

# Der baktericide Wert des Thymols.

Von

Ernst Willy Schmidt.

(Aus der chemischen Abteilung des physiolog. Instituts in Jena.)

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juni 1910.)

Fibrinverdauungsversuche, die ich mit Trypsin und Papayotin angesetzt hatte, nahmen des öfteren einen anormalen Verlauf, trotzdem dem Verdauungsgemische reichliche Mengen pulverisierten Thymols als Desinficiens beigegeben waren. Einmal aufmerksam geworden, wurden von mir nicht nur die Verdauungsgemische, die schon rein äußerlich durch ihren heftigen Fäulnisgeruch auf eine Verunreinigung durch Bakterien hinwiesen, einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen, sondern auch der Inhalt der Versuchsgefäße auf Bakterien geprüft, der seinem Aussehen und chemischen Verhalten nach scheinbar steril geblieben war. Es stellte sich dann heraus, daß in allen Verdauungsgemischen mit Thymol, die schwach alkalische Reaktion zeigten, lebende Bakterien in wechselnder Anzahl vorhanden waren. Die darauf eingeleiteten Untersuchungen über den baktericiden Wert des Thymols, mit besonderer Berücksichtigung seiner Bedeutung als Desinficiens bei enzymologischen Arbeiten, führten zu dem überraschenden Resultate, daß das Thymol als ein vollkommen unzureichendes Desinficiens zu bezeichnen ist. Die im Verlauf dieser Arbeit mitgeteilten Tatsachen sollen die experimentelle Grundlage für obige Behauptung erbringen.

Das Thymol wurde 1875 von Lewin<sup>1)</sup> als «ein antiseptisches und antifermentatives Mittel» eingeführt. Dieser ersten Mitteilung folgte die eigentliche experimentelle Begründung:<sup>2)</sup> «Das Thymol ein Antisepticum und Antifermentativum.» Von dieser Zeit an erfreute sich das Thymol wachsender

<sup>1)</sup> Lewin, Zentralblatt f. die med. Wissenschaften 1875, S. 324.

<sup>2)</sup> Lewin, Virchows Archiv 1875, Bd. 65, S. 164.

Beliebtheit, seiner bequemen Verwendungsart wegen und seiner Vorzüge halber gegenüber dem Chloroform und dem Phenol, die neben dem Toluol und dem Fluornatrium wohl die gängigsten Antiseptica bei biochemischen Arbeiten vorstellen.<sup>1)</sup> Wenn man beginnt, in neuester Zeit die Anwendung des Thymols etwas einzuschränken, so hat das darin seinen Grund, daß nach einigen Angaben<sup>2)</sup> das Thymol die Fermente in ihrer physiologischen Wertigkeit etwas herabsetzt, die Intensität ihrer Wirkungsweise abgeschwächt wird.

Die Art der Verwendung des Thymols<sup>3)</sup> zur Ausschaltung der Zelltätigkeit ist nach den verschiedensten Angaben in Lehr- und Handbüchern<sup>4)</sup> immer die gleich einfache: «Die Krystalle

<sup>1)</sup> A. J. J. Vandeveld (Antiseptica bei Enzymuntersuchungen, Biochem. Zeitschr., 1907, Bd. III, S. 315) empfiehlt an Stelle der oben genannten Gifte eine Auflösung von 0.4 g Jodoform in Keton.

<sup>2)</sup> Kaufmann, Einfluß von Protoplasmagiften auf die Trypsinverdauung (Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 434).

Oppenheimer, Die Fermente, 1910, Spezieller Teil, S. 197.

Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, 1909, II. Teil, S. 78.

<sup>3)</sup> Es handelt sich hier immer um wässrige Thymollösungen. Die sehr befriedigend ausgefallenen Versuche, die desinfizierende Kraft des Thymols durch Aufschließen mittels Seifen zu erhöhen und so wässrige Lösungen in beliebig konzentrierter Form zu erhalten, tangieren den Zweck dieser Arbeit nicht und kann deshalb hier nur darauf verwiesen werden. Es sei nur kurz erwähnt, daß es Laubenheimer gelang, mit wässrigen Lösungen zu arbeiten, die einen Gehalt von 1% Thymol aufwiesen. Als Lösungsmittel diente sulfuricinsäures Natrium bzw. dioxystearinsäures Kalium (Kurt Laubenheimer, Phenol und seine Derivate als Desinfektionsmittel. Habilitationsschrift, Gießen 1909, S. 98). Während das Thymol nur in einem Verhältnis von 1 : 1200 bei 15°C. Wasser löslich ist, 1 : 900 heiß gesättigt. (Beilstein, Handb. d. organ. Chemie, 1896, Bd. II, S. 796.)

<sup>4)</sup> Lafar, Handbuch der techn. Mykologie, 1904—07, Bd. I, S. 544.

Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 1907, S. 392.

Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme, 1907, S. 20, 23, 25, 28, 30, 33 usw.

Tigerstedt, Handbuch der physiolog. Methodik, 1908, Bd. II, S. 58.

Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 1910, Bd. III, 1. Hälfte, S. 14, 190.

Kunkel, Handbuch der Toxikologie, 1901, S. 538.

werden in kleinen Stückchen oder pulverisiert in willkürlichen Mengen in die zu desinfizierende Flüssigkeit eingetragen. Manche Autoren verfahren genauer, indem die Verdauungsflüssigkeit oder das Nährsubstrat mit Thymol heiß gesättigt und vom ungelösten Rückstand abfiltriert wird. So basieren die Methoden zum Nachweise proteolytischer Enzyme von Fermi<sup>1)</sup> und Schouten<sup>2)</sup> auf der Sättigung von Gelatine mit Thymol. Außerdem wird Thymol noch in alkoholischer Lösung angewandt. Bei dieser Anwendungsweise ist neben der Wirkung des Thymols auch die baktericide und fermentschädigende Wirkung des Alkohols zu berücksichtigen.

Neben der grundlegenden Lewinschen Arbeit, auf die weiter unten näher eingegangen werden soll, finden sich zerstreut in der Literatur noch einige experimentelle Daten, die auf die Wirkung dieses Giftes Bakterien und Hefen gegenüber Bezug haben. Koch<sup>3)</sup> gibt an, daß Thymol noch in einer Verdünnung von 1:80000 das Wachstum der Milzbrandbazillen behindere. Nach E. Bernacki<sup>4)</sup> ist Thymol das stärkste Hefegift unter den von ihm geprüften Stoffen (Benzoessäure, Salicylsäure, Carbol, Resorcin, Pyrogallol, Chloralhydrat). Während die schwächste Gärung aufhebende Konzentration des Thymols 1:3000 sein soll, ist die des Chloralhydrates 1:25. Fischer<sup>5)</sup> führt aus, daß 0,3% Thymol<sup>6)</sup> in 3 Stunden sporenfreie Bakterienzellen töte.

<sup>1)</sup> Fermi, Weitere Untersuchungen über die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen. (Archiv f. Hygiene 1892, Bd. XIV; zitiert nach Fuhrmann, l. c., S. 125.

<sup>2)</sup> Schouten, Zittingsverlag koninkl. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, van 30. Mart 1900. Vgl. auch

F. A. F. Went, Über den Einfluß der Nahrung auf die Enzymbildung usw. (Jahrb. f. w. Bot., 1901, Bd. XXXVI, S. 656).

<sup>3)</sup> R. Koch, Mitteilungen aus dem kaiserl. Gesundheitsamte, 1881, Bd. I, S. 271.

<sup>4)</sup> E. Bernacki, Über die Eigenschaften der Antiseptica usw. (Arch. f. d. ges. Phys., 1891, S. 128); vgl. aber dazu Ducleaux, Traité de Microbiologie, 1900, Tome III, S. 504—507.

<sup>5)</sup> A. Fischer, Vorlesungen über Bakterien, 1903, S. 119.

<sup>6)</sup> Wahrscheinlich wohl 0,3% in Form einer alkoholischen Thymolösung, da Thymol in H<sub>2</sub>O nur 1:1200 löslich ist. (Beilstein, l. c.)

Diese Angaben haben zu der scheinbar berechtigten Meinung geführt, das Thymol sei ein absolut sicheres Desinficiens. Dagegen sind nur vereinzelt, und meist anhangsweise erwähnt, Beobachtungen bekannt geworden, die zu einer gegenteiligen Ansicht hätten führen müssen, Tatsachen, die aber anscheinend keine weitere Beachtung gefunden haben. So die Angaben bei Kaufmann, Vandevælde und Straßburger.

Vandevælde<sup>1)</sup> setzte zu 25 ccm Milch 0.1 g Thymol in Pulverform, die Milch war nach sechs Tagen mit Bakterien infiziert. Straßburger<sup>2)</sup> versuchte Thymol zur Darminfektion beim Menschen zu benutzen, die Bakterienmengen in Faeces blieben jedoch unbeeinflusst. Kaufmann<sup>3)</sup> bemerkt, daß größere Mengen von Bakterien (in seinem Falle Bakterien aus dem Stuhl einer darmgesunden Patientin) durch Thymol (und auch Chloroform, Toluol und Fluornatrium!) wohl geschädigt, aber binnen 24 Stunden nicht abgetötet waren. Kaufmann versetzte Bouillionkulturen mit Thymolwasser, brachte die Eprouvetten auf 24 Stunden in den Brutschrank und impfte nach dieser Zeit auf Agar über, auf dem dann bald ein lebhaftes Wachstum der Bakterien vor sich ging. Die Bakterien waren demnach am Leben geblieben während der 24stündigen Einwirkung des Thymols; sie schienen nur gehemmt, da sie auf dem Nähragar, dem das Gift fehlte, sogleich anfangen zu wachsen.

Nach meinen später mitzuteilenden Versuchen muß ich diesen Befund dahin erklären, daß die Hemmung nur eine scheinbare war. Wäre einerseits dem Nähragar Thymol zugesetzt worden, andererseits der Versuch mit den Bouillionthymolwasserkulturen auf etwas längere Zeit ausgedehnt worden, so hätte sich nicht das Scheinresultat einer deutlichen Hemmung der Bakterien durch Thymolwasserzusatz ergeben.

Wenn nun das Thymol auch keinen Tötungswert für sporenfreie Bakterien besitzen sollte, so bliebe es, falls ihm ein ausgesprochener Hemmungswert tatsächlich zukäme, dennoch recht brauchbar.

Aber schon aus der oben zitierten Vandevældeschen Notiz (Wachstum von Bakterien in mit Thymol desinfizierter Milch nach 6 Tagen) geht hervor, daß zum mindesten von einer dauernden Hemmung nicht zu sprechen ist.

<sup>1)</sup> Vandevælde, I. c., S. 318.

<sup>2)</sup> Straßburger, zitiert nach Gehrhardt, Die Darmfäulnis (Ergebn. der Physiolog., 1904, Bd. III, I. Abt., S. 153.)

<sup>3)</sup> Kaufmann, I. c., S. 453.

Nunmehr müssen aber zunächst die Lewinschen Fäulnisversuche diskutiert werden, die so bedeutsam geworden sind für die Auffassung des Thymols als antiseptisches Mittel. Im Anschluß daran werden dann die eigenen Untersuchungen ihre Darstellung finden.

Lewins Arbeit gliedert sich in die «Versuche über den Einfluß des Thymols auf die Gährung», «über den Einfluß des Thymols auf die Fäulnis» und «über die Wirkung des Thymols auf den Tierkörper». Hier interessieren nur die Resultate aus den Versuchen über den Einfluß des Thymols auf die Fäulnis. Die Versuchsanordnung war folgende: je 20 ccm mit Wasser ausgefallten filtrierten Hühnereiweißes wurden versetzt mit A (20 ccm  $H_2O$ ) bzw. B (20 ccm Thymollösung (1 : 1000)). Die Flüssigkeit in B erwies sich noch nach 10 Wochen langem Stehen in offenen Gefäßen als klar und roch nach Thymol, während dagegen in A «der ganze Inhalt des Glases in eine dickflüssige furchtbar stinkende Masse verwandelt war, die dasselbe mikroskopische Bild (Bakterien) wie am 8. Tage lieferte». In weiteren Versuchen wurde dieselbe Anordnung gewählt, nur anstatt 20 ccm 60 ccm Hühnereiweiß. Schon nach 7 Tagen war die thymolfreie Lösung gefault, während wiederum in der mit Thymol versetzten Eiweißlösung erst nach 7 Wochen zahlreiche Bakterien nachgewiesen werden konnten.

Dann wurde der Dotter von je einem Ei in zwei offene Schalen gegossen und A 50 ccm  $H_2O$ , B 50 ccm Thymollösung hinzugefügt. Während nach 9 Tagen der Inhalt der Schale A eingetrocknet ist und einen widerlichen Geruch verbreitet, läßt die Thymollösung, ohne Fäulnisgeruch zu zeigen, viele Bakterien erkennen; äußerlich ist weiter keine Veränderung vor sich gegangen. Der Thymolgeruch ist nach 13 Tagen verschwunden. — Es folgen noch weitere Versuche, die alle im Prinzip das Gleiche aussagen: Die Thymollösung erwies sich in allen Fällen als ein außerordentlich intensiv wirkendes Hemmnis für das Aufkommen von Bakterien. Am auffälligsten erscheint das Verhalten der Bakterien in den Eiweißlösungen. (Lewin experimentierte weiterhin noch mit putridem Eiter, Harn, Leim usw.)

Wie war es nun möglich, daß in den Lewinschen Versuchen das Eiweiß bei dem Thymolzusatz so schwer faulte, während in meinen eingangs erwähnten Kulturen mit Fibrin, also auch einem nativen Eiweißkörper, bei Anwesenheit von Thymol die Fäulnis so schnell von statten ging? Bakterien waren auch in den Lewinschen Gefäßen genügend vorhanden, aber erst nach Wochen trat eine langsame Entwicklung ein. Dieser positive Ausfall der Versuche Lewins — positiv im Sinne einer bakterienhemmenden Wertigkeit des Thymols — dürfte vor allem darin liegen, daß die Versuche bei Zimmertemperatur angestellt zu sein scheinen. (L. macht keine Angaben darüber.) In mehr optimaler Temperatur (ca. 25—30° C. für die meisten Fäulnisbakterien) wären gewißlich die Ergebnisse etwas andere gewesen. Dann aber dürfte in der Verwendung von nativem Eiweiß, wie es in dem benutzten Ovalbumin vorlag, ein weiterer Grund zu suchen sein für die scheinbar fäulnishemmende Wirkung des Thymols (besonders bei Temperaturen von 15—18° C.). Da Hühnereiweiß schwer angreifbar ist für Bakterien, wird eine Schwächung der Virulenz der Bakterien sich natürlich dem Hühnereiweiß gegenüber besonders stark geltend machen. Das Hühnereiweiß wird durch die Bakterien erst dadurch eine gut ausnutzbare Nährquelle, daß absterbende Bakterien ihre Endoenzyme abgeben und das native Eiweiß zu leicht verwertbaren Albumosen und Peptonen machen. Wird von vornherein durch Zusatz von Pepton für günstige Ernährungsverhältnisse der Bakterien gesorgt, so wird auch trotz Thymolzusatz das Hühnereiweiß angegriffen.

Die in Tabelle Ia und Ib zusammengestellten Versuche erläutern das Gesagte.

Es wurde demnach das Eiweiß trotz Sättigung mit Thymolwasser bei Peptonzusatz in allen Fällen angegriffen, leichter, wenn mit der Erde oder den Erbsen eine Menge Bakterienkeime in die Flüssigkeit eingebracht wurden, etwas langsamer, wenn nur Luftinfektion und Verunreinigung durch die nicht sterilen Kulturgefäße, Flüssigkeiten usw. in Betracht kamen. Aber auch sämtliche Zylinderinhalte in den verschiedensten Modifikationen ohne Thymol faulten keineswegs schneller, sondern

## Tabelle Ia.

20 ccm Hühnereiweiß + 50 ccm gesättigten Thymolwassers.  
(Dauer des Versuches 48 Stunden.)

Art der Zusätze	Laboratoriums- temperatur: tags 16° C., nachts 10–12° C.	Brutschrank. konstant 25° C.
Je 2 Zylinder mit Erde, ohne Pepton	keine Veränderung	nach 24 Stunden noch voll- kommen klar, nach 48 Stun- den besonders im Erbsen- zylinder schwache Trübung
Je 2 Zylinder mit Erbsen, ohne Pepton		
Je 2 Zylinder mit Erde, mit Pepton	leicht getrübt, keine Kahlhaut	nach 24 Stunden schon Trü- bung, besonders im Erbsen- zylinder, obwohl Thymol- geruch noch vorherrscht, teilweise Fäulnisgeruch. Nach 48 Stunden starke Kahlhaut in allen Zylind- ern, Erbsenzylinder zeig- ten typischen Fäulnisgeruch
Je 2 Zylinder mit Erbsen, mit Pepton	getrübt, keine Kahlhaut	
Je 1 Zylinder, unge- impft, ohne Pepton	keine Veränderung	klar
Je 1 Zylinder, unge- impft, mit Pepton		
		getrübt, Kahlhaut, Geruch nach Thymol

## Tabelle Ib.

Dasselbe, ohne Thymolzusatz.

Je 2 Zylinder mit Erde, ohne Pepton	keine Veränderung	schwache Trübung, doch kein Fäulnisgeruch
Je 2 Zylinder mit Erbsen, ohne Pepton		
Je 2 Zylinder mit Erde, mit Pepton	von den thymol- haltigen Gefäßen nicht zu unter- scheiden	Fäulnis, besonders in den Erbsengefäßen
Je 2 Zylinder mit Erbsen, mit Pepton		
Je 1 Zylinder, unge- impft, ohne Pepton	keine Veränderung	keine Veränderung
Je 1 Zylinder, unge- impft, mit Pepton		
		trübe, leichter Fäulnis- geruch, Kahlhaut

waren, wären sie nicht etikettiert gewesen, von den thymolhaltigen Gefäßen (die sich allerdings durch ihren Geruch noch kennzeichneten) nicht zu unterscheiden. Nach einer Woche wurden die im Brutschrank stehenden Kulturen wegen ihres intensiven Fäulnisgeruches entfernt, während die im relativ kalten Laboratoriumsraum aufbewahrten Gefäße wenig Fortschritte in der Fäulnis gemacht hatten; immerhin wiesen jedoch die mit Pepton beschickten Gläser (mit und ohne Thymolzusatz) nunmehr Fäulnisgeruch auf, während in den anderen Gefäßen, obwohl überall Bakterien vorhanden waren, der Thymolgeruch vorherrschte. Das Hühnereiweiß in  $H_2O$  ohne jeglichen Zusatz (kein Thymol, keine Erde oder Erbsen, kein Pepton) war wie das Hühnereiweiß mit Thymolwasser (keine Erde oder Erbsen, kein Pepton) schließlich am wenigsten verändert.

Durch diese Versuche wird auch der scheinbare Widerspruch zwischen den Befunden Lewins und meinen Befunden aufgeklärt. Thymol wirkt nur dann ausgesprochen hemmend auf die Entwicklung von Bakterien, wenn diese schlecht ernährt sind. Die nativen Eiweißkörper sind keine günstigen Nährböden für Bakterien. Wird durch gleichzeitig vorhandene Verdauungsfermente eine Umwandlung der nativen Eiweißstoffe in Albumosen usw. herbeigeführt, so entsteht ein guter Nährboden und die hemmende Wirkung des Thymols kommt nicht mehr zur Geltung.

Nachdem so im allgemeinen festgestellt war, daß bei günstigen Ernährungsbedingungen dem Thymol keine stärkere bakterienhemmende Wirkung zukommt, wurde das Verhalten der Bakterien gegenüber Thymol genauer studiert. Zunächst wurden die dem Fibrin anhaftenden Bakterien untersucht. Das verwandte Fibrin war in der üblichen Weise unter Glycerin aufbewahrt. Die einzelnen zur Verwendung gelangenden Flocken wurden jedesmal gründlich ausgewaschen, um das Glycerin wieder zu entfernen. Das Fibrin als solches war steril; auch der Aufenthalt in Glycerin vermochte, wie ja bekannt, anhaftende Bakterien nicht abzutöten. Fibrin, das durch mäßiges Auspressen unter aseptischen Kautelen vom überschüssigen Glycerin befreit, in steriles Verdauungsalkali eingebracht wurde,

war nach 24 Stunden bei 30° C. regelmäßig gelöst. Je älter das Fibrin, d. h. je länger es in Glycerin gelegen hatte, je schneller ging der Auflösungsprozeß vor sich. Die mikroskopische Kontrolle ergab reichliche Bakterienanwesenheit. Nach 48 Stunden war meistens Fäulnis eingetreten. Dieses also schon von Bakterien infizierte Fibrin ward nun in Erlenmeyer-Kolben mit schwacher Verdauungssalzsäure (0,2% HCl) und schwachem Verdauungsalkali (0,15% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) gebracht; die Kolben erhielten einen großen Überschuß von Thymol in Krystallform. (Tabelle II.)

Tabelle II.

Zusatz	Fibrin aus Glycerin	Nach 24 Stunden bei 25° C.
0,5% Thymol	salzsauer	Fibrin stark gequollen, doch keine Verdauung
	alkalisch	Fibrin gelöst, intensive Biuretreaktion, Kahmhaut
1% Thymol	salzsauer	dasselbe wie bei 0,5% Thymol
	alkalisch	» » » 0,5% »

Lebende Bakterien waren auch in den sauer reagierenden Flüssigkeiten nachzuweisen, doch schien hier die schwache Säure schon zur Hemmung auszureichen.

Der gleiche Versuch wurde wiederholt mit ganz frischem Fibrin (das vorher benutzte hatte etwa 4 Wochen in Glycerin gelegen): auch wurde die Verdauungsflüssigkeit mit Thymol gesättigt, anstatt Beigabe von Krystallen. In diesem Versuche dauerte die Lösung der Fibrinflocke bei alkalischer Reaktion etwas länger. Immerhin war nach 36 Stunden Aufenthalt im Brutschrank das Fibrin ebenfalls gelöst, die Flüssigkeit in einigen Kölbchen schmutzig grün gefärbt. In schwach salzsaurer Lösung blieb das Fibrin, abgesehen von der stets eintretenden Quellung, unverändert. Die mikroskopische Untersuchung ließ mindestens zwei verschiedene Bakterienarten deutlich erkennen. Auch in diesem Falle also hinderte das Thymol keineswegs die Entwicklung der Bakterien.

Des weiteren geht aus diesem Versuche hervor, daß längere Zeit in Glycerin aufbewahrtes Fibrin den Bakterien leichter zugänglich ist, da anscheinend das Fibrin in dem Glycerin einem langsamen bakteriellen Spaltungsprozeß unterworfen ist, sodaß Spuren von Peptonen und Albumosen zur Vorernährung der Bakterien in den Verdauungsgemischen wohl schon vorhanden sind. Daß auch ganz frisches Fibrin aus Glycerin ebenfalls angegriffen wird, steht in nur scheinbarem Gegensatz zu dem früher anlässlich der Hühnereiweißversuche Ausgeführten. Denn es haftet, trotz sorgfältigen Wässerns, dem Fibrin immer noch etwas Glycerin an, das für die meisten Bakterien großen Nährwert besitzt.

Zur selben Zeit unternommene Verdauungsversuche mit Papayotin, die mit dem gleichen frischen Fibrin angestellt worden waren, ergaben trotz des Thymolzusatzes in der alkalisch gehaltenen Reihe lebhaftes Bakterienwachstum.

In einigen Kölbchen war die Spaltung des Fibrins bis zur Indol- und Skatolbildung vorgeschritten, wie an dem äußerst intensiven Fäulnisgeruch schon ersichtlich war. Auch hier nahm der Inhalt einiger Kölbchen eine grünliche Färbung an; in anderen Gefäßen wurde die Flüssigkeit mehr rostrot. Die Bakterienentwicklung war eine außerordentlich starke; in einem Kolben entstand eine dicke schmutzigweiße Kahlhaut, gebildet von einem großen, stäbchenförmigen Bakterium. Die Nitrosoindolreaktion war in den schon durch ihren Geruch gekennzeichneten Kolben positiv.

Auf Grund dieser Tatsachen wurde zunächst erwogen, ob das Papayotin etwa die Bakterien vor dem Thymol schützt. Dieses ist jedoch keineswegs der Fall, wie der folgende Versuch besagt.

#### Fibrin in thymolgesättigtem Verdauungsalkali.

A. mit Papayotin	{ gleiches Resultat, in beiden starke Bakterienentwicklung, nur war bei A. das Fibrin natürlich schneller gelöst.
B. ohne	

Ein Teil der Reihe A war nach 36 stündigem Aufenthalt im Brutschrank (25° C.) in ein fast schwarze Flüssigkeit verwandelt mit heftigem Fäulnisgeruch. Die Schnelligkeit der Fäulnis des Fibrins in gesättigter Thymollösung bei Anwesenheit von Papayotin erinnert an das Ergebnis des I. Versuches, wo das Pepton gewissermaßen als kräftige Vorernährung zum Angriff auf das Eiweiß diente. Die Stelle des Peptons vertritt in diesem Falle das durch das Ferment abgebaute Eiweiß.

Daß das Papayotin (Präparate von Merck, Schuchardt, König), wie auch andere Enzympräparate (Trypsin, Pankreatin, Pepsin) in  $H_2O$  gelöst ohne Zusatz irgend eines Nährstoffes, sehr wohl geeignet sind, lebhafte Bakterienentwicklung anzuregen, geht aus einem dieserhalb eingeleiteten Versuche hervor.

Tabelle III.

Einfluß von Bakterien auf Fermente in gesättigtem Thymolwasser nach 24 Stunden bei  $25^{\circ} C$ .

Art der Fermente	Geimpft mit <i>Bacillus fluorescens liq.</i> <sup>1)</sup>	Geimpft mit Erde	Reaktionen	
			Bacillus fl. l.	Erde
Papayotin	starke Trübung, beginnende Grünfärbung (nach 48 Stunden intensiv gefärbt). Geruch deutlich nach Thymol	Flüssigkeit leicht schaumig, trübe. Geruch nach Thymol (nach 48 Stunden Fäulnisgeruch)	Biuret schwach	Tryptophan
Trypsin	klar, Bodensatz (nach 48 Stunden ebenfalls grünlich gefärbt, doch Entwicklung weit hinter Papayotin zurück)	klar, starke Kahmhaut (nach 48 Stunden beginnende Fäulnis)	Biuret	Tryptophan
Pankreatin	gelbliche Trübung, Kahmhaut, Fruchtstergeruch (nach 48 Stunden riesige Bakterienentwicklung). Später Fäulnis	ähnlich, doch keine Kahmhaut (nach 48 Stunden Fäulniserscheinungen, die später sehr intensiv wurden)	Biuret	Tryptophan
Pepsin	schwache Trübung, Bodensatz	keine sichtbare Veränderung (nach 48 Stunden beginnende Trübung)	Biuret	Tryptophan —

<sup>1)</sup> Der *Bacillus fluorescens liquefaciens* — weiter unten wird näher darauf einzugehen sein — stammt aus einem der oben genannten grünlich gefärbten Kölbchen; er lag aber erst in Rohkultur vor, so daß das Verfaulen des Pankreatins in dem letzten Versuche nicht auf die Tätigkeit dieser Bakterie zu setzen sein dürfte.

Dasselbe Endergebnis, starke Bakterienentwicklung und teils (sämtliche mit Erde geimpften Kulturen) Fäulnis, trat auch bei Laboratoriumstemperatur ein, nur beträchtlich langsamer.

Inwieweit die Fermente infolge von Fäulnis durch Bakterien in ihrer Wirkungsweise geschwächt oder ob sie gar ganz zerstört werden, das eingehender zu untersuchen, lag nicht in dem Rahmen dieser Arbeit.

Vom Pepsin wies Papasotiriou<sup>1)</sup> nach, daß es durch bakterielle Zersetzung zerstört wird. Vom Papayotin kann ich dieses auch aussagen. Papayotin (Schuchardt), das in 0.15%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst wurde und klar filtriert unter Thymolzusatz mit Bakterien eine Woche bei 25° C. gefault war, hatte keine proteolytische Wirkung mehr auf Fibrinflocken, nachdem die Bakterien vermitteltst Filtration unter Druck durch eine Berkefeld-filterkerze entfernt waren. Dagegen war das «Pankreatinpräparat»<sup>2)</sup> auch nach kräftiger Bakterieneinwirkung noch aktiv.

Es erhob sich die Frage, ob sich das seltsame Verhalten der Bakterien zu Thymol nicht aus der Anwesenheit von Peptonen im Überschuß in den Verdauungsgemischen usw. erklären ließe, etwa indem das kolloidal gelöste Pepton die kristalloidal gelösten Thymolmolekeln einhüllt, sodaß nunmehr das Thymolpeptongemisch physikalisch-chemisch ein scheinbar einheitliches Kolloidsystem darstellt, das physiologisch als ungiftig für die Bakterien zu bezeichnen wäre.

Die Herabsetzung der Wertigkeit von Metallgiften in Peptonlösungen ist ja bekannt; der Lösungszustand dieser Gifte wird durch das Pepton anscheinend verändert. Der Lösungszustand des Thymols wird jedoch in Pepton in keiner Weise verändert.

Daß ein Enzym, in unserem Falle Papayotin, keine «Schutzwirkung» ausübt, ergab der oben mitgeteilte Versuch. Immerhin befand sich das Papayotin nur in großer Verdünnung in der Lösung, entsprechend den geringen Mengen zugesetzten Fermentes.

Um mit einer typischen kolloidalen Emulsionslösung zu arbeiten, wurde Witte-Pepton, meist 10%, benutzt. In einer

<sup>1)</sup> Papasotiriou, Einige Beobachtungen über den Einfluß von Bakterien auf Pepsin (Arch. f. Hyg., 1906, Bd. LVII, S. 269.)

<sup>2)</sup> Vom Trypsin erwähnt Fischer (Vorl. über Bakt., I. c., S. 123), daß kräftige Lösungen, die nicht aseptisch gemacht sind, von Bakterien überwuchert werden.

Vergleichsreihe war der Peptonstickstoff durch Ammonstickstoff ersetzt. Die Nährlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

1000 ccm H <sub>2</sub> O 20 » Knopsche Nährlösung 100 g Pepton oder 1000 ccm H <sub>2</sub> O 10 g Ammoniumtartrat 5 » Traubenzucker	}	beide Lösungen heiß gesättigt mit Thymol. Geimpft mit Erde.
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	-------------------------------------------------------------------------

Beiden Reihen parallel lief ein Kontrollversuch ohne Thymol. Aus der Tabelle IV geht hervor, daß das Pepton als Schutzstoff nicht in Frage kommt.

Tabelle IV.

Art der Lösung	Resultat nach 24 Stunden bei 25° C.	Resultat nach 48 Stunden bei 25° C.
a) Peptonwasser mit Thymol	Kahmhaut, leichte Trübung, Geruch nach Thymol	schwärzlichgrüne Trübung, Fäulnisgeruch
b) Peptonwasser ohne Thymol	dasselbe, die Kahmhaut erscheint ein wenig stärker	dasselbe
c) Ammoniumtartrat mit Thymol	schwache Trübung, Geruch nach Thymol	milchige Trübung, über der Erde schwärzliche Wolken. Fruchtetergeruch. Flüssig- keit hat etwas geschäumt
d) Ammoniumtartrat ohne Thymol	dasselbe	apfelsinenfarbige Trübung, leicht schaumig, kein Geruch

Die Kulturen a und b zeigten intensive Indolreaktion.

Das gleiche Resultat ergab ein Versuch, bei dem anstatt mit Erde die Nährlösung mit *Bacillus fluorescens liquaefaciens* geimpft war.

Auch diese Versuche wurden übrigens sowohl wieder bei Zimmertemperatur als auch bei 25° C. ausgeführt.

Der Ausfall war im Endresultat, Fäulnis der peptonhaltigen Lösungen, der gleiche, nur war natürlich eine zeitliche Differenz entsprechend den Temperaturunterschieden zu verzeichnen. Während die Kulturen bei

25° C. nach spätestens 48 Stunden Fäulniserscheinungen aufwiesen, wurde dieser Effekt bei Zimmertemperatur zumeist erst nach einer Woche erreicht. Entwicklung von Bakterien war jedoch in beiden Kulturreihen von Anfang an zu konstatieren, was schon makroskopisch in der frühzeitigen mehr oder weniger starken Ausbildung einer Kahlhaut zum Ausdruck kam.

Diese Versuche mit den Pepton- bzw. Ammoniumtartratlösungen unter Thymolzusatz wurden noch einmal wiederholt mit der Abänderung, daß nach Beigabe der Erdpartikelchen das Ganze kurz aufgeköcht wurde.

Aber auch in diesem Falle verfaulten regelmäßig die Lösungen von Pepton, und die Ammoniumtartratlösungen zeigten intensives Bakterienwachstum. (Kahlhautbildung, Trübung.) Die mikroskopische Kontrolle wies auch hier wiederum, wie in allen anderen Fällen, verschiedene bewegliche Bakterienarten von höchster vitaler Energie nach.

Also auch das Pepton hängt ursächlich nicht mit der eigenartigen Resistenz der Bakterien gegen dieses Protoplasmagift zusammen, sondern es ist zur Evidenz erwiesen, daß eben das Thymol als Gift im physiologischen Sinne für die hier benutzten Bakterienspezies nicht in Frage kommt, weder als Antisepticum (tötend), noch als Desinficiens (hemmend), wenn es, wie es in praxi stets der Fall ist, Medien keimfrei halten soll, die zugleich einen guten Nährboden für Bakterien abgeben.

In der bakteriologischen Literatur finden sich nun eine ganze Anzahl von Angaben über die Anpassungsfähigkeit von Bakterien an Gifte, obzwar eine erbliche Fixierung der Giftigkeit von irgend einer Spezies nicht festgestellt ist. Immerhin könnte es sich in unserem Falle um eine in der Kultur neu erworbene Eigenschaft handeln, die mit der Entfernung des eigenschaftsändernden Agens (des Thymols) dann wieder zum Verschwinden zu bringen sein müßte. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht.

Es wurden zu verschiedenen Malen «Passagekulturen» angelegt, indem reinkultivierte Bakterien (*Bacillus fluorescens liquefaciens*) aus thymolhaltigen Medien in thymolfreie Nährlösungen übergeimpft und eine Zeitlang in diesen Substraten weiterkultiviert wurden, um erst dann wieder als Testobjekte für Thymolresistenz zu dienen. Aber auch in diesen Fällen erwiesen sich die Bakterien als thymolhart. Überdies begegnen ja schon die Kulturen mit Erde- und Erbsenzusatz (also mit

Material, das nie mit Thymol in Berührung gekommen war) diesen Einwendungen.

Ein Versuch sei hierbei noch angeführt: 300 ccm einer 5%igen Peptonlösung, die zuvor heiß mit Thymol gesättigt und nach dem Erkalten klar filtriert worden war, wurde mit Erdpartikelchen geimpft. Nach einer Woche (bei 25° C.) hatte sich eine mächtige Kahmhaut gebildet, die einen Durchmesser von ca. 12 cm und eine Dicke von ca. 0,5 mm aufwies. Die Nährlösung war getrübt, Thymolgeruch herrschte noch vor.

Gerade die schon so oft verzeichnete Kahmhaut macht die Tatsache der Thymolresistenz noch rätselhafter, denn nach Metcalf<sup>1)</sup> muß ein Stoff, der die Oberflächenspannung eines Lösungsmittels herabsetzt, sich an der Oberfläche ansammeln. Da nun organische Stoffe die Oberflächenspannung zumeist erniedrigen, so müßte man annehmen, daß die Peptonlösung an der Oberfläche die größte Thymolkonzentration habe. Gerade an der Oberfläche aber haben die in diesen Versuchen benutzten Bakterien ihre größte Vegetationsbreite.

Ferner ließe sich noch argumentieren: Die vegetativen Bakterienformen, die in der zu den Impfzwecken verwendeten Erde enthalten sind, werden zunächst von dem Thymol gehemmt, aber nicht getötet. Nach einer Art kurzen Inkubationsstadiums ist ihr protoplasmatisches System auf das Gift eingestellt und die Entwicklung geht vor sich. Würde jedoch das Gift diesen anfangs hemmenden Charakter haben, dann dürften die in der Erde vorhandenen Spuren nicht zur Keimung gelangen (oder zum mindesten doch nicht so schnell). Würde also unter dieser Annahme das Nährlösungsthymolgemisch mit der Erde zusammen gekocht, so würden die vegetativen Stäbchen vernichtet, die sporogenen Formen aber blieben erhalten, doch ihr Auskeimen würde durch das Gift verhindert. Die Lösungen blieben also unverändert. Wie der schon angeführte Versuch lehrte, ist dies nicht der Fall: die Sporen keimen sogleich aus und erregen normalerweise die Fäulnis.

Alle Versuche wurden bisher in wässerigen Medien an gestellt; wie verhält sich nun Agar-Agar und Gelatine zu Thymol?

<sup>1)</sup> Zitiert nach Euler, l. c., S. 38.

Werden diese organischen Hydrogele durch Thymol ausreichend vor Bakterienvegetation geschützt? Wie es nach den Resultaten der vorhergehenden Versuche nicht anders zu erwarten war: Auch Agar und Gelatine werden durch Thymolzusatz nicht desinfiziert.

Um einen Überblick über die verschiedenen Bakterienarten zu gewinnen, die in den Kulturen vorlagen, wurden Thymolagar und Thymolgelatineplattenkulturen angelegt, wobei dann gleichzeitig das Verhalten der Bakterien in diesen Medien untersucht werden konnte.

Die Zusammensetzung der Substrate war:

10% Gelatine bezw. 2% Agar-Agar  
+ 2% Pepton + 20% Knopsche Nährlösung  
+ Thymol.

Die Gelatine (bezw. Agar) ward in gesättigtem Thymolwasser aufgelöst, gekocht und klar filtriert. Als Vergleich wurden Lösungen ohne Thymol auf die gleiche Weise hergestellt. Die bei 30° C. flüssig gehaltenen Agar- und Gelatinröhrchen wurden je mit einem Tropfen (Platinöse) eines Bakteriengemisches aus Erde und Glycerinfibrin beschickt und zu Platten ausgezogen. Die Agarpetrischalen standen bei 25° C., die Gelatineplatten bei Zimmertemperatur.

Es konnte auf allen Platten (mit und ohne Thymol) ein gleichmäßiges Auswachsen der Bakterien zu Kolonien beobachtet werden. Bei Agar aber schlechter als bei Gelatine. Die Gelatinekulturen waren sehr dicht; in der thymolfreien wie in der thymolhaltigen Schale trat gleichmäßig Verflüssigung ein.

Auf den Platten war deutlich ersichtlich, daß eine farbstoffbildende Bakterie weitaus vorherrschte, besonders auf Gelatine. Die Platten waren nach zwei Wochen (Zimmertemperatur) verflüssigt und intensiv grün gefärbt. Dieselbe Färbung war auch mit der Zeit in den meisten der alten Flüssigkeitskulturen die vorherrschende geworden.

Die genauere Speziesdiagnose (so weit eine solche zurzeit überhaupt durchführbar ist an asporogenen Formen) ergab dann, daß es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um *Bacillus fluorescens liquefaciens* Flügge handelt.<sup>1)</sup>

Die Produktion eines tiefblauen Farbstoffes der untersuchten Bakterie auf Agar deutet ja mehr auf *Bacillus pyocyaneus*; aber auch *Bacillus fluorescens liquefaciens* bildet oft auf Agar einen mehr blauen

<sup>1)</sup> Migula, System der Bakterien, 1900, Bd. II, S. 886.

Matzuschita, Bakteriologische Diagnostik, 1902, S. 132.

Farbstoff, zu dem dürfte eine sichere Trennung dieser beiden Bakterienarten (falls man sie als Arten gelten lassen will <sup>1)</sup> auf Grund ihrer Farbstoffbildung) schwer durchführbar sein.

Daneben konnte sehr oft *Bacillus vulgaris* (Hauser) Migula<sup>2)</sup> (*Bacillus proteus vulgaris* Hauser) nachgewiesen werden. Er herrschte besonders in den mit Erde und Erbsen infizierten Kulturen vielfach vor. Außerordentlich kräftige und schöne Formen traten in faulem «Pankreatin» auf. In den verschiedenen Thymolkulturen konnten in keiner Zeit irgend welche Erscheinungen von Involution festgestellt werden. (Die Kulturen standen zum Teil 6 Wochen.) Stets war das mikroskopische Bild das gleiche: Doppelstäbchen bewegten sich mit großer Geschwindigkeit zappelnd durch das Gesichtsfeld: in allen zur Beobachtung gelangenden Fällen konnte die für diese Bakterienform so charakteristische außerordentliche Lebhaftigkeit und Mannigfaltigkeit der Bewegungen festgestellt werden.

Außer den Plattenkulturen wurden noch Reagenzrohrstichkulturen angelegt. Es wurde sowohl mit Reinkulturen gearbeitet, als auch aus sämtlichen angesetzten Versuchen in Thymolgelatineröhrchen übergeimpft.

Alle Kulturen wurden am Nordfenster des Laboratoriums aufgestellt. Schon nach 2 Tagen zeigte sich in der überwiegenden Mehrzahl der Kulturen ein Auswachsen des Stichkanals; nach weiteren zwei Tagen war in allen Röhrchen ein Wachstum zu erkennen. Als der Versuch sistiert wurde (nach 2 Wochen), war ein großer Teil der Röhrchen verflüssigt, die verflüssigten Kulturen waren überwiegend grün gefärbt. Die zur Kontrolle angestellten Kulturen ohne Thymol ergaben dasselbe Bild. Besonders hervorzuheben ist bei diesem Versuch, daß auch die Bakterien in den ältesten Kulturen (ca. 8 Wochen) bei Thymolzusatz nicht abgestorben waren, sondern sofort, auf Thymolgelatine übergeimpft, weiter wuchsen.

Neben den mit Thymol gesättigter Gelatine wurden Versuche mit der Übersichtung von Thymolkrystallen durch Gelatine und der Herstellung von Thymolsuspensionen in Gelatine gemacht.<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Vgl. Handbuch der technischen Mykologie, 1904, Bd. III, S. 92 und Lehmann u. Neumann, Bakteriologische Diagnostik, 1904, S. 315.

<sup>2)</sup> Migula, l. c., S. 707.

Matzschita, l. c. S. 72.

<sup>3)</sup> Hierbei traten eigenartige Erscheinungen auf. Da Thymol seinen Schmelzpunkt bei 51,5° C. hat, so gelingt es, Suspensionen in heißer

Es wuchsen nun in Suspensionen von Thymol wie in den dem Thymol überschichteten Gelatine Bakterien. Auch in Agarhymolsuspensionen wuchsen die Bakterien. Eine Gelatine-stichkultur, über einem großen Thymolkrystall angelegt, wirkt äußerst demonstrativ: Der von oben bis unten gut bewachsene Stichkanal steht direkt auf dem Krystall, von oben, wo schon Verflüssigung eingetreten ist, nach unten trichterförmig spitz zulaufend.

Die Reihe der Versuche zur Feststellung des baktericiden Wertes des Thymols beschlossen mikroskopische Beobachtungen von Bakterien nebst einigen anderen zum Vergleiche herangezogenen Mikroorganismen.

So wurden Paramaecien untersucht.

Einem paramaecienhaltigen Flüssigkeitstropfen wurde Thymolwasser zugesetzt. Nach 3 Minuten traten Zerfließungserscheinungen auf, die auch besonders schön bei *Vorticella*

---

Gelatine herzustellen, weit über der sonstigen Löslichkeit des Thymols (1 : 1200). Werden in ein Reagenzglas etwa auf 70° C. erhitzte Gelatine (10 %) Thymolkrystalle gebracht, so schmelzen diese in kurzer Zeit. Durch kräftiges Schütteln während des Schmelzprozesses erhält man eine sehr feine Verteilung kleinster Thymoltröpfchen, die dann in der unter scharfem Wasserstrahl schnell zum Erstarren gebrachten Gelatine fixiert sind. Die Gelatine sieht darnach wie Stärkekleister aus: eine diffus weiß erscheinende starre Masse. Überläßt man jetzt diese Gelatinethymolmasse sich selbst, so krystallisiert mit der Zeit das suspendierte Thymol wieder aus. Es bilden sich innerhalb der Gelatine verschiedene Krystallisationskerne, an denen sich immer neues Thymol krystallisiert, bis das in der Gelatine nicht gelöste Thymol wieder krystallinisch geworden ist. Hand in Hand mit dieser Erscheinung tritt die milchige Trübung der Gelatine mehr und mehr zurück, die durch die Unzahl feinsten Thymoltröpfchen bewirkt wurde, bis schließlich die Gelatine wieder vollständig klar geworden ist. Nur eine Anzahl schöner großer Krystalle innerhalb der Gelatine erinnert an den früheren Zustand. Dasselbe ist auch in Petrischalen zu beobachten; die Krystalle bleiben hier aber durchweg beträchtlich kleiner. Es gelingt auch, flüssige Gelatine über Thymolkrystalle zu schichten, ohne daß die Krystalle zum Schmelzen kommen. Man braucht nur noch eben flüssige Gelatine (25—28° C.) zu benutzen und schnell erstarren lassen. Auf dem Grunde derart hergestellter Gelatineröhrchen liegen dann die Thymolkrystalle unverändert. Durch Diffusion erst gelangt nach und nach der entsprechende lösliche Anteil von Thymol in die Gelatine.

nebulifera zu beobachten waren. Bei diesen war das Kontraktionsvermögen des Stilmoids schon nach 30 Sekunden aufgehoben; Erschütterungsreize gelangten nicht mehr zur Perzeption.

*Euglena viridis*, *Polytoma uvella*, *Chlamydomonaden*, *Euastrum*, *Colpidium*, *Beggiatoa alba* und ein großes Sumpfspirillum kamen des weiteren zur Beobachtung. Bei den Infusorien trat regelmäßig nach kurzer Zeit Zerfließung ein.

Die Flagellaten, soweit sie metabolisch waren, zogen sich klumpenförmig zusammen; die *Beggiatoa* stellten ihre Oscillationen ein und die Bewegungen des Spirillums wurden langsamer und langsamer, bis sie schließlich (nach 3—5 Minuten) ganz aufhörten. Eine Anzahl Spirillen streckten sich dabei, so daß sie mit großen Stäbchenbakterien hätten verwechselt werden können. —

Ganz anders verhielten sich dagegen *Bacillus fluorescens liquefaciens* und *Bacillus vulgaris*. Die Bakterien wurden in Hängetrophen beobachtet. Sowohl in Hängetrophen, die aus gesättigtem Thymolwasser bestanden, wie auch in Tropfen, denen Thymolkrystallpulver zugesetzt war, blieben beide Formen nicht nur lebendig, sondern ihre Beweglichkeit ließ auch nichts zu wünschen übrig. Besonders war es wiederum *Bacillus vulgaris*, dessen große Beweglichkeit auffiel. Die Hängetrophen wurden vier Tage hindurch täglich kontrolliert (sie standen in einer feuchten Kammer bei 16° C.), eine Veränderung in der vitalen Energie der Bakterien war während dieser Zeit nicht zu konstatieren. Die Bakterien blieben also auch unter diesen denkbar ungünstigen Verhältnissen — destilliertes Wasser + Thymol —, wo doch keinerlei Nährstoff eine Kräftigung gegen die Giftwirkung ermöglichte, tagelang am Leben. Da liegt denn der Gedanke nicht allzutern, daß das Thymol selbst angegriffen wird. Einige Tatsachen sprechen für diese Möglichkeit.

Tyrosinase aus *Russula* und aus Champignons vermag nach Cousin und Hérissé<sup>1)</sup> Thymol in Dithymol überzuführen. Nach Fuhrmann<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Cousin und Hérissé, Über die Oxydation des Thymols durch das oxydierende Ferment der Champignons (Archiv der Pharmazie, 1908, Bd. CCXLVI, S. 225).

<sup>2)</sup> Fuhrmann, l. c., S. 107.

haben Gessard bei *Bacillus pyocyaneus* und Lehmann bei einigen anderen Bakterien eine Tyrosinase gefunden. Da Oxydasen (Phenolasen, Tyrosinasen) bei Mikroorganismen überhaupt weit verbreitet zu sein scheinen (und Gessard gerade bei dem dem *Bacillus fluorescens liquefaciens* so ähnlichen *Bacillus pyocyaneus* Tyrosinase nachgewiesen hat), so wäre es sehr wohl möglich, daß *Bacillus fluorescens liquefaciens* und auch *Bacillus vulgaris* mit Hilfe einer Phenolase eine Oxydation des Thymols zu Dithymol durchführen. Da das Dithymol ungiftig ist, so wäre der entwicklungshemmende Faktor beseitigt.

Leider waren, als diese Frage experimentell geprüft werden sollte, nur noch relativ geringe Mengen von Kulturflüssigkeit aus älteren Kulturen vorhanden, bei denen die Möglichkeit bestand, Dithymol aufzufinden bzw. das Verschwinden des Thymols nachzuweisen.

Es gelang nicht, durch Ausschütteln mit Äther wohlcharakterisierte Thymolkrystalle zu erhalten, die Mengen gelösten Thymols in den Flüssigkeiten waren zu geringe. Doch konnte der Thymolgeruch an dem durch Abdunstung des Äthers erhaltenen feinen Krystallgemisch wahrgenommen werden. Auch die Thymolreaktion mit Eisessig und konzentrierter  $H_2SO_4$  — rotviolette Färbung — war sehr intensiv.

Eine zweite Flüssigkeitsportion — *Bacillus fluorescens liquefaciens*-Kultur — wurde der Destillation unterworfen. Das Destillat wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Äther durch Abdunsten entfernt. Der krystallinische Rückstand ergab wiederum die obige intensive Thymolreaktion.

Es scheinen somit die Bakterien das Gift nicht durch einen enzymatischen Prozeß in eine ungiftige Form übergeführt zu haben, sondern es bleibt vorläufig<sup>1)</sup> die auffällige Tatsache bestehen, daß das Thymol für die gemeinsten Fäulnisbakterien ungiftig ist.

Ziehen wir kurz die Konsequenzen aus dem gesamten in dieser Arbeit niedergelegten Tatsachenmaterial, die sich speziell für verdauungsphysiologische Arbeiten ergeben. Wo tierisches und pflanzliches Eiweiß der Einwirkung tryptischer Fermente bei Zusatz von Thymol unterworfen wird, ist das Resultat eines solchen Verdauungsversuches nicht als einwandfrei zu betrachten. Denn die in den Verdauungsgemischen stets vorhandenen Bakterien greifen sowohl des Ferment an, wie sie auch das der Verdauung unterworfenen Eiweiß mit-

<sup>1)</sup> Ich hoffe in nächster Zeit ein endgültiges Resultat zu dieser Frage bringen zu können.

abzubauen imstande sind. Die entstandenen Spaltungsprodukte können deshalb nicht allein auf Rechnung einer spezifischen Wirkung des beigegebenen tryptischen Enzymes gesetzt werden. Art der Spaltung, Verlauf und Schnelligkeit erleiden durch die Mitwirkung der Bakterien eine Modifikation, der ganze Versuch verliert seine Eindeutigkeit. Das Thymol ist um so gefährlicher, als sein intensiver, frisch aromatischer Geruch oft leicht Fruchtesterbildung von seiten der Bakterien verdeckt; denn nicht stets sind es kräftig das Eiweißmolekül zu Indol, Skatol, Methylmerkaptan und Schwefelwasserstoff spaltende Fäulnisbakterien, die thymolhart sind und den Versuch chemisch beeinflussen. Um nur ein Beispiel aufzuführen: Emmerling und Reiser<sup>1)</sup> wiesen nach, daß ein tryptisches Ferment des *Bacillus fluorescens liquefaciens* in seiner Wirkung ganz dem des Papayotins ähnelt. In meinen Papayotinverdauungsversuchen mit Thymolzusatz, die den Anlaß zu dieser Arbeit gegeben haben, trat nun gerade dieses Bakterium einige Male auf. Wäre es übersehen worden, so hätte die tatsächlich bakterielle Tätigkeit eine Papayotinwirkung vorgetäuscht, während das zu prüfende Papayotin womöglich unwirksam war. — Inwieweit nun die Arbeiten über tryptische Verdauung, die unter ausschließlicher Verwendung von Thymol unternommen wurden, etwa einer kritischen Überprüfung zu unterziehen wären, ist nicht Sache dieser Untersuchung. So viel steht fest: Das Thymol darf für die Folgezeit, besonders für länger dauernde Verdauungsversuche bei alkalischer Reaktion, nicht mehr als Desinficiens verwendet werden, weil es als solches seinen Zweck nicht erfüllt.

---

<sup>1)</sup> Emmerling und Reiser, Zur Kenntnis eiweißspaltender Bakterien (Chem. Ber. 1902, Bd. XXXV, S. 700).