

Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal.

(II. Mittheilung).

Von

George H. F. Nuttall und H. Thierfelder.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 19. März 1896.)

Am Schlusse unserer ersten Mittheilung¹⁾ sprachen wir die Absicht aus, zu untersuchen, 1. ob auch die Verdauung vegetabilischer Nahrung ohne Mithilfe von Bakterien im Verdauungskanal vor sich gehe und 2. ob der Harn bakterienfreier Thiere aromatische Substanzen enthalte oder nicht. Im Folgenden soll über die inzwischen in diesen Richtungen angestellten Experimente berichtet werden.

Nahrung und technische Veränderungen.

Die Wahl des vegetabilischen Futters, welches neben Milch gegeben werden sollte, machte einige Schwierigkeiten. Mohrrüben, Wurzeln und andere von den Meerschweinchen gern gefressene Grünwaaren mussten ausgeschlossen werden, da sie sich nur durch langes Kochen sterilisiren lassen, im gekochtem Zustande aber natürlich nicht zu benutzen sind. Wir entschieden uns schliesslich für die englischen Biscuits, sogenannte Cakes (Marke Albert von Gebr. Thiele in Berlin), nachdem wir uns überzeugt hatten, dass junge Meer-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 21, S. 109.

schweinechen in Ermangelung von grünem Futter auch solche Kakes fressen, allerdings, wie es schien, mehr der Noth gehorchend, als aus Neigung. Cakes enthalten ungefähr 7% Stickstoffsubstanz, 9% Fett, 17% Zucker, 58% sonstige stickstofffreie Stoffe und 0,2% Cellulose (König).

Die Biscuits wurden zu 10 in eine kleine mit luftdicht-schliessendem Deckel versehene Blechbüchse von 9 cm. Höhe und 6 cm. Durchmesser übereinandergeschichtet, die Büchse in Papier eingewickelt und genau 1 Stunde in einem Victor Meyer'schen Trockenapparat bei 150° sterilisirt. Es war vorher festgestellt, dass eine einstündige Einwirkung von 150° gerade hinreicht, um die Kakes zwar leicht zu bräunen, den Geschmack aber noch nicht verändert.

Die Wattebüsche wickelten wir nicht wie bisher in Seidenpapier ein, sondern brachten sie ebenfalls in Blechbüchsen von derselben Form und Grösse, wie die beschriebene, aber zum Zweck der bequemeren Entnahme des Inhalts oben und unten mit luftdicht schliessenden Deckeln versehen. In jeder Büchse liessen sich fünfundzwanzig Wattebüsche unterbringen, so dass für einen Versuch zwei solcher Büchsen genügten. Die Sterilisation geschah ebenfalls durch einstündiges Erhitzen auf 150°. Diese 3 Büchsen wurden unmittelbar nach Entfernung der Papierhüllen mit sterilisirter Hand in den Gummisack (21)¹⁾ eingeschoben. Sie liessen sich sehr bequem von aussen durch den dünnen Gummi hindurch öffnen, eines beliebigen Theils ihres Inhalts entledigen und wieder schliessen. Watte und Kakes blieben auf diese Weise während der Sterilisation und während des ganzen Versuchs vollständig trocken; es wurde zur Zeit immer nur so viel herausgenommen, als für die nächsten Stunden nöthig war.

Um bei der Sterilisation des vollständig zusammengesetzten Apparates im Dampftopf die Gewissheit zu haben, dass der Dampf auch in den Gummisack eindringe, haben wir das periphere Ende desselben in einen Schlauch auslaufen

¹⁾ Die Zahlen beziehen sich auf die der ersten Mittheilung beizugebende Abbildung.

lassen und während der Sterilisation durch Saugen an dem Schlauch den in die Glocke eintretenden Dampf gezwungen, den Gummisack zu durchstreichen. Bei dem darauf folgenden Durchblasen trockener Luft liessen wir diese zunächst durch den Schlauch des Gummisacks austreten und erst nachdem letzterer vollkommen getrocknet war, durch das Ausgangsfilter. Der Schlauch wurde durch Einschieben von Sublimatwatte, sowie durch eine Wachsmasse völlig geschlossen.

Unliebsame Erfahrungen veranlassten uns, die Zeit der Sterilisation im Dampftopf, welche bisher mit Rücksicht auf die Haltbarkeit der Gummisachen nur $\frac{3}{4}$ Stunde gedauert hatte, auf 3—4 Stunden zu verlängern.

Statt des Oels benutzten wir flüssiges Paraffin, statt der $\frac{1}{2}$ -Liter-Milchflasche eine solche von einem Liter Inhalt. Besonders in den ersten Tagen des Versuchs passirte es leicht, dass während der Fütterung etwas Milch verloren ging, unter die Paraffinschicht floss und sich hier mit dem Harn mischte. Um das zu vermeiden, brachten wir eine Art Leckgefäss an, ein kleines Becherglas, welches in schräg horizontaler Lage unter dem Drahtnetz hing und den Gummistreifen (C III von vorn, C I und C II von der Seite resp. im Durchschnitt, auch in der Hauptzeichnung sichtbar) aufnahm.

Zwischen Wasserstrahlpumpe (4) und Chlorcalciumthürme (5) wurde eine Waschflasche mit concentrirter Schwefelsäure eingeschaltet, welche, alle paar Tage mit neuer Schwefelsäure gefüllt, ihre Aufgabe, Wasser zurückzuhalten, viel besser erfüllte als die Chlorcalciumthürme und diese eigentlich überflüssig machte.

Nachdem uns während eines Versuchs im Hochsommer zum Bewusstsein gekommen war, wie vortheilhaft es besonders in Bezug auf Vermeidung von Condensationen ist, wenn die umgebende Luft dieselbe Temperatur wie das Glockeninnere hat, haben wir bei unseren späteren Experimenten, welche in eine kühlere Jahreszeit fielen, diese Verhältnisse herzustellen gesucht und zwar dadurch, dass wir um den Apparat herum in einfachster Weise aus Draht und Lein-

wand ein Zelt von 8 Cubik-M. Inhalt construirten. Als Wärmequelle diente ein Auerbrenner, welcher zugleich bei Nacht das Zelt erhellte, und eventuell noch eine Bunsenflamme. Der Auerbrenner war so aufgestellt, dass die von ihm ausgehenden Wärmestrahlen mittelst einer über der Glocke aufgehängten blanken Metallplatte direct auf den Apparat geworfen wurden. Die Erwärmung von unten her durch den Thermostaten brauchte jetzt nur eine ganz geringe zu sein. Der die Glocke umgebende Glaskasten war durch diese Anordnung unnöthig geworden und kam in Wegfall.

Versuche.

Wir lassen nun eine kurze Beschreibung der 3 bzw. 5 inzwischen ausgeführten Versuche folgen. Es ist dabei zu bemerken, dass nur bei dem letzten Doppelversuch sämtliche oben erwähnte Veränderungen und Verbesserungen zur Anwendung kamen.

Versuch vom August 1895. Die Operation verlief glatt. Das Thier trank gut, frass Cakes und war sehr munter. Nach Verlauf von 5 Tagen begann die Milch sich in einer für die Labgerinnung charakteristischen Weise zu verändern. Trotzdem trank das Thier noch gern und reichlich und ohne Schaden für sein Wohlbefinden bis zum nächsten Tag. Jetzt wurde der Versuch abgebrochen. Die mikroskopische und bakteriologische Untersuchung ergab vollständige Keimfreiheit des Darms, dagegen eine Reinkultur eines Bacillus in der Milch. Derselbe gehörte zu der Gruppe der Kartoffelbacillen, bildete Sporen, welche einstündiges Kochen im Dampftopf aushielten, durch ein- und einviertelstündiges vernichtet wurden. Da diese Mikroorganismen sterile Milch sehr schnell zur Gerinnung brachten, so konnte die Veränderung der Milch nicht die Folge einer ungenügenden Sterilisation sein, vielmehr ist es wahrscheinlich, dass Watte oder Cakes die Träger der Infektion waren und dass der Keim erst während des Versuchs durch die Gummispitze in die Milch gelangte. Dieser Misserfolg veranlasste uns, in der Folge auf die Sterilisation der Watte und der Cakes noch grössere Sorgfalt zu verwenden (siehe oben). Es ist bemerkenswerth und ein Beweis für die

grosse keimtödtende Kraft des Magensaftes, dass der Darminhalt des Meerschweinchens vollständig bakterienfrei war, obwohl die Milch von Bacillen wimmelte und noch 24 Stunden in reichlicher Menge getrunken wurde.

Versuch vom October 1895 (Doppelversuch). Die Operation verlief glatt. Drei Junge von anscheinend derselben Grösse. Zwei von ihnen kamen in je einen Apparat. Erste Fütterung 17 Stunden nach der Geburt, die folgenden stündlich. Es kam wohl vor, dass die Pausen ab und zu etwas grösser waren und bis zu 2 Stunden dauerten, aber nur ausnahmsweise. Im Ganzen hielten wir daran fest, dass vom Ende der einen Fütterung bis zum Beginn der nächsten nicht mehr wie eine Stunde verstrich. Anderthalb Tage nach der Geburt begannen die Thiere Kakes zu nehmen, sie frassen bald mehr, bald weniger, zuweilen auf einmal 1—2 eben grosse Stücke. Sie tranken gern und reichlich Milch, zeigten aber nie den krankhaften Heisshunger, welchen wir an dem in unserer ersten Mittheilung beschriebenen Thier beobachtet hatten. Derselbe war unzweifelhaft durch das Bedürfniss nach fester Nahrung veranlasst: unter normalen Verhältnissen aufwachsende junge Meerschweinchen fressen schon vom zweiten Lebenstage an Mohrrüben und dergl.

Der Versuch verlief ohne jeden Zwischenfall. Die Thiere waren sehr wohl und munter, das eine (A) auch von Anfang bis zu Ende ganz trocken; auf der Innenwandung der Glocke des anderen (B) bildeten sich ab und zu Condensationen, die aber stets schnell beseitigt werden konnten. Gegen Ende des Versuchs war es dem Thier gelungen, durch Beissen während des Saugens die feine Oeffnung der Saugspitze etwas zu vergrössern, so dass trotz grösster Vorsicht bei jeder Fütterung eine geringe Menge Milch verloren ging. Infolgedessen wurden die Condensationen etwas stärker und auch das Thier fing an feucht zu werden. Der Versuch dauerte 13 volle Tage. Am Beginn des 14. musste er abgebrochen werden, da der Milchvorrath des Thieres A zu Ende ging. Während dieser Zeit hatte A 710, B 805 gr. Milch verbraucht, eingerechnet die verloren gegangenen Mengen, welche bei A sehr geringe

bei B (in Folge der Verluste in den letzten Tagen) etwas reichlicher waren.

Das Thier A wog 97,5 gr., das Thier B 88,5 gr., das Geschwister-(Kontroll-)Thier gleich nach der Geburt (trocken) 83 gr.

Nimmt man an, dass alle 3 Thiere dasselbe Anfangsgewicht hatten — und man ist zu dieser Annahme vollkommen berechtigt —, so hat während des 13tägigen Versuchs A um 14,5 und B um 5,5 gr. zugenommen. Die geringere Zunahme von B ist nicht auffallend, wenn man bedenkt, dass dieses Thier in den letzten Tagen feucht war und Wärmeverluste hatte. Da erfahrungsgemäss neugeborene Meerschweinchen in den ersten 24 Stunden erheblich an Gewicht abnehmen, so ist die Zunahme der Thiere thatsächlich eine bedeutend grössere, als sie sich in den angeführten Zahlen ausspricht.

Im Darm und in der Milch liessen sich weder mikroskopisch noch mittelst aerober und anaerober Kulturen Mikroorganismen nachweisen, dagegen fanden sich in beiden cylindrischen Gefässen (16) Reinkulturen eines und desselben Bacillus u. z. eines Wurzelbacillus. Derselbe bildete Sporen, die, wie festgestellt wurde, ein $1\frac{1}{4}$ stündiges Erhitzen im Dampftopf ertrugen. Die $\frac{3}{4}$ stündige Sterilisation unseres Apparates im strömenden Dampf hatte also nicht genügt, diese widerstandsfähigen Keime zu tödten. Nach dieser Erfahrung haben wir die Rücksicht auf die Gummisachen ausser Acht gelassen und 3 bis 4 Stunden im Dampftopf erhitzt, ausserdem dem Wasser in den cylindrischen Gefässen eine kleine Menge Sublimat zugesetzt.

Versuch vom December 1895 (Doppelversuch). Die Operation verlief ohne Zwischenfall. Zahl der Jungen u. s. w. wie beim vorigen Versuch. 10 Stunden nach der Geburt bekommen sie zum ersten Male zu trinken, 26 Stunden alt fangen sie an Kakes zu fressen. Der Verlauf des Versuchs liess nichts zu wünschen übrig. Die Thiere tranken und frassen gut, waren sehr munter und ununterbrochen vollständig trocken. Am Ende des 10. Tages musste der Versuch leider aus äusseren Gründen (Weihnachtsfest) abgebrochen werden.

Das Thier A hatte 710 gr., das Thier B 422 gr. Milch verbraucht. Ersteres wog 95,5, letzteres 83,5 gr., das Geschwister-(Kontroll-)Thier gleich nach der Geburt (trocken) 72,5, 10 Stunden nach der Geburt (und während dieser Zeit nicht gefüttert) 67,5 gr. Es ergibt sich also eine Gewichtszunahme von 23 gr bzw. 28 gr. für das Thier A und von 11 bzw. 16 gr. für das Thier B.

Darminhalt der Thiere, Milch und Exkremente waren in beiden Versuchen vollständig bakterienfrei. Mikroskopisch liess sich nichts nachweisen und die zahlreichen aerob und anaerob angelegten Kulturen blieben sämmtlich steril. Die Section ergab in Bezug auf den Darm bei beiden Thieren übereinstimmend Folgendes: Der Dünndarm war leer¹⁾, enthielt nur etwas Schleim, der Dickdarm gelbe breiige Massen, der Blinddarm war stark aufgetrieben und mit brauner käsig geronnener Flüssigkeit schwappend gefüllt. Der Dünndarm zeigte stark saure, der Dickdarm schwach saure, der Blinddarm stark alkalische Reaction.

Die beiden Doppelversuche bestätigen weiterhin den schon aus unserem ersten Experimente abgeleiteten Satz, dass Thiere ohne Bakterien im Verdauungskanal zu leben und zu wachsen vermögen. Für die ausreichende Verdauung derjenigen Nährstoffe, welche auch ausserhalb des Körpers durch die Fermente der Verdauungssäfte in lösliche Producte umgewandelt werden können, bedarf es der Mitwirkung von Seiten der Bakterien nicht.

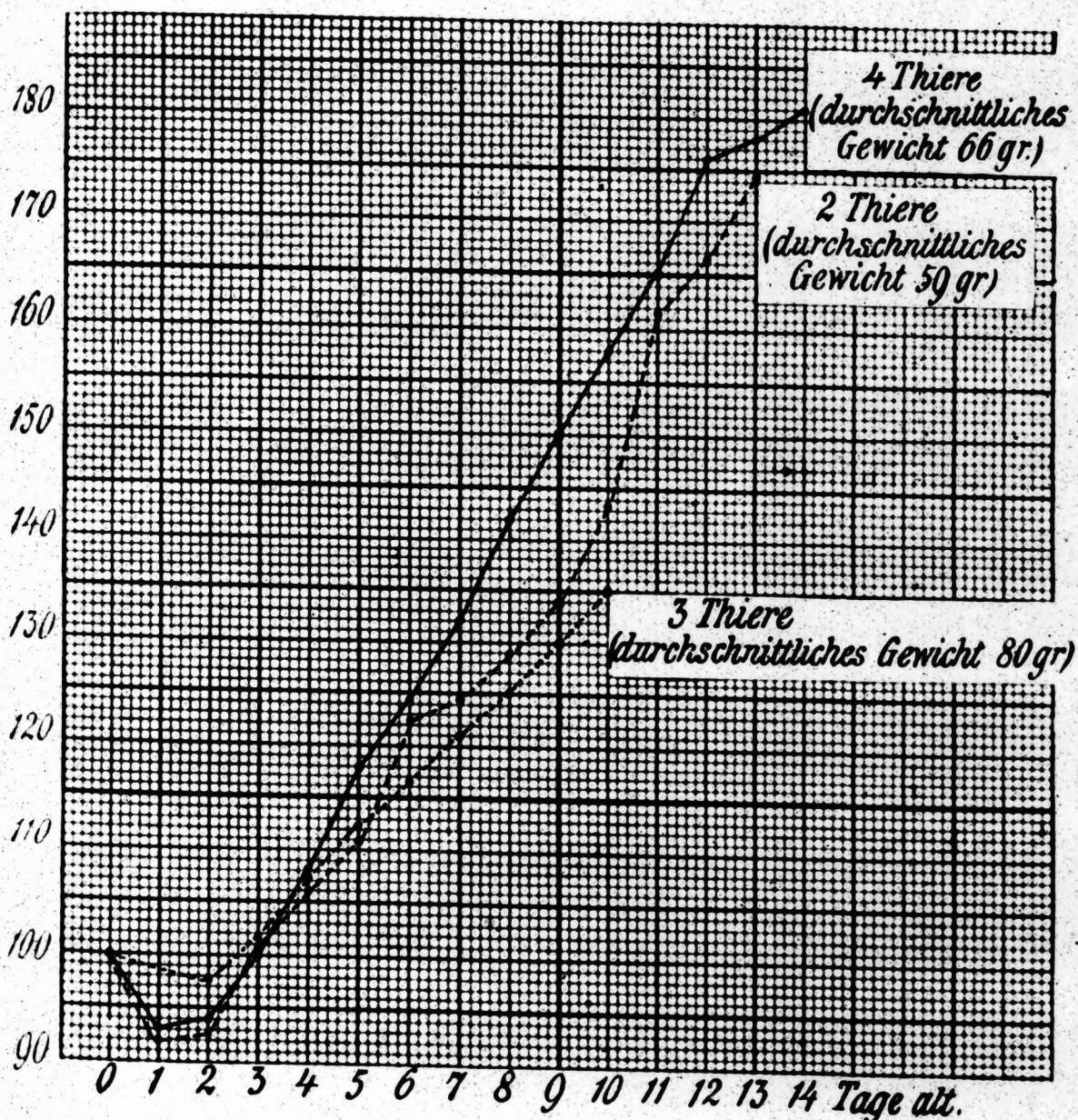
Von der Cellulose haben zahlreiche Untersuchungen festgestellt, dass sie den Verdauungssäften vollständig unzugänglich ist. Soweit sie im Darm gelöst wird, geschieht dies lediglich durch die Thätigkeit der Bakterien. Uebrigens besteht die wichtigste Aufgabe, welche die Cellulose zu erfüllen hat, wohl darin, dass sie dem Darminhalt eine lockere Consistenz verleiht und die Darmperistaltik anregt.

¹⁾ Letzte Fütterung zwei Stunden vor dem Tod.

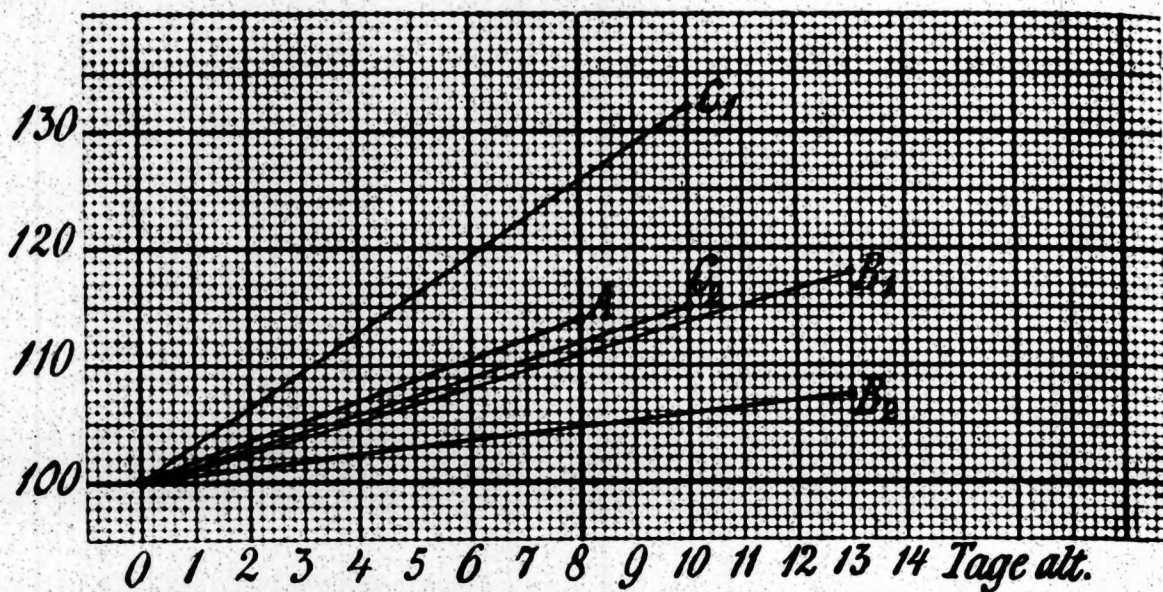
Gewichtszunahme.

In allen unseren Versuchen hat eine Gewichtszunahme der Thiere stattgefunden. Dieselbe steht aber, wie zu erwarten war, hinter der Zunahme, welche normal geborene und von der Mutter gesäugte Meerschweinchen zeigen, zurück. Das ergibt sich sehr deutlich aus den beigefügten graphischen Darstellungen. sämtliche Kurven sind auf 100 gr. Anfangsgewicht (Gewicht bei der Geburt) umgerechnet; bei den Versuchsthieren ist das Gewicht des Geschwister-(Kontroll-)Thieres zu Grunde gelegt. Jede der drei Kurven der Normalthiere stellt eine Durchschnittskurve dar, welche als Mittel aus einer Anzahl zu einer Serie gehöriger Einzelversuche gewonnen ist.

Normalthiere.



Versuchsthierc.



A. Versuch aus der ersten Mittheilung, B₁ u. B₂ Versuch 2. C₁ u. C₂ Versuch 3.

Um zu entscheiden, ob diese Unterschiede mit der An- und Abwesenheit von Bakterien in Zusammenhang zu bringen oder ob andere Faktoren dafür verantwortlich zu machen sind, haben wir einige vergleichende Versuche über Gewichtszunahme von auf verschiedene Weise geborenen und unter verschiedenen Bedingungen aufgezogenen jungen Meerschweinchen ausgeführt, deren Ergebnisse in folgender Tabelle zusammengestellt sind.

	erreichten ihr Anfangsgewicht wieder am	hatten am 6. Tag zugenommen um
Auf natürlichem Wege geborene Thiere, blieben bei der Mutter und frassen vom 2. Tag an Rüben	3. Tag	16—24 "
Auf natürlichem Wege geborene Thiere, blieben abwechselnd eine Stunde bei der Mutter und eine Stunde allein, bekamen nur Kakes zu fressen	4. Tag	11 "
Durch Kaiserschnitt geborene Thiere, blieben abwechselnd eine Stunde bei einer Amme und eine Stunde allein, bekamen nur Kakes zu fressen	5. Tag	5 "
Durch Kaiserschnitt geborene Thiere, ausschliesslich mit Kuhmilch ernährt	6. Tag	0 "

Man sieht, welche ungünstige Einwirkungen schon der Ersatz des Grünfutters durch Kakes, ferner der Umstand, dass die Thiere nicht auf natürliche Weise, sondern durch Kaiserschnitt, also vielleicht etwas zu früh, geboren sind, so-

wie die Ernährung mit Kuhmilch haben. Verglichen mit den in der Tabelle aufgeführten Zahlen erscheint die Gewichtszunahme der Versuchsthiere durchaus zufriedenstellend und man wäre eher berechtigt, aus der Abwesenheit der Bakterien einen günstigen Einfluss abzuleiten, als einen ungünstigen.

Untersuchung des Harns.

Nach den Untersuchungen von E. Baumann¹⁾ verschwinden bei energischer Darmdesinfection (mehrtägiges Hungern und Calomelgaben) aus dem Harn des Hundes sämtliche bekannte aromatische Bestandtheile mit Ausnahme der sogenannten aromatischen Oxy Säuren (Paroxyphenylpropionsäure, Paroxyphenyllessigsäure). Baumann deutet diesen Befund dahin, dass die aromatischen Paarlinge der im Harn erscheinenden Aetherschwefelsäuren und der Hippursäure lediglich der Darmfäulniss entstammen, während die aromatischen Oxy Säuren ausser durch die Fäulnissprocesse im Darm auch in den Geweben gebildet werden können.

Wir haben am Schluss unserer ersten Mittheilung bereits auseinandergesetzt, warum uns trotz der erwähnten Beobachtungen am Calomelhund der Beweis für eine Bildung aromatischer Substanzen in den Geweben nicht erbracht zu sein scheint²⁾. Zur Entscheidung der Frage standen uns die Abgänge der beiden Thiere aus dem in jeder Beziehung gelungenen Versuch 3, welche einem Milchverbrauch von über 1100 gr. entsprachen, zu Gebote. Der Inhalt der beiden cylindrischen Gefässe wurde in einer grossen Flasche vereinigt und zur Entfernung des Paraffins mit Aether geschüttelt. Die wässrige Lösung wurde von der Hauptmenge der Watte und der Kakesstückchen getrennt, mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber, mittelst eines Luftstromes vom Schwefelwasserstoff befreit und mit der verdünnten Sodalösung, welche zum Ausschütteln der ätherischen Paraffinlösung geeignet hatte, vereinigt. Nach Herstellung neutraler Reaction

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 10, S. 123.

²⁾ Vergleiche auch den Aufsatz von E. Salkowski, diese Zeitschrift, Bd. 10, S. 265.

dampften wir zum dünnen Syrup ein, säuerten mit Essigsäure an und verfahren weiter nach den von Baumann¹⁾ zur Gewinnung der aromatischen Oxysäuren gegebenen Vorschriften. Wir isolirten auf diese Weise mittelst aufeinanderfolgender Ausschüttelungen mit Aether, verdünnter Sodalösung, Aether, eine Substanz, deren wässrige Lösung mit neutralem Bleiacetat keine, mit basischem eine sehr reichliche Fällung gab. Der Niederschlag wurde ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat eingeeengt, mit reinem Aether geschüttelt, der Aetherrückstand in warmem Wasser gelöst und filtrirt, das Filtrat abermals mit Aether geschüttelt. Die wässrige Lösung des Aetherrückstandes reagierte sauer und gab starke Rothfärbung beim Erwärmen mit Millon's Reagenz. Das Filtrat zeigte nach entsprechender Behandlung mit Schwefelwasserstoff ebenfalls starke Millon'sche Reaction. Die für die Reactionen nicht verbrauchten Reste beider Flüssigkeiten wurden vereinigt, mit Salzsäure versetzt und zuerst auf dem Wasserbad, dann auf freiem Feuer $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde erhitzt, nochmals nacheinander mit Aether, Sodalösung, Aether geschüttelt. Auch jetzt gab die wässrige Lösung des Aetherrückstandes eine starke Rothfärbung beim Erwärmen mit Millon's Reagenz.

Von einer weiteren Identifizirung konnte in Anbetracht der relativ geringen Menge des benutzten Harns natürlich keine Rede sein. Die angewandte Isolirungsmethode, sowie der positive Ausfall der Reaction lassen aber keinen Zweifel darüber, dass wir es mit aromatischen Oxysäuren zu thun haben. Es blieb noch übrig, den Einwand zurückzuweisen, dass die Millon'sche Reaction gebende Säuren etwa in der Milch, in den Kakes oder in dem Paraffin enthalten und so präformirt in den Versuch eingeführt worden sein könnten. Zu dem Zweck haben wir den Rest des Inhaltes der Milchflaschen (707 gr.), eine Portion eine halbe Stunde bei 150° sterilisirter Kakes, sowie schliesslich auch 4 bis 5 Stunden mit Sublimatwasser erhitztes Paraffin einer der oben beschriebenen gleichen, sorgfältigen Untersuchung unterzogen.

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 6, S. 191.

ohne dass es gelungen wäre, eine Substanz zu isoliren, welche auch nur andeutungsweise die in Rede stehende Reaction gegeben hätte.

Phenol, Kresol, Indol, Skatol, Brenzkatechin liessen sich in dem Harn der Versuchsthiere nicht nachweisen, auf Hippursäure wurde nicht untersucht.

Die Angabe von E. Baumann, dass die aromatischen Oxysäuren (oder vielleicht nur eine derselben) auch unabhängig von der Darmfäulniss entstehen, ist durch unsere Untersuchung in einer, wie uns scheint, einwandfreien Weise bestätigt worden.

Wir werden auf diesen Punkt in einer späteren Mittheilung noch zurückzukommen haben.

Zur Zeit sind wir damit beschäftigt, entsprechende Versuche an Hühnern anzustellen.

Auch für diese Untersuchung wurden uns die erforderlichen Geldmittel aus der Gräfin Bose-Stiftung von der medicinischen Fakultät der Universität Berlin zur Verfügung gestellt.