniococcen infizirten Traubenzuckerkulturen mit verdünnter Schwefelsäure destillirt, so gingen in die Vorlage hauptsächlich Essigsäure neben Ameisensäure (cf. diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 310) und Aethylalkohol über. Dass in der That vorzugsweise Essigsäure vorhanden war, bewiesen die aus dem Destillate dargestellten Silbersalze, wie aus folgenden Belegen ersichtlich wird.

- a) Die vereinigten Destillate zweier Kulturen, welche sieben Tage lang im Brutofen standen, gaben beim Kochen mit  $\text{Ag}_2\text{O}$  nach wiederholtem Eindampfen und Abfiltriren ein in langen Nadeln krystallisirendes Silbersalz mit 64,89% Ag.
- b) Aus dem Destillate einer Kultur, die zwei Monate lang im Brutofen bei 36—38° C. gehalten worden war, gewann ich ein in wohl ausgebildeten Nadeln krystallisirendes Silbersalz von 63,66% Ag.

Es handelt sich somit um die Silbersalze der Essigsäure, welche 64,67% Ag erforderte.

Bei einem 14-tägigen Versuche, im Brutofen auf sterilisirtem milchsaurem Kalk (500 cbcm. einer 5-proc. Lösung mit 3 cbcm. Koch'scher Fleischwasserpeptongelatine) Pneumoniococcen, welche in dieser Nährlösung sich sehr gut entwickelten, zu züchten, ergab sich nach dem Destilliren mit verdünnter Schwefelsäure ein warzenförmig krystallisirendes Silbersalz von 63,20% Ag.

Diese Energie, Essigsäure abzuspalten, hält auch der Pneumoniococcus bei, wenn er auf Kreatinlösung gebracht

wird, indem er aus derselben zwar langsam aber stetig nur Essigsäure, allerdings nur in geringen Quantitäten, abspaltet. Dieser Coccus vermehrt sich auch auf Pepton- und Eiweiss-substanzen, ohne aber nachweisbare chemische Produkte zu liefern.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass dem Friedländer'schen Pneumonicoccus nur eine ganz geringe chemische Umsetzungskraft innewohnt, und kann somit dieses Moment für seine Wirksamkeit im thierischen Organismus nicht weiter in Frage kommen. Es müssen hier noch andere Faktoren in Betracht gezogen werden, welche die Fähigkeit dieses Coccus, Entzündungen zu erregen, erklären. Neben der rein mechanischen Wirkung dieses Coccus kann hierfür noch die chemische Zusammensetzung desselben eventuell verantwortlich gemacht werden. Behufs Aufklärung dieses letzteren Punktes wurden Kulturen der Pneumonie im Grossen angelegt. Zu diesem Zwecke wurden grosse, flache Schalen mit Nährgelatine ausgegossen und durch Platinnadeln, welche mit diesem Coccus armirt werden, lange Impfstriche auf der Oberfläche dieser Gelatine, sobald dieselbe erstarrt war, gezogen. Selbstverständlich waren alle Massregeln zur gründlichen Sterilisation, sowie zur Verhütung von äusseren Eindringlingen getroffen worden. Längs der Impfstriche wuchsen nun bald die Pneumonicocci in Form weisser Streifen, die allmählich sowohl in die Breite als auch in die Höhe strebten, und nach 4-wöchentlichem Wachsthum die Form von Pflanzenbeeten angenommen hatten, welche nun durch stumpfe Spatel von ihrem Untergrunde ohne jede Beimengung des Nährmediums leicht abgehoben werden konnten. Während des Wachsthums dieser Massenkulturen war eine eigenthümliche Veränderung in den Kulturen selbst zu constatiren, insofern die im Centrum der Kultur befindlichen Bacterienhaufen eine schwach gelbliche Färbung zeigten, welche sich sichtlich von den transparenten peripherwärts gelegenen Bacterienhaufen unterschieden. Je älter die Kultur, desto breiter und compakter wurden die centralen Particen, die beim Abheben der Kultur als zusammenhängende mit Salzen imprägnirte

Krusten sich erwiesen. Da zur chemischen Untersuchung eine grosse Menge von Coccen erforderlich waren, so kamen, wie bereits gesagt, nur vier Wochen alte Kulturen zur Verarbeitung, jedoch unmittelbar nach dem Einsammeln.

Die Kulturen reagirten sowohl in ihren peripheren als centralen Theilen jederzeit alkalisch. Ueber die chemische Zusammensetzung derselben gibt folgende Uebersicht Aufschluss:

Wassergehalt . . . . .	84,20%
Trockensubstanz . . . . .	15,80 «
Fettgehalt der trockenen Substanz . . . . .	1,74 «
Aschegehalt der entfetteten und bei 110° getrockneten Substanz . . . . .	a) 30,02 « b) 30,25 «
Stickstoffgehalt der entfetteten Substanz, wasserfrei und aschefrei berechnet . . . . .	a) 9,50 « b) 10,0 «

Die Aschenbestandtheile setzten sich zusammen aus phosphorsaurem Calcium, phosphorsaurem Magnesium, schwefelsaurem Natron und Chlornatrium.

Die organische Grundsubstanz des Pneumoniococcus löst sich in Wasser nur unvollkommen, und kann nach dem Nencki'schen Verfahren als Mykoprotein nicht gefällt werden, unterscheidet sich davon auch schon durch den geringeren N-Gehalt. Die in Wasser unvollkommen gelöste Substanz wird beim Kochen völlig daraus niedergeschlagen, löst sich aber beim Ansäuern mit verdünnter Salpetersäure in der Wärme wieder auf. Ferrocyanium und Essigsäure, Salpetersäure, Salzsäure und Chlornatrium, Gerbsäure bewirken Niederschläge der theilweise gelösten Substanz. Mit Kupfersulfat und Natronlauge gibt dieselbe in der Kälte schon die charakteristische Eiureaktion. Glycogen konnte nicht nachgewiesen werden. In der chemischen Zusammensetzung der Pneumoniococcen findet sich also Nichts, was ihren böartigen Charakter erklären könnte; auch der Versuch mittelst der von anderwärts angegebenen Methoden zur Darstellung von Ptomainen aus den Reinkulturen dergleichen Substanzen zu isoliren, verlief resultatlos.