

Über den Einfluß von Protoplasmagiften auf die Trypsinverdauung.

Von

Dr. Rudolf Kaufmann, Assistent der Allgem. Poliklinik.

(Aus dem chemischen Laboratorium von Prof. Dr. Julius Mauthner, Allgemeine Poliklinik in Wien.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. August 1903.)

Zum Nachweise von Trypsinferment in den Faeces benützt Leo¹⁾ die von Wittich entdeckte Eigenschaft des Blutfibrins, sich mit Fermenten zu beladen. Um das Faulen des Fibrins zu verhindern, verrührt er — wie es bei Fermentversuchen die Regel ist, die durch die Tätigkeit von Mikroben beeinflußt werden könnten — die Faeces mit chloroform- oder thymolhaltigem Wasser und macht die Verdauungsversuche mit dieser Mischung nach 24stündigem Stehen. Der negative Ausfall der Verdauungsprobe beweist nach Leo das Fehlen des Trypsinfermentes, der positive das Vorhandensein desselben.

Mit Versuchen über den Nachweis von proteolytischem Ferment in Stühlen unter verschiedenen Bedingungen beschäftigt, mußte es meine nächste Aufgabe sein, zu sehen, ob der Zusatz von Chloroform und Thymol zu Trypsinlösungen für die Verdauung gleichgültig ist oder nicht. Im weiteren Verlaufe wurden diese Versuche auch auf andere Protoplasmagifte ausgedehnt, welche als indifferent gegen Fermente und zugleich als keimtötend gelten (Toluol, Fluornatrium). Da eine Zusammenstellung der in der Literatur zerstreuten Angaben über ähnliche Versuche und die Resultate meiner eigenen für andere Arbeiter von Nutzen sein könnten, so teile ich sie im folgenden mit:

Die Angabe, daß der Zusatz von Chloroform zu einer fermenthaltigen Flüssigkeit die Mikroorganismen vergifte, die Tätigkeit der ungeformten Fermente aber intakt lasse, stammt

von Müntz.²⁾ Sie wurde von Salkowski übernommen, nachgeprüft und zuerst bestätigt,³⁾ dann aber in einer späteren Arbeit⁴⁾ ⁵⁾ — wenigstens soweit es sich um Trypsin und Labferment handelt — widerrufen. Fokker⁶⁾ wies durch Versuche mit getrocknetem Pankreas, mit Pepsin und Hefediastase nach, daß sich das Chloroform in bezug auf hemmende Wirkung den Fermenten gegenüber so wie die übrigen Antiseptica verhält, daß es «in kleiner Menge organisierte Fermente unwirksam macht, in größerer Menge die Wirkung nicht organisierter Fermente hemmt». Von Freudenreich⁷⁾ wurde der schädigende Einfluß des Chloroformwassers auf Labferment bestätigt. Von Pugliese⁸⁾ wurde eine schädigende Wirkung des Chloroforms auf das diastatische Ferment des Speichels, von E. Fischer und von Lintner und Kröber⁹⁾ auf Hefeglykase nachgewiesen. Herissey¹⁰⁾ fand keine Schädigung der Aspergillusmaltase durch Zusatz von Chloroform, Fischer keine Schädigung des Invertins. Die ausführliche Arbeit Treyers,¹¹⁾ welche sich auch mit der Wirkung des Chloroforms auf Trypsin beschäftigt, wird später ausführlich zu zitieren sein.

Die Einführung des Thymols als antiseptisches und anti-fermentatives Mittel stammt von Lewin.¹²⁾ Lewin gibt an, daß «künstliche Verdauungsversuche, die teils mit Pepsin-essenz, teils mit der Schleimhaut von Kaninchenmagen an-gestellt wurden, auch nicht die geringste Verhinderung der Verdauung durch Zusatz von Thymol ergaben». In der ausgedehntesten Weise wurde das Thymol von Fermi und Pernossi¹³⁾ und Fermi¹⁴⁾ ¹⁵⁾ ¹⁶⁾ als Zusatz zu den Gelatinröhrchen verwendet, mittels welcher sie die Verdauungsstärke von Trypsinlösungen und von proteolytischen Bakterienfermenten untersuchten. Es ist notwendig, hier auf diejenigen Versuche Fermis und Pernossis etwas genauer einzugehen, durch welche eine geringe schädigende Wirkung des Zusatzes von Thymollösungen zu Trypsinlösungen nachgewiesen wurde.¹³⁾

Die Versuche Fermis und Pernossis wurden auf folgende Art ausgeführt: Eine 0,5%ige Trypsinlösung wurde zu gleichen Teilen mit 10%iger alkoholischer Thymollösung versetzt und diese Mischung teils 48 Stunden, teils 10 Tage bei 37° C.

stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeiträume wurde die Mischung so verdünnt, daß sie eine 0,1^o/_{oo}ige Trypsinlösung darstellte, und die Wirksamkeit dieser Verdünnung nach der von Fermi eingeführten Methode geprüft. Es wurden nämlich einige Kubikzentimeter dieser Verdünnung zu Gelatine zugesetzt, welche in Eprouvetten eingefüllt war, und nach 10 Tagen wurde die verflüssigte Gelatineschicht gemessen. Diejenige Mischung von Trypsin und Thymol, welche 48 Stunden lang gestanden war, bevor der Verdauungsversuch begonnen wurde, hatte in der erwähnten Verdünnung eine 10 mm hohe Gelatinesäule verflüssigt; diejenige Mischung, in welcher die Wirkung des Thymols auf Gelatine 10 Tage lang gedauert hatte, verflüssigte nur eine 1 mm hohe Gelatinesäule. Fermi und Pernossi heben daher unter den Resultaten, welche sie aus diesen Thymolversuchen und gleichen Versuchen mit anderen Substanzen ziehen, hervor, daß durch Thymol das Trypsin nicht zerstört wird, führen aber andererseits doch das Thymol nicht unter denjenigen Substanzen an, welche «zur Erhaltung des Trypsins am wirksamsten sind».*)

Mitteilungen über die Wirkung des Thymols auf Speicheldiastase finden sich bei Schlesinger¹⁴⁾ und bei Pugliese.⁸⁾ In den Versuchen dieser Autoren hemmt das Thymolwasser die Wirkung der untersuchten Fermente, und bei Pugliese findet sich die Angabe, daß die Schädigung, welche das Speichelferment durch Thymol erfährt, mit der Verdünnung des Speichels zunimmt. Nach E. Fischer schädigt Thymol Hefemaltase nicht. Treyer¹¹⁾ hat auch Thymol in den Bereich seiner Versuche einbezogen und ist zu dem Resultate gekommen, daß Thymol ebenso wie die anderen Antiseptica die Trypsinverdauung hemmt.

Die Verwendung des Fluornatriums als Antisepticum

*) Die gleiche Verdauungskraft, wie die mit Thymol versetzte Trypsinlösung, besaß nach den angeführten Versuchen auch eine mit Wasser hergestellte und 48 Stunden, respek. 10 Tage stehen gelassene Trypsinlösung von gleichem Trypsingehalt. Der schädigende Einfluß des Wassers und des Thymolwassers wird auch an anderer Stelle hervorgehoben.¹⁴⁾

stammt von Tappeiner.¹⁸⁾ Die Angabe, daß diese Substanz Bakterien abtötet, die Wirkungen nicht organisierter Fermente aber nicht beeinflußt, stammt von Arthus und Huber.¹⁹⁾ Nach diesen letzteren Autoren wirken die löslichen Fermente, wie Invertin, Trypsin, Emulsin usw., in Gegenwart des Fluornatriums ebenso kräftig wie ohne diesen Zusatz. Die fermentative Kraft von Magensaft und Pankreassaft wird von einer 1%igen Fluornatriumlösung auch nach mehreren Monaten und bei 40° Temperatur nicht schädlich beeinflußt. Wie Müntz in der Resistenz gegen Chloroform, so sehen Arthus und Huber in der Resistenz gegen Fluornatrium eine charakteristische Eigenschaft der «chemischen Fermentationen» im Gegensatz zu «vitalen Fermentationen».

«Le fluorure de sodium à 1 : 100 permet de déterminer la nature d'un phénomène ayant pour siège les milieux organiques et de le rapporter soit à une action vitale, soit à une action diastasique.»

Treyer¹¹⁾ kommt dagegen auch bei seinen Fluornatriumversuchen zu dem Resultate, daß die Trypsinverdauung durch Fluornatrium wesentlich behindert werde.

Das Toluol wurde von E. Fischer^{21) 22)} als Zusatz zu Fermentlösungen empfohlen, in welchen eine Wirkung von Bakterien ausgeschaltet werden sollte. Pugliese⁸⁾ bestätigt in der oben zitierten Arbeit, daß von Toluol im Gegensatze zu Thymol die diastatische Wirkung des Speichelfermentes nicht beeinträchtigt wird. Andere Literaturangaben über Versuche von Toluoleinwirkung auf Verdauungsfermente konnte ich nicht finden.

Die im Vorhergehenden wiederholt zitierten Versuche Treyers beziehen sich auf den Einfluß verschiedener Antifermentativa, darunter von Thymol, Fluornatrium und Chloroformwasser auf Hefeinvertin, Malzdiastase, Emulsin, Pepsin und Trypsin. Treyer verwendet eine 0,25%ige Lösung von Grüblerschem Trypsin, welche in der ersten Versuchsreihe neutral, in der zweiten als 1%ige Sodalösung in Portionen geteilt wird. Je 10 ccm dieser Lösung werden mit je 10 ccm Wasser, Thymolwasser, Karbolwasser, 2%iger Fluornatrium-

lösung, Chloroformwasser, Ätherwasser und 2⁰/₀₀iger Salicylsäurelösung versetzt und mit einer gleichen Anzahl gleichgroßer Eiweißwürfel beschickt. In den Versuchen mit neutraler Trypsinlösung waren nach 72 Stunden die Würfel in den Thymol-, Karbolsäure-, Fluornatrium- und Chloroformwasserportionen unverdaut. Die Würfel in Ätherwasser waren zum Teil aufgelöst; die Würfel in der Salicylsäurelösung waren verkleinert. Bei den Versuchen mit alkalischer Trypsinlösung waren die Würfel in der Thymol- und Fluornatriumlösung etwas verkleinert, in den übrigen Lösungen unverändert. Bei Versuchen mit aus Pankreas hergestelltem Trypsin war die Verdauung in der Thymol-, Fluornatrium- und Ätherwasserlösung nach 72 Stunden vorgeschritten, aber nirgends vollständig beendet, die Verdauung in den übrigen Lösungen noch nicht im Gange. Treyer folgert aus seinen Versuchen, daß die Antiseptica im allgemeinen die Fermenttätigkeit verzögern. Diese Verzögerung variiert je nach den einzelnen Fermenten und nach den einzelnen Antiseptics.

Die Durchsicht der in der Literatur niedergelegten Arbeiten über den Einfluß von Protoplasmagiften auf die Wirkung des Trypsinfermentes — und anderer Fermente — zeigt demnach einen auffallenden Widerspruch in den Resultaten der verschiedenen Forscher. Während nach den einen der Zusatz verschiedener Substanzen die Fermentwirkung durchaus unbeeinflußt läßt, ja einige aus dieser von ihnen gefundenen oder bestätigten Tatsache einen wesentlichen Unterschied der von organisierten und nichtorganisierten Protoplasmen hervorgerufenen Zersetzungen ableiten, hemmen nach anderen Autoren dieselben Substanzen dieselben Fermentwirkungen oder heben sie vollkommen auf. Es lag der Gedanke nahe, daß dieser Widerspruch auf der verschiedenen Stärke der angewendeten Fermentlösung beruhe. Meine Versuche gehen deshalb im wesentlichen von der Fragestellung aus, ob und bei welchen Verdünnungsgraden der Trypsinlösungen ein schädigender Einfluß antiseptischer Substanzen konstatierbar wäre. Da außerdem aus einigen Punkten der Fermischen und Pernossischen Experimente eine Dissociation der fibrinverdauenden und der

gelatineverdauenden Kräfte des Trypsins hervorzugehen scheint, so wurden die Versuche sowohl mit Fibrin als mit Gelatine angestellt.

I. Fibrinversuche.

Das in diesen und in allen übrigen Versuchen verwendete Trypsin ist von Dümmler in Wien bezogenes Grüblersches Trypsin. Die Fläschchen, in welchen dasselbe in den Handel kommt, enthalten die Angabe, daß «0,1 g gelöst in zirka 30 ccm alkalischem Wasser 8—10 g und mehr frisches Blutfibrin verdauen.» Die Trypsinlösungen wurden jeden Tag unmittelbar oder wenige Stunden vor dem Beginn jeden Versuches frisch bereitet, um eine Schwächung des Trypsins durch das Stehen in wässriger Lösung zu vermeiden. Als Lösungsmittel diente in allen Versuchen 1%ige Natriumcarbonicum-Lösung. Alle Zusätze, wie Chloroformwasser, Thymolwasser etc., wurden durch Schütteln der betreffenden Substanzen in 1%iger Sodalösung, die Fluornatriumlösung durch Auflösung von Fluornatrium in Sodalösung bereitet, die weiteren Verdünnungen der Trypsinlösung mit derselben Sodalösung hergestellt, so daß in allen Eproutetten, zu welchen Fibrin zugesetzt wurde, der Sodagehalt der gleiche war. Das Karminfibrin ist Grüblersches Karminfibrin, das vor dem Gebrauche ausgewaschen wurde. Die Fibrinversuche sind durchweg im Brutofen bei 37° Temperatur ausgeführt.

A. Versuche mit Toluol.

In der ersten Versuchsreihe wurden die frisch bereiteten Trypsinverdünnungen mit einem Toluolsodawassergemenge versetzt und die Verdauungsversuche sofort nach der Mischung der beiden Flüssigkeiten begonnen. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Trypsinlösungen durch 24 Stunden mit Toluol stehen gelassen und erst nach 24stündiger Einwirkung des Toluols auf die Trypsin-Stammlösung die Verdünnungen hergestellt und die Fibrinflocken eingelegt. Das Gemenge von Toluol und Sodalösung wurde in den Versuchen 1 und 2 derart hergestellt, daß 10 g Toluol und 90 g 1%ige Sodalösung geschüttelt wurden; von diesem Gemenge wurden je 5 ccm zu

den Trypsinverdünnungen zugesetzt. In den übrigen Versuchsreihen wurde Toluol den Fermentlösungen überschichtet.

Versuch 1. Die aufgestellten Eprouvetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Toluollösung	Sodalösung	Trypsin-Toluol-Sodalösung
A.	5 ccm 1 ^o / ₁₀	+ 5 ccm	—	= 0,5 ^o / ₁₀
B.	4 » 1 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 1 ccm	= 0,4 ^o / ₁₀
C.	3 » 1 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 2 »	= 0,3 ^o / ₁₀
D.	2 » 1 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 3 »	= 0,2 ^o / ₁₀
E.	1 » 1 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 4 »	= 0,1 ^o / ₁₀

Die Kontrollproben F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 1 ^o / ₁₀	+ 5 ccm	= 0,5 ^o / ₁₀
G.	4 » 1 ^o / ₁₀	+ 6 »	= 0,4 ^o / ₁₀
H.	3 » 1 ^o / ₁₀	+ 7 »	= 0,3 ^o / ₁₀
J.	2 » 1 ^o / ₁₀	+ 8 »	= 0,2 ^o / ₁₀
K.	1 » 1 ^o / ₁₀	+ 9 »	= 0,1 ^o / ₁₀

Nach 6 Stunden ist in allen Eprouvetten (A—K) die Fibrinflocke vollständig verdaut.

Versuch 2. Die Eprouvetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Toluollösung	Sodalösung	Trypsin-Toluol-Sodalösung
A.	5 ccm 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 ccm	—	= 0,1 ^o / ₁₀
B.	4 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 1 ccm	= 0,08 ^o / ₁₀
C.	3 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 2 »	= 0,06 ^o / ₁₀
D.	2 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 3 »	= 0,04 ^o / ₁₀
E.	1 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 »	+ 4 »	= 0,02 ^o / ₁₀

Die Kontrolleprouvetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 0,2 ^o / ₁₀	+ 5 ccm	= 0,1 ^o / ₁₀
G.	4 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 6 »	= 0,08 ^o / ₁₀
H.	3 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 7 »	= 0,06 ^o / ₁₀
J.	2 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 8 »	= 0,04 ^o / ₁₀
K.	1 » 0,2 ^o / ₁₀	+ 9 »	= 0,02 ^o / ₁₀

Nach 6 Stunden ist in allen Lösungen die Fibrinflocke verdaut, in den Lösungen D und E sind einige kleine Flocken geblieben, die sich beim Umrühren auch rasch auflösen.

Versuch 3. Die Eprouvetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Toluollösung	Sodalösung	Trypsin-Toluol- Sodalösung
A.	5 ccm 0,04 ‰	+ 5 ccm	—	= 0,02 ‰
B.	4 » 0,04 ‰	+ 5 »	+ 1 ccm	= 0,016 ‰
C.	3 » 0,04 ‰	+ 5 »	+ 2 »	= 0,012 ‰
D.	2 » 0,04 ‰	+ 5 »	+ 3 »	= 0,008 ‰
E.	1 » 0,04 ‰	+ 5 »	+ 4 »	= 0,004 ‰

Die Kontrollepröuvetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 0,04 ‰	+ 5 ccm	= 0,02 ‰
G.	4 » 0,04 ‰	+ 6 »	= 0,016 ‰
H.	3 » 0,04 ‰	+ 7 »	= 0,012 ‰
J.	2 » 0,04 ‰	+ 8 »	= 0,008 ‰
K.	1 » 0,04 ‰	+ 9 »	= 0,004 ‰

Nach 6 Stunden ist die Verdauung in den Epröuvetten A, B im Gang, nach 8 Stunden ist sie in den Epröuvetten A, B, C, D im Gang oder bereits vorgeschritten. Nach 24 Stunden ist sie in den Epröuvetten A—D vollständig. In E ist eine Quellung sichtbar, aber ohne Zeichen der Verdauung. Ebenso ist nach 48 Stunden die Fibrinflocke in E durchaus unverdaut. In den Epröuvetten F, G, H, J ist schon nach 6 Stunden deutliche Verdauung erkennbar, nach 24 Stunden hat sich auch die Flocke der Lösung K vollständig aufgelöst (ohne Trübung der Lösung).

Versuch 4. Der Versuch 3 wird in derselben Anordnung wiederholt mit Übersichtung der entsprechenden Lösungen mit Toluol, weil in einigen Epröuvetten das Toluol, das sich aus dem Toluolsodawassergemenge abgesetzt hatte, nach 48 Stunden verdunstet war. Die Resultate sind die gleichen wie in Versuch 3.

Die Versuche 1—4 ergeben demnach: Bei Einwirkung von Toluol auf Trypsinlösungen während der Verdauung tritt in 0,08 ‰iger Trypsinlösung eine Verzögerung der Verdauung zutage. Eine 0,04 ‰ige Trypsinlösung (welche ohne Toluolzusatz in 24 Stunden eine Fibrinflocke noch vollständig verdaut) wird durch Zusatz von Toluol unwirksam gemacht.

Versuch 5. Bei diesem Versuch wurden die Trypsinlösungen mit Toluolsodalösung versetzt, dann Toluol darüber geschichtet und hierauf diese sowie die Kontrolllösungen 24 Stunden stehen gelassen, bevor mit dem Einbringen der Fibrinflocke und dem Einstellen in den Brutofen der Verdauungsversuch begonnen wurde.

Versuch 6. Die Lösungen A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Toluol-Sodalösung	Sodalösung	Trypsin-Toluol-Sodalösung
A.	5 ccm 0,2 ‰	+ 5 ccm	—	= 0,1 ‰
B.	4 » 0,2 ‰	+ 5 »	+ 1 ccm	= 0,08 ‰
C.	3 » 0,2 ‰	+ 5 »	+ 2 »	= 0,06 ‰
D.	2 » 0,2 ‰	+ 5 »	+ 3 »	= 0,04 ‰
E.	1 » 0,2 ‰	+ 5 »	+ 4 »	= 0,02 ‰

Die Kontrollprouvetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 0,2 ‰	+ 5 ccm	= 0,1 ‰
G.	4 » 0,2 ‰	+ 6 »	= 0,08 ‰
H.	3 » 0,2 ‰	+ 7 »	= 0,06 ‰
J.	2 » 0,2 ‰	+ 8 »	= 0,04 ‰
K.	1 » 0,2 ‰	+ 9 »	= 0,02 ‰

Nach 24 Stunden ist die Karminflocke in A vollständig verdaut; in B, C, D sind Reste der Flocke bis zur Größe einer Erbse erhalten, die Flocke in E ist ganz unverändert. In den Lösungen F—K sind die Flocken vollständig verdaut.

Nach 24stündiger Einwirkung des Toluols auf Trypsinlösungen tritt demnach eine geringe schädigende Wirkung schon bei 0,8‰igen Trypsinlösungen zutage. Die verdauende Kraft einer 0,2‰igen Lösung wird aufgehoben. Eine 1‰ige Trypsinlösung wird durch den Zusatz von Toluol nicht nachweisbar beeinflusst.

B. Versuche mit Fluornatrium.

Die Fluornatriumlösung, welche zu der Trypsinverbindung zugesetzt wurde, ist durch Auflösung von 4 g Fluornatrium in 100 g 1‰iger Sodalösung hergestellt. Da je 5 ccm dieser

Lösung zu 5 ccm der Trypsin-Sodamischung zugesetzt wurden, so enthielten die Eprouvetten eine 2^o/_oige Fluornatriumlösung. Wie bei den ersten Toluolversuchen wurden auch diesmal anfangs die Fluornatrium-Trypsinlösungen sofort mit Fibrinflocken beschickt und in den Brutofen gestellt. Bei einem zweiten Versuche wurden dann die Lösungen in der Art hergestellt, daß das Trypsin in 4^o/_oiger Fluornatrium-Sodalösung gelöst wurde, zu dieser Lösung 4^o/_oige Fluornatriumlösung in verschiedenen Mengenverhältnissen zugesetzt und diese Mischungen vor Beginn des Versuches 24 Stunden stehen gelassen wurden.

Versuch 7: Die Eprouvetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Fluornatrium-Sodalösung	Sodalösung	Trypsin-Fluornatrium-Sodalösung
A.	5 ccm 0,2 ^o / _o	+ 5 ccm	—	= 0,1 ^o / _o
B.	4 » 0,2 ^o / _o	+ 5 »	+ 1 ccm	= 0,08 ^o / _o
C.	3 » 0,2 ^o / _o	+ 5 »	+ 2 »	= 0,06 ^o / _o
D.	2 » 0,2 ^o / _o	+ 5 »	+ 3 »	= 0,04 ^o / _o
E.	1 » 0,2 ^o / _o	+ 5 »	+ 4 »	= 0,02 ^o / _o

Die Kontrolleprouvetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm	+ 5 ccm	= 0,1 ^o / _o
G.	4 »	+ 6 »	= 0,08 ^o / _o
H.	3 »	+ 7 »	= 0,06 ^o / _o
J.	2 »	+ 8 »	= 0,04 ^o / _o
K.	1 »	+ 9 »	= 0,02 ^o / _o

Nach 18 Stunden sind in den Röhrchen A, B ganz geringe, in C größere Reste der Fibrinflocke erhalten, in D und E große unverdaute Stücke; in den Röhrchen F, G, H sind die Flocken ganz, in J und K bis auf minimale Reste verdaut.

D. h. bei Zusatz einer 2^o/_oigen Fluornatriumlösung ist bereits in einer 0,6^o/_oigen Trypsinlösung eine Behinderung, in einer 0,2^o/_oigen Lösung eine ausgesprochene Hemmung der Verdauung nachweisbar.

In dem folgenden Versuche wurde 0,2 g Trypsin in 100 g einer 1^o/_oigen Sodalösung, zu welcher 4 g Fluornatrium zugesetzt waren, gelöst, diese Lösung durch 24 Stunden stehen gelassen und dann die Verdünnungen in derselben Stärke wie im Versuch 7 hergestellt und mit Fibrinflocken beschickt.

Versuch 8: Die Eprouvetten A—E enthalten:

	Trypsin-Fluornatrium- lösung	Fluornatrium- Sodalösung	Trypsin-Fluornatrium- Sodalösung
A.	5 ccm 0,2 %	+ 5 ccm	= 0,1 %
B.	4 » 0,2 %	+ 6 »	= 0,08 %
C.	3 » 0,2 %	+ 7 »	= 0,06 %
D.	2 » 0,2 %	+ 8 »	= 0,04 %
E.	1 » 0,2 %	+ 9 »	= 0,02 %

Die Kontrollepröuvetten F—K enthalten dieselben Trypsinverdünnungen wie die gleichbezeichneten Epröuvetten im Versuch 7.

Nach 14 Stunden sind in den Röhrcchen A und B die Fibrinflocken ganz verdaut; in den Röhrcchen C und D sind kleine Flockenportionen erhalten, in dem Röhrcchen E ist die Fibrinflocke unverändert. In den Kontrollröhrcchen sind die Flocken ganz verdaut.

Nach 24stündiger Einwirkung einer 4%igen Fluornatriumlösung tritt demnach eine geringe schädigende Wirkung schon an 0,6‰igen Trypsinlösungen zutage; die verdauende Wirkung einer 0,2‰igen Lösung wird aufgehoben. Eine 0,8‰ige Lösung wird durch den Zusatz von Fluornatrium nicht nachweisbar beeinflusst.

C. Versuche mit Chloroform.

Das Chloroformwasser, das zu den Trypsinlösungen zugesetzt wurde, ist durch längeres Schütteln von Chloroform in 1%iger Sodalösung hergestellt. Das Trypsin wurde in diesen Versuchen ebenfalls nicht in reiner Sodalösung, sondern in der mit Chloroform durchgeschüttelten Sodalösung aufgelöst. Die Lösung wurde 24 Stunden stehen gelassen, dann die Verdünnung hergestellt.

Versuch 9: Die Epröuvetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Chloroform- (Soda-)Wasser	Trypsin-Chloroform- Sodalösung
A.	5 ccm 0,2 %	+ 5 ccm	= 0,1 %
B.	4 » 0,2 %	+ 6 »	= 0,08 %
C.	3 » 0,2 %	+ 7 »	= 0,06 %
D.	2 » 0,2 %	+ 8 »	= 0,04 %
E.	1 » 0,2 %	+ 9 »	= 0,02 %

Die Kontrolleprovetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 0,2%	+ 5 ccm	= 0,1 %
G.	4 > 0,2%	+ 6 >	= 0,08%
H.	3 > 0,2%	+ 7 >	= 0,06%
J.	2 > 0,2%	+ 8 >	= 0,04%
K.	1 > 0,2%	+ 9 >	= 0,02%

Nach 14 Stunden sind in A eine dünne durchsichtige Flocke, in B und C große erweichte Flocken, in D und E die unveränderte Fibrinflocke enthalten; in F, G, H, J ist die Fibrinflocke bereits ganz verdaut, in K ein durchsichtiges Flöckchen erhalten.

Nach 26 Stunden sind die Flocken der Röhrcchen A, B, C, ferner die Röhrcchen F—K ganz verdaut und aufgelöst; in D ist die Fibrinflocke kaum, in E gar nicht angegriffen.

D. h. bei 24stündiger Einwirkung von Chloroformwasser wird eine 1‰ige Trypsinlösung in ihrer Verdauungskraft in behindert, eine 0,8‰ige bereits gehemmt. Die Verdauungskraft einer 0,2‰igen Trypsinlösung wird ganz aufgehoben.

D. Versuche mit Thymol.

Das Thymolwasser wurde durch Auflösen von Thymolkrystallen in erwärmter 1%iger Sodalösung, Abkühlen und Abfiltrieren der erkalteten Lösung hergestellt. Die Trypsinlösung wurde durch Auflösen des Trypsins in diesem Thymolsodawasser hergestellt, 24 Stunden stehen gelassen, dann entsprechend verdünnt und zu den Versuchen verwendet.

Versuch: Die Eprovetten A—E enthalten:

	Trypsinlösung	Thymol-Sodalösung	Trypsin-Thymol-Sodalösung
A.	5 ccm 0,2%	+ 5 ccm	= 0,1 %
B.	4 > 0,2%	+ 6 >	= 0,08%
C.	3 > 0,2%	+ 7 >	= 0,06%
D.	2 > 0,2%	+ 8 >	= 0,04%
E.	1 > 0,2%	+ 9 >	= 0,02%

Die Kontrolleprovetten F—K enthalten:

	Trypsinlösung	Sodalösung	Trypsin-Sodalösung
F.	5 ccm 0,2 ^o / _o	+ 5 ccm	= 0,1 ^o / _o
G.	4 » 0,2 ^o / _o	+ 6 »	= 0,08 ^o / _o
H.	3 » 0,2 ^o / _o	+ 7 »	= 0,06 ^o / _o
J.	2 » 0,2 ^o / _o	+ 8 »	= 0,04 ^o / _o
K.	1 » 0,2 ^o / _o	+ 9 »	= 0,02 ^o / _o

Nach 23 Stunden ist in A eine ganz dünne, durchsichtige Flocke erhalten, in B ist ein erbsengroßes Stück, in C ein Rest in der Größe von $\frac{2}{3}$ der ursprünglichen Fibrinflocke übrig. In D ist die Fibrinflocke ganz erhalten und nur an den Rändern durchscheinend; in E ist die Fibrinflocke etwas gequollen, aber sonst unverändert. Die Fibrinflocken der Kontrolleprovetten sind ganz verdaut und gelöst.

D. h. bei 24stündiger Einwirkung von Thymolwasser wird eine 1^o/_oige Trypsinlösung in ihrer Verdauungskraft behindert; die Verdauungskraft einer 0,2^o/_oigen Lösung wird ganz aufgehoben.

II. Gelatineversuche.

Zur quantitativen Prüfung sehr verdünnter Trypsinlösung habe ich ein Verfahren eingeschlagen, das im wesentlichen eine Kombination der Fermischen Anwendung der Gelatine als Reagens zum Nachweise tryptischer Fermente¹⁵⁾ mit der Mettschen Kapillarmethode²³⁾ ist. Fermi hat im Jahre 1892 die Verwendung der Gelatine an Stelle des Fibrins empfohlen unter Hinweis auf die großen Vorteile, welche diese seine Methode im Gegensatze zu den bisher üblichen bietet. Diese Vorteile bestehen hauptsächlich darin, daß die Gelatine gegen proteolytische Fermente viel empfindlicher ist als Fibrin oder Eiweiß und daß die Gelatineverflüssigung — in gleichen Zeiten — ein Maß für die Stärke der einwirkenden verdauenden Kraft darstellt. Von diesen Überlegungen und Erfahrungen ausgehend, füllt Fermi zur quantitativen, vergleichweisen Bestimmung tryptisch wirkender Lösungen Reagensgläser von kleinem Durchmesser mit 5—15^o/_oiger Gelatinelösung, setzt zu der erstarrten Gelatine die zu prüfenden Flüssigkeiten hinzu und liest nach 2—8 Tagen, oder auch nach mehreren Wochen, die Höhe der verflüssigten Gelatinesäule in Millimetern ab.

Es war sehr naheliegend, diese Fermische Methode, bei welcher nur Ablesungen nach ganzen oder halben Millimetern möglich sind, durch Verwendung Mettscher Kapillaren, welche statt mit Eiweißlösung mit Gelatinelösung gefüllt sind, zu verfeinern. Diese Modifikation ermöglicht es, die Differenzen in der Länge des verdauten Gelatinezylinders bis zu $\frac{1}{5}$ mm genau zu studieren; sie zeigt quantitative Unterschiede in der Stärke der verwendeten tryptischen Lösungen schon nach Stunden deutlich an; und sie scheint endlich — was bei der Prüfung von Lösungen, welche Bakterien und Fermente enthalten, besonders wichtig ist — den großen Vorteil zu bieten, daß die Gelatine in den Kapillaren in bakterienhaltigen Flüssigkeiten nicht fault. Es ist andererseits klar, daß die Kautelen, unter welchen die erhaltenen Resultate konstant und absolut verwendbar sind, viel strengere sein müssen, als die Kautelen bei Anwendung der ursprünglichen Fermischen Methode — nach meinen Beobachtungen auch strenger, als bei der Verwendung der Eiweißlösung in Kapillaren nach Mett, weil das Alter und die Konzentration der Gelatinelösung bei der Verdauung eine große Rolle spielt. Ich werde diejenigen Bedingungen, welche die Sicherheit und Empfindlichkeit der von mir angewendeten Modifikation der Fermischen Methode sicherstellen, sowie die darauf bezüglichen Versuche in einer folgenden Mitteilung auseinandersetzen. Im folgenden gebe ich, ohne Eingehen in Details, die Technik derjenigen Versuche an, die ich zum Studium der Einwirkung der Antiseptica auf die gelatineverdauende Kraft des Trypsins angestellt habe.

Die von mir in den folgenden Versuchen verwendete Gelatine ist eine fünfprozentige Lösung. 5 g der in den Droguerien erhältlichen «feinen» Gelatineblätter werden zunächst in 70 ccm destilliertem Wasser auf dem Wasserbad gelöst; die Gelatinelösung wird dann in einem Meßzylinder noch einmal abgemessen, eventuell wird — wenn durch etwas längeres Kochen die Lösung eingedampft ist — wieder auf 70 ccm nachgefüllt; dann wird mit 30 ccm Dümlerscher Alaunkarminlösung die Lösung auf 100 ergänzt, sie wird noch einmal zur besseren Vermischung einige Minuten auf dem Wasserbade

erwärmt und dann mittels eines kleinen Ballons, an dem ein Gummischlauch befestigt ist, in U-förmig gebogene Glaskapillaren eingesogen. Die von mir verwendeten Kapillaren sind $1\frac{1}{2}$ mm weit.*) Sie werden nach der Füllung in einem Becherglase zum Erstarren aufgestellt. In allen folgenden Versuchen sind die Kapillaren 48 Stunden nach ihrer Füllung verwendet worden.

Um konstante Werte für die verdauten Gelatinezyylinder zu erhalten und die an verschiedenen Tagen erhaltenen Ablesungen miteinander vergleichen zu können, ist konstante Temperatur, d. h. die Verwendung eines Gelatinebrutofens, in welchem die Verdauung vor sich geht, notwendig. In den folgenden Versuchen handelt es sich bloß um den Vergleich der Wirkung von Trypsinlösungen bei verschiedenen Zusätzen. Es wurden die zu vergleichenden Verdauungsproben in derselben Stunde hergestellt, in demselben Raume aufgestellt und alle nach der gleichen Stundenanzahl abgelesen. Da somit die miteinander zu vergleichenden Versuche bei gleicher Temperatur — welche im übrigen im Laboratorium an verschiedenen Tagen zwischen 17 und 21° schwankte — aufgestellt waren, so war bei diesen Versuchen die Verwendung eines Thermostaten überflüssig.

Die Trypsinlösungen und Verdünnungen wurden auf dieselbe Weise hergestellt, wie bei den Fibrinversuchen. Die Stammlösung wurde, gleich nachdem das Trypsin in 1% iger Sodalösung gelöst war, in fünf gleiche Teile zu je 50 ccm geteilt. Der erste Teil blieb als Kontrollösung; zu dem zweiten Teile wurden zirka 5 ccm Toluol, zum dritten 5 ccm Chloroform, zum vierten 1 g Fluornatrium, zum fünften eine größere Menge Thymolkrystalle zugesetzt. Die Lösungen wurden gut durchgeschüttelt, dann 48 Stunden bei Zimmertemperatur und im zerstreuten Tageslicht aufgestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden von jeder dieser Lösungen Verdünnungen auf $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ und $\frac{1}{16}$ der ursprünglichen Konzentration mit Hilfe von 1% iger Sodalösung gemacht, diese Verdünnungen in Glasdosen eingefüllt und in jede Glasdose ein zirka 2 cm langes Stück der Gelatinekapillaren eingelegt. Die Ablesungen wurden nach

*) Aus dünneren Kapillaren fließt die verdaute Gelatine nicht aus.

der bei den einzelnen Versuchen angegebenen Zeit mit Hilfe einer Lupe oder des 4. Obj. des Mikroskopes auf einem Objektträger gemacht, an welchem 1 cm in 50 gleiche Teile geteilt ist. Die Einheit der Ablesungsziffern ist demnach $\frac{1}{50}$ mm; die beiden in den folgenden Tabellen nebeneinander stehenden Ziffern zeigen die Länge der verdauten Gelatinesäule, von jedem der beiden Enden der Kapillare an gerechnet, die dritte unterstrichene Ziffer gibt den Mittelwert in Millimetern.

A. Wirkung von Toluol, Chloroform, Fluornatrium und Thymol auf 0,8%ige Trypsinlösung.

Die Stammlösung wurde durch Auflösen von 2 g Trypsin in 250 g in 1%iger Sodalösung hergestellt. Die Verdünnungen sind 0,4, 0,2, 0,1 und 0,05%ig.

Ablesung nach 24 Stunden:

Trypsinlösung			Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung							
A.	36	35	<u>7,1</u>	F.	—	—	—	L.	25 ?	<u>5 ?</u>	Q.	—	—	—	V.	—	—	—	
B.	30	29	<u>5,9</u>	G.	28	28	<u>5,6</u>	M.	32	(37)	<u>6,4</u>	R.	31	30 $\frac{1}{2}$	<u>6,1</u>	W.	32	30	<u>6,2</u>
C.	24	23	<u>4,7</u>	H.	24	24 $\frac{1}{2}$	<u>4,8</u>	N.	(30 $\frac{1}{2}$)	24	<u>4,8</u>	S.	22 $\frac{1}{2}$	23	<u>4,6</u>	X.	21 $\frac{1}{2}$	21 $\frac{1}{2}$	<u>4,3</u>
D.	18	18	<u>3,6</u>	J.	17	17	<u>3,4</u>	O.	19 $\frac{1}{2}$	20	<u>4</u>	T.	17	18	<u>3,5</u>	Y.	17 $\frac{1}{2}$	17 $\frac{1}{2}$	<u>3,5</u>
E.	12	12	<u>2,4</u>	K.	11	11 $\frac{1}{2}$	<u>2,2</u>	P.	11 $\frac{1}{2}$	11 $\frac{1}{2}$	<u>2,3</u>	U.	14	13	<u>2,7</u>	Z.	13	12	<u>2,5</u>

Ablesung nach 49 Stunden:

Trypsinlösung			Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung							
A.	ganz verdaut			F.	—	—	—	L.	ganz verdaut			Q.	—	—	—	V.	—	—	—
B.	ganz verdaut			G.	ganz verdaut			M.	ganz verdaut			R.	ganz verdaut			W.	ganz verdaut		
C.	49	48	<u>9,7</u>	H.	ganz verd. *)			N.	ganz verdaut			S.	48	46	<u>9,4</u>	X.	40	40	<u>8</u>
D.	39	39	<u>7,8</u>	J.	36	37	<u>7,3</u>	O.	43	42 $\frac{1}{2}$	<u>8,5</u>	T.	34	35	<u>6,9</u>	Y.	38	39	<u>7,7</u>
E.	28	27 $\frac{1}{2}$	<u>5,6</u>	K.	26	26	<u>5,2</u>	P.	25	26	<u>5,1</u>	U.	25 $\frac{1}{2}$	26 $\frac{1}{2}$	<u>5,2</u>	Z.	26	26	<u>5,2</u>

*) Kurzes Röhrchen.

In diesen Tabellen fällt zunächst das Ausbleiben der Verdauung in den Röhrchen der Dosen F, Q und V, sowie die geringe Verdauung des Gelatineröhrchens der Dose L auf. Da die Verdünnungen der in diesen Dosen enthaltenen 0,8^o/igen Trypsinlösung eine verdauende Kraft zeigen, die der entsprechenden Verdünnung der Lösung A nicht nachstehen, so kann der Grund für das Fehlen der Verdauung in den Dosen der ersten Horizontalreihe nur darin gesucht werden, daß beim Übergießen der mit Toluol, Chloroform u. s. w. versetzten Lösungen, diese Substanzen zum Teil mit in die Dosen entleert worden waren. Die Lösungen waren vor dem Übergießen geschüttelt worden, sodaß die Anwesenheit der Antiseptica in den Dosen F, L, Q, V unvermeidlich war. Die Verdünnungen dieser Lösungen enthalten diese Antiseptica in entsprechend verdünntem Maße, sodaß die direkte Schädigung der Verdauung in den folgenden Dosen nicht zum Ausdrucke kommt.

Von der ersten Horizontalreihe nach abwärts sind dann die Verdauungswerte der Verdünnungen in den einander entsprechenden Dosen die gleichen. Eine Schädigung der gelatineverdauenden Kraft einer 0,8^o/igen Trypsinlösung ist trotz 48 stündiger Einwirkung der verwendeten Protoplasmagifte nicht nachzuweisen.

B. Wirkung von Toluol, Chloroform, Fluornatrium und Thymol auf 0,2^o/ige Trypsinlösung.

Wie im vorigen Versuche wurde auch diesmal die Trypsinlösung in 5 Teile geteilt; 4 Portionen wurden mit je einem der zu untersuchenden Antiseptica versetzt und durchgeschüttelt. Nach genau 48 Stunden wurden die Verdünnungen aufgestellt, diesmal aber vorher nicht durchgeschüttelt und das Übertragen der zugesetzten Substanzen in die Lösungen vorsichtig, bei der Thymollösung z. B. durch Filtrieren durch Watte, vermieden. Die folgenden Tabellen geben die Ziffern der Ablesung.

a) Nach 18 Stunden:

Trypsinlösung			Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung							
A.	23	24	4,7	F.	24	23 $\frac{1}{2}$	4,7	L.	21	23	4,4	Q.	20	24	4,4	V.	19	20	3,9
B.	17	18	3,5	G.	17	17	3,4	M.	16	17	3,3	R.	17 $\frac{1}{2}$	18	3,6	W.	16 $\frac{1}{2}$	16	3,2
C.	13 $\frac{1}{2}$	13	2,6	H.	12	12 $\frac{1}{2}$	2,5	N.	11 $\frac{1}{2}$	12	2,4	S.	12	12	2,3	X.	11 $\frac{1}{2}$	11	2,2
D.	8	7	1,5	J.	8	8 $\frac{1}{2}$	1,6	O.	7 $\frac{1}{2}$	7 $\frac{1}{2}$	1,5	T.	7	7 $\frac{1}{2}$	1,4	Y.	6 $\frac{1}{2}$	6 $\frac{1}{2}$	1,3
E.	—	—	—	K.	3?	3?	0,6	P.	3	3	0,6	U.	4	3	0,7	Z.	3	2	0,5

b) Nach 44 Stunden:

Trypsinlösung			Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung							
A.	49	51	10	F.	55	55	11	L.	53	52	10,5	Q.	50	50	10	V.	46	47	9,3
B.	44	42	8	G.	43	45	8,8	M.	40	41	8,1	R.	42 $\frac{1}{2}$	43	8,5	W.	39	39	7,8
C.	33	32 $\frac{1}{2}$	6,6	H.	31 $\frac{1}{2}$	31 $\frac{1}{2}$	6,3	N.	30 $\frac{1}{2}$	30 $\frac{1}{2}$	6,1	S.	31	29 $\frac{1}{2}$	6,1	X.	28 $\frac{1}{2}$	29	5,8
D.	21 $\frac{1}{2}$	22	4,4	J.	23 $\frac{1}{2}$	23 $\frac{1}{2}$	4,7	O.	21	21 $\frac{1}{2}$	4,3	T.	23	23 $\frac{1}{2}$	4,6	Y.	19	19	3,8
E.	—	—	—	K.	13 $\frac{1}{2}$	13	2,5	P.	13	13	2,6	U.	15	15	3	Z.	11	10	2,1

c) Nach 68 Stunden.

Trypsinlösung			Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung							
A.	ganz verdaut			F.	ganz verdaut			L.	ganz verdaut			Q.	ganz verdaut			V.	ganz verdaut		
B.	ganz verdaut			G.	ganz verdaut			M.	ganz verdaut			R.	ganz verdaut			W.	ganz verdaut		
C.	ganz verdaut			H.	ganz verdaut			N.	ganz verdaut			S.	ganz verdaut			X.	ganz verdaut		
D.	37 $\frac{1}{2}$	37	7,5	J.	38	38	7,6	O.	35	34 $\frac{1}{2}$	7	T.)*	ganz verdaut			Y.	31	31	6,2
E.	—	—	—	K.	26	26	5,2	P.	24	24 $\frac{1}{2}$	4,8	U.	28 $\frac{1}{2}$	28	5	Z.	19 $\frac{1}{2}$	19	3,8

*) Kurzes Röhrchen.

Aus diesen Ablesungen ist bereits deutlich ein Zurückbleiben der Verdauung in den Verdünnungen der mit Thymol versetzten Trypsinlösung ersichtlich. Eine schädliche Einwirkung von Chloroform, Toluol und Fluornatrium auf 0,2%ige Trypsinlösung findet nicht statt.

C. Wirkung von Toluol, Chloroform, Fluornatrium und Thymol auf 0,05%ige Trypsinlösung.

Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie bei den Versuchen der Gruppe B. Die Stammlösung ist 0,05%ig; es wurden diesmal nur 4 Verdünnungen gemacht; die Lösungen der Dosen D, J, O, T, Y enthalten 0,006% Trypsin. Die Ablesungen wurden gemacht:

a) Nach 30 Stunden:

Trypsinlösung	Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung		
A. 38½ 38 7,6	F. 39 30½ 6	L. 31 28½ 5,8	Q. 19 19 3,8	V. 29 31 6								
B. 31 29 6	G. 23 22 4,5	M. 24 26 5	R. 21 (27) 4,2	W. 21 23 4,4								
C. 20 18 3,8	H. 18 18 3,6	N. 12 14 2,6	S. 15 17 3,2	X. 15½ 14 3								
D. 11 11 2,2	J. 9 7 1,6	O. 10 8 1,6	T. 11 10 2,1	Y. 9 11 2								

b) Nach 44 Stunden:

Trypsinlösung	Trypsin-Toluol- lösung			Trypsin-Fluor- natriumlösung			Trypsin-Chloro- formlösung			Trypsin-Thymol- lösung		
A. ganz verdaut	F. 46 46½ 9,3	L. 49 46 9,5	Q. 30 29 5,9	V. 49 49 9,8								
B. 44 45½ 9	G. 36 36 7,2	M. 38 41½ 7,8	R. 37½ (44) 7,5	W. 36 34 7								
C. 29 30 5,9	H. 27½ 27 5,5	N. 22 24 4,6	S. 27 29 5,6	X. 24 24 4,8								
D. 17½ 19 3,7	J. 13 16½ 3	O. 18 15½ 3,4	T. 20 20 4	X. 19 16½ 3,4								

Diese beiden Tabellen zeigen, daß eine 0,05%ige Trypsinlösung durch 48stündige Einwirkung der Zusätze deutlich geschädigt wird, am meisten durch die Einwirkung von Thymol.

III. Versuche über die Einwirkung der Antiseptica auf Bakterienkulturen.

Bevor ich zu den Schlüssen übergehe, welche aus dem Vergleich der Gelatine- und Fibrinversuche hervorgehen, möchte ich in Kürze die Resultate einiger Versuche, welche ich zum Studium der Einwirkung der Antiseptica auf ein Bakterien-gemenge, wie es z. B. der Stuhl darstellt, angestellt habe, angeben. Von Leo werden bekanntlich zum Stuhl Chloroformwasser oder Thymolwasser zugesetzt, um den Einfluß der Darmbakterien bei der Verdauung der Fibrinflocken auszuschalten. Es schien mir wichtig, festzustellen, ob oder bei welchem Verdünnungs-grade die beiden zur Verwendung vorgeschlagenen Antiseptica, oder auch andere, welche in Betracht kommen könnten, ihren Zweck — die Abtötung der Bakterien — erreichen.

Es wurden zunächst mit dem Stuhl einer darmgesunden Patientin Agarplatten gegossen und von einer Platte — der dritten Verdünnung — wurde aus fünf verschiedenen aussehenden Kolonien auf Agar und Bouillon abgeimpft. Von den erhaltenen Kulturen waren 4 — nach ihrem kulturellen Verhalten — Kolistämme, die Kultur 5 scheint eine Subtilisart zu sein. Eine genauere Identifizierung wurde, da es nicht in meiner Absicht war, die Einwirkung von Antiseptics auf einzelne Bakterien-arten zu studieren, nicht vorgenommen. Das weitere Versuchsverfahren bestand darin, daß zu Mischungen der Bouillon-kulturen Toluol, Thymol, Fluornatrium oder Chloroform zu-gesetzt und diese Mischungen auf ein oder mehrere Tage in den Brutofen gegeben wurden. Nach dieser Zeit wurde auf schiefen Agar oder Bouillon abgeimpft. Die Resultate gehen aus folgendem hervor:

Bei den Toluolversuchen wurde die Mischung der fünf Bouillonkulturen teils mit 3 ccm Toluolwasser versetzt und durchgeschüttelt (A), teils wurde dieser Mischung noch 1 ccm Toluol überschichtet (B). Die Versuche wurden das erste Mal mit einer Mischung von 24 Stunden alten, das zweite Mal mit einer Mischung von 6 Tage alten Kulturen gemacht. Nach 24stündigem Stehen im Thermostaten (37°) wurde von A und B auf Bouillonröhrchen abgeimpft. In allen auf diese Art er-

haltenen Bouillonkulturen starke Trübung und reichliches Bakterienwachstum.

Bei den Fluornatriumversuchen wurden 15 ccm der Mischung der Bouillonkulturen durch Aufsaugen mit Hilfe einer sterilisierten Pipette zu gleichen Teilen in 3 sterile Eprouvetten gebracht. Zu der ersten Portion wurde hierauf 0,1 g, zur zweiten 0,15 g, zur dritten 0,2 g Fluornatrium zugesetzt, so daß die 3 Portionen einer 2^o/_o-, 3^o/_o-, 4^o/_oigen Fluornatriumlösung gleichkommen. (Das Fluornatrium löst sich schon in der 2^o/_oigen Lösung kaum, in der höheren liegt ein Sediment des Salzes auf dem Boden der Eprouvette.) Diese Mischungen (A, B, C) würden auf 24 Stunden in den Brutofen gestellt, danach auf die entsprechenden Agars A, B, C abgeimpft. Nach weiteren 24 Stunden sind die schiefen Agars mit einem dicken weißen Belag bedeckt. In einem zweiten Versuche wurden die Abimpfungen auf Agar erst 72 Stunden nach dem Zusatze des Fluornatriums zu den Mischungsbouillons vorgenommen. Das Resultat ist dasselbe.

Die Chloroformversuche wurden teils mit reinem Chloroform, teils mit Chloroformwasser gemacht, und dabei die aus den Stuhlplatten erhaltenen 5 Bakterienstämme (a, b, c, d, e) einzeln untersucht. Es wurden die einzelnen 2 Tage alten Bouillonkulturen in 2 Hälften geteilt und zu der einen Hälfte (a₁, b₁, c₁, d₁, e₁) die gleichen Teile Chloroformwasser, zu der zweiten Hälfte (a₂, b₂, c₂ etc.) einige Tropfen Chloroform gegeben, die 10 Eprouvetten wurden auf 24 Stunden in den Brutofen gestellt, danach auf 10 entsprechend bezeichnete schiefe Agars abgeimpft. Nach 24 Stunden waren nur die Agarröhrchen a₁, c₁, e₁ steril geblieben, die anderen 7 Röhrchen, darunter alle, welche von den mit Chloroformwasser beschickten Kulturen abstammten, waren mit einem dicken Rasen bedeckt.

In ähnlicher Art wurden Bouillonkulturen mit Thymolwasser versetzt, auf 24 Stunden in den Brutofen gegeben, dann auf schiefes Agar weitergezüchtet. Auch hier ging auf allen den 5 Agarröhrchen dichter Rasen auf.

Die mitgeteilten Versuche ergeben demnach folgendes:
Das Versetzen von Reinkulturen von Stuhlbakterien oder

das Versetzen einer Mischung dieser Bakterien mit Toluol, Chloroform, Thymol oder Fluornatrium genügt nicht, um die Bakterien innerhalb 24 Stunden*) abzutöten. Ob eine teilweise Abtötung und dadurch eine Verringerung der Keime stattfindet, läßt sich bei dieser Versuchsanwendung nicht entscheiden. Die Frage, ob diejenigen Bakterien, welchen die Fähigkeit, proteolytische Fermente zu bilden, zukommt, diese Fermente auch unter dem Einfluß der genannten Antiseptica zu produzieren imstande sind, wird durch den Ausfall dieser Versuche nicht tangiert.

IV.

Die Resultate der vorliegenden Versuche sind die folgenden:

1. Stärkere Trypsinlösungen — und zwar die Lösungen, welche stärker sind als eine 0,2^o/oige Lösung des Grüblerschen Trypsins — werden durch die 24stündige Einwirkung von Toluol, Chloroform, Thymol und Fluornatrium weder in ihrer fibrinverdauenden noch in ihrer gelatineverdauenden Wirkung irgendwie geschädigt.

2. Schwächere Trypsinlösungen werden durch den Zusatz der genannten Antiseptica in ihrer Wirkung auf Gelatine und Eiweiß geschädigt, je geringer die Konzentration ist, desto mehr.

3. Nach 24stündiger Einwirkung von Toluol, Fluornatrium, Chloroform oder Thymol ist der Nachweis der tryptischen Kraft einer 0,02^o/oigen Trypsinlösung mit Hilfe der Fibrinflocke nicht mehr möglich. Eine Verzögerung der Verdauung der Fibrinflocke ist nach 24stündiger Einwirkung von Toluol bei Prüfung einer 0,08^o/oigen Trypsinlösung, von Fluornatrium bei Prüfung einer 0,06^o/oigen, von Chloroform bei Prüfung einer 0,08^o/oigen, von Thymol bei Prüfung einer 0,1^o/oigen Grüblerschen Trypsinlösung nachweisbar.

4. Die Prüfung auf tryptisches Ferment mit Hilfe von Gelatine, welche in Mettsche Röhrchen eingefüllt ist, gibt noch bei einer Trypsinkonzentration von 0,005 g Grüblersches

*) In dem erwähnten Versuche mit Fluornatrium genügte auch eine 72stündige Mischung zur Abtötung der Bakterien nicht.

Trypsin in 100 ccm 1%iger Sodalösung deutlich ablesbare und zu quantitativen Vergleichen brauchbare Resultate.

5. Nach dieser Methode läßt sich ein geringer schädigender Einfluß von Thymol auf eine 0,2%ige Grüblersche Trypsinlösung, ein deutlicher schädigender Einfluß von Thymol, Chloroform, Fluornatrium und Toluol auf eine 0,05%ige Trypsinlösung — nach 24stündiger Einwirkung der Antiseptica — nachweisen.

6. Außerdem scheint die Anwesenheit der Antiseptica während der Verdauung der Gelatine ein schädigendes Moment zu sein.

7. Die genannten Antiseptica verhalten sich gegen Bakterien ähnlich wie gegen Fermente. Eine geringe Menge von Bakterien wird — nach Arbeiten anderer — durch die Einwirkung der Antiseptica abgetötet. Große Mengen von Bakterien, wie sie in Gemischen von Reinkulturen enthalten sind, werden von Antiseptics wohl geschädigt werden, aber durch 24stündige Einwirkung derselben nicht abgetötet.

Ein essentieller Unterschied zwischen fermentativer und bakterieller Spaltung läßt sich daher aus dem Verhalten von Fermenten und Bakterien gegenüber den Antiseptics nicht konstruieren.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Mauthner meinen besten Dank für seine Unterstützung und sein Interesse an dieser Arbeit auszusprechen.

Literatur.

1. Leo. Diagnostik der Bauchorgane.
2. Müntz. Sur les ferments chimiques et physiologiques (C. R. de l'Academie des sciences, Bd. 80, p. 1250).
3. Salkowski. Über die antiseptische Wirkung des Chloroformwassers. Deutsche mediz. Wochenschrift, 1888, Nr. 16.
4. Salkowski. Über Autodigestion der Organe. Zeitschrift für klin. Medizin, 1890, Festschrift.
5. Salkowski. Über die Einwirkung des Chloroforms auf gelöste Fermente. Fortschritte d. Med., 1891, Nr. 5.

6. Fokker. Über die Einwirkung des Chloroforms auf Protoplasma. Fortschritte d. Med., 1891, Nr. 3.
7. Freudenreich. Beiträge zur Kenntnis der Wirkung des Labfermentes. Zentralbl. f. Bakteriologie, II. Abteilung, Bd. 4, Nr. 8.
8. Pügliese. Über den Einfluß der Erwärmung auf diastatisches Ferment. Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 69, Nr. 3 u. 4.
9. Lintner u. Kröber. Zur Kenntnis der Hefeglykase. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 28, S. 1050.
10. Herissey. Action du chloroforme sur le maltase de l'Aspergillus niger. C. R. de la Société de biologie, 1896.
11. Treyer. De l'action de quelques substances antiseptiques sur les ferments solubles. Arch. de physiologie, 1898, p. 672.
12. Lewin. Das Thymol ein antiseptisches und antifermentatives Mittel. Zentralbl. f. d. med. Wissensch., 1875, Nr. 21.
13. Fermi u. Pernossi. Über die Enzyme. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 18.
14. Fermi. Die leim- und fibrinlösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene, Bd. 10.
15. Fermi. Die Leimgelatine als Reagens zum Nachweis tryptischer Enzyme. Arch. f. Hygiene, Bd. 12.
16. Fermi. Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. Arch. f. Hygiene, Bd. 14.
17. Schlesinger. Zur Kenntnis der diastatischen Wirkung des Speichels. Virchows Archiv, Bd. 125, S. 177, 340.
18. Tappeiner. Zweite Mitteilung über die Wirkung des Fluornatriums. Arch. f. exper. Pathologie, Bd. 27, S. 108.
19. Arthus u. Huber. Fermentations vitales et chimiques. C. R. de l'Academie des sciences, Bd. 115.
20. Pavy. On hepatic glycogenesis. Journal of physiol., Bd. 22, p. 391.
21. E. Fischer. Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 2985, 3479.
22. E. Fischer. Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie. Bd. 26, S. 75.
23. Pawloff. Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden, 1898, S. 32.