Sitzungsberichte

der

mathematisch-physikalischen Classe

der

k. b. Akademie der Wissenschaften

zu München.

1882. Heft II.

München.
Akademische Buchdruckerei von F. Straub.
1882.

In Commission bei G. Franz.

Sitzungsberichte

der

königl. bayer. Akademie der Wissenschaften.

Mathematisch-physikalische Classe.

Sitzung vom 7. Januar 1882.

Herr v. Nägeli bringt mit einem Begleitschreiben nachstehende Abhandlung zur Vorlage:

„Ueber die experimentelle Erzeugung des Milzbrandcontagiums" von Dr. Hans Buchner.

II. Mittheilung.[1])

Die Umwandlungen in der Natur der Pilze, welche in meiner ersten Mittheilung nachgewiesen wurden, hatten zu ihrem Eintreten theilweise einer nicht unbeträchtlichen Zeitdauer bedurft. Es lag nahe, die Ursache hievon in der noch unvollständigen Kenntniss der massgebenden Bedingungen zu suchen, und es musste dies eine Aufforderung sein, die Forschung in dieser Richtung mit veränderten Methoden fortzusetzen. Denn, wenn es gelang die Zeitdauer der Umzüchtung in entscheidender Weise abzukürzen, so war damit eine wesentliche Aufklärung über das Ursächliche des Vorganges selbst, und ausserdem die Möglichkeit einer leichten Controle dieser praktisch wie theoretisch gleich wichtigen Resultate gegeben.

1) I. Mittheilung s. diese Sitzungsberichte. 1880. Heft III. S. 368.

In der That haben die weiteren Versuche diese Aufgabe in befriedigender Weise gelöst. Die Angabe der Methoden, welche die Umwandlung der infectiösen in die unschädliche Pilzform in einigen wenigen Tagen vollführen lassen, bilden den Gegenstand der vorliegenden Mittheilung, während die umgekehrte Züchtung einer nächsten Mittheilung vorbehalten bleiben soll. Auch diese Versuche wurden wie die früheren im pflanzen-physiologischen Institut des Herrn Professor v. Nägeli zur Ausführung gebracht.

Zunächst möchte ich bezüglich der Nomenclatur der hier in Frage kommenden Pilzformen einiges bemerken. Es erscheint als wünschenswerth, für die von mir als Stammform der Milzbrandbacterien nachgewiesenen und durch Angabe des ihnen eigenthümlichen Reinculturverfahrens (Kochen von Heuaufgüssen) charakterisirten „Heubacterien" eine wissenschaftliche Bezeichnungsweise zu besitzen. F. Cohn, der diese Form zuerst beschrieb, hat nun für dieselbe den Namen „Bacillus subtilis" gebraucht. Da jedoch aus früher angeführten Gründen die Aufstellung einer selbständigen neuen Formgattung Bacillus gegenüber der älteren Bacterium nicht als berechtigt zugegeben werden kann[1]), so erscheint es als selbstverständlich, dass der frühere, von Ehrenberg eingeführte Gattungsname Bacterium für diese Gebilde beibehalten, der Speciesname dagegen nach dem Vorgange von Cohn angenommen wird, womit denn diese Heubacterien die Bezeichnung „Bacterium subtile" erhalten.

Das Bacterium subtile (syn. Bacillus subtilis, Heubacterien, Heubacillen) ist hinsichtlich seiner physiologischen Eigenschaften hauptsächlich durch die höchst merk-

---

1) I. Mittheilung S. 369. Anmerkung. Die nähere Darlegung dieser Gründe verspare ich mir auf eine Mittheilung, welche die Morphologie der Heubacterien zum Gegenstande haben soll.

würdige Resistenz gegen hohe Hitzegrade ausgezeichnet[1]). Ferner dadurch, dass es durchaus kein Gärungserreger ist, ein Punkt, der übrigens schon durch Prazmowski hinreichende Aufklärung erfuhr[2]). Auch ich habe in meiner ersten Mittheilung angegeben, dass dasselbe so wenig als die Milzbrandbacterien den Milchzucker zu vergären im

---

1) Um eine allseitige Verständigung über die Identität von Bacterium subtile möglichst zu befördern, möchte ich das Verfahren zur Reincultur desselben auf Grund meiner Erfahrungen mit verschiedenen Heusorten, (die sich in verschiedener Richtung ungleich verhalten) folgendermassen präcisiren: Heu-Aufguss bereitet nach der Methode von W. Roberts (Philos. Transact. of the R. Soc. of London. Vol. 164, 1874. p. 457), d. h. 4stündiges Verweilen des mit möglichst wenig Wasser übergossenen Heu's bei 36° C.; alsdann wird durch ein Drahtsieb abgegossen (nicht filtrirt), verdünnt bis zum sp. G. 1,004, und dieser Aufguss nun 1 Stunde lang in einem mit Watte verschlossenen Kolben bei geringer Dampfentwicklung zum Sieden erhitzt. Der Kolben soll 500 ccm Aufguss enthalten, und nicht weniger; nach dem Kochen wird derselbe bei 36° C. belassen. In dieser Weise verfahrend wird man nach 48 Stunden kaum jemals die von Bacterium subtile gebildete Pilzdecke vermissen. Ganz ausnahmsweise nur könnte es vorkommen, dass der Heuaufguss zu stark sauer reagirt und dass der Erfolg des Versuches dadurch vereitelt würde, weil die Pilze in saurer Lösung leichter getödtet werden. In solchem Fall wäre es erforderlich, den Aufguss vor dem Kochen zu neutralisiren. — Dass ich auf 1,004 sp. G. zu verdünnen vorschlage, anstatt wie Roberts angibt, 1,006, hat seinen Grund nur darin, das manches Heu zu wenig lösliche Substanzen besitzt, um bei obiger Behandlung einen Aufguss von 1,006 sp. G. zu liefern. Filtrirt soll nicht werden, weil man ja die Pilze, die oftmals an kleinen Stäubchen und Splitterchen haften, in der Lösung zu behalten wünscht. Eine grössere Menge von Heuaufguss zu erhitzen ist erforderlich, da lebenskräftige Pilze, welche das Erhitzen unbeschadet überstehen, keineswegs so sehr zahlreich in demselben vorkommen, dass man in jeder kleineren Quantität schon sicher auf dieselben rechnen könnte.

2) Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Von Dr. Adam Prazmowsky. Leipzig 1880.

Stande sei. Nach vielen und vielseitigen Versuchen kann ich nunmehr bestätigen, dass Bacterium subtile in Lösungen, welche die verschiedensten Kohlenhydrate enthalten, trotz reichlichster Vermehrung, keine Spur von Gährung zu bewirken im Stande ist. Die Identificirung dieses Pilzes mit dem Buttersäure-Ferment von Pasteur, wie sie F. Cohn im Jahre 1872 gab, muss somit, wenigstens vorläufig, fallen gelassen werden. Ebenso auch die Identificirung mit derjenigen Bacterienform, deren sich Fitz bei seinen interessanten Gärungsversuchen zur Zerlegung des Glycerin's in Aethylalkohol bediente.[1]) Ich habe diese letztere Pilzform rein cultivirt und eingehend studirt, und bin zu der bestimmten Ueberzeugung gelangt, dass dieselbe mit dem Bacterium subtile keineswegs identisch ist. Im Gegentheile ist der Fitz'sche Pilz ein entschiedener Gärungserreger, der die meisten Kohlenhydrate energisch zu vergären vermag. Bezüglich der sonstigen chemischen Eigenschaften des Bacterium subtile habe ich bereits in meiner ersten Mittheilung das Wichtigste angegeben und gezeigt, dass dieselben mit jenen der Milzbrandbacterien völlig übereinstimmen. Eine nothwendige Folge der vollkommenen Gäruntüchtigkeit dieser Pilze ist es, dass sie des freien Sauerstoffs zu ihrem Wachsthum unbedingt benöthigen. Denn nur Gärungserreger können desselben, wenn sie in Thätigkeit sind, entrathen.

Ich komme nun zum eigentlichen Thema der gegenwärtigen Mittheilung. In meiner ersten Mittheilung hatte ich angegeben, dass Züchtung der Milzbrandbacterien in Lösungen von Fleischextract mit oder ohne Zuckerzusatz bei 36° C. im Schüttelapparat jedesmal eine allmählige Ab-

1) Alb. Fitz: Ueber Schizomyceten-Gährungen III. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft XI. 1878 S. 49.

nahme der infectiösen Wirksamkeit herbeiführte. Ein wesentlicher Unterschied konnte dabei nicht constatirt werden, ob Zucker zugesetzt wurde oder nicht, ob die Concentration höher oder niedriger gewählt wurde. Somit können diese Bedingungen für die Umänderung der Pilznatur nicht von entschiedenem Belange sein.

Wichtig schienen dagegen die anderen Bedingungen der Züchtung: erhöhte Sauerstoffzufuhr in Folge des Schüttelns und Temperatur von 36° C. In der That kann man zeigen, dass diese Bedingungen es sind, welche allein die Veränderung in den Eigenschaften der Milzbrandbacterien bewirkten. Werden dieselben weggelassen, so können diese Pilze auch ausserhalb des Körpers durch beliebig viele Generationen fortgezüchtet werden, ohne dass irgend eine ihrer Eigenschaften verloren geht. Das einfachste Mittel hiezu ist Züchtung in einer halbprocentigen Fleischextractlösung in Ruhe (ohne Schüttelu) bei 25° C. Unter diesen Bedingungen wachsen reincultivirte Milzbrandbacterien stets in Form zierlicher Wolken am Grunde der völlig klaren Nährflüssigkeit; bei beliebig lange fortgesetzter Züchtung bleibt die infectiöse Wirksamkeit die nämliche, wie sie in der ersten Reincultur der Bacterien in der Fleischextractlösung gewesen war.

Da nun verminderte Sauerstoffzufuhr und niedere Temperatur Bedingungen sind, unter denen die Milzbrandbacterien sich gleichzeitig auch langsamer vermehren, so ergibt sich die Annahme, dass überhaupt Verhältnisse, welche dem Wachsthum nicht besonders förderlich sind, zur Constanterhaltung der infectiösen Eigenschaften am besten wirken. In der That wird diese Voraussetzung durch alle Versuche, die man in dieser Richtung anstellen kann, als richtig bewiesen. Zu beachten ist in dieser Beziehung die chemische Reaction der Nährlösung. Schwach saure

Nährlösungen sind zur Erhaltung der infectiösen Eigenschaften vortheilhafter als schwach alkalische. Man denke nicht, dass diese Wirkung nur auf der Verminderung der Generationszahl beruht. Davon kann keine Rede sein, und habe ich auf diesen Punct genügend geachtet.

Als weitere Folgerung ergibt sich, dass umgekehrt besonders günstige Vermehrungsbedingungen eine rasche Abnahme der infectiösen Wirkung herbeiführen werden. Schon die frühere Züchtung war von diesem Gedanken beeinflusst. Aus diesem Grunde hatte ich die Pilze im Schüttelapparate wachsen lassen. In ruhender Nährlösung hängt alles ab von der Höhe der Flüssigkeitsschichte, auf deren Grunde die für gewöhnlich bewegungslosen und desshalb nicht umherschwimmenden Milzbrandbacterien vegetiren. Je höher diese Schichte, um so geringer ist die Menge von Sauerstoff, die in der Zeiteinheit durch Diffusion den Pilzen zugeführt wird, umso langsamer erfolgt desshalb die Vermehrung und umgekehrt.

Das Schütteln verändert diese Verhältnisse insofern, als dadurch alle Theile der Flüssigkeit gleichmässig mit Luft in Berührung kommen, so dass der Erfolg der gleiche ist, als ob die Pilze sämmtlich in einer sehr wenig tiefen Flüssigkeitsschichte vegetirten. Es fragt sich aber, ob auf diese Weise den Pilzen das Maximum von Sauerstoff zugeführt werden kann. Ich glaube nicht; ich halte es vielmehr für sicher, dass Pilze, welche in Form von Häuten und Decken auf Flüssigkeiten vegetiren, wenigstens in der obersten Lage, noch viel reichlicher Sauerstoff erhalten als geschüttelte Pilze. Die Verminderung der Sauerstoff-Absorption durch die Schüttelbewegung mag hiezu wohl beitragen.

Wir wissen nun aber, dass gerade die Heupilze, in welche die Milzbrandbacterien übergeführt werden sollen, in exquisiter Weise Decken bilden, und es ist gewiss, dass sie auch in der Natur stets in dieser Weise unter der

unmittelbaren Einwirkung des Sauerstoffs als häutige Ueberzüge vorkommen. Der nächste Gedanke war somit, auch die Milzbrandbacterien unter den gleichen Bedingungen wachsen zu lassen.

Dies geschah dadurch, dass ich reincultivirte Milzbrandbacterien auf Filtrirpapierstücke aussäte, welche, selbst pilzfrei, an der Oberfläche sterilisirter Nährlösungen schwimmend angebracht waren. Nach Verlauf einiger Tage bildete sich auf diesen schwimmenden Flächen ein bis zu 3 mm dicker weisser oder schwach graulicher Schleimüberzug, der lediglich aus sporentragenden Milzbrandfäden bestand. Ich bemerke, dass die Entwicklung dieser Schleimmassen bedeutend augenfälliger wird, wenn die Nährlösung eine gewisse Menge von Zucker enthält. Der Zucker wirkt modificirend auf die Bildung der Membranen und lässt dieselben voluminöser und klebriger werden. Der günstige Einfluss des reichlich zutretenden Sauerstoffs machte sich hier nicht nur durch die ausserordentlich starke Vermehrung sondern auch dadurch kenntlich, dass unter diesen Umständen die Milzbrandbacterien sogar in einer sonst denselben absolut unzugänglichen Nährlösung wuchsen, nämlich in nicht neutralisirtem (schwach sauer reagirendem) Heuaufguss. Allein ein wesentlicher Vortheil bezüglich der Umwandlung der Pilznatur gegenüber der Cultur im Schüttelapparate liess sich auf diese Weise nicht erreichen.

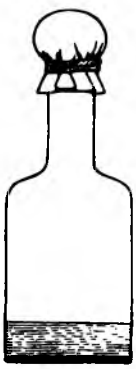
Die Ursache dieses ungenügenden Erfolges durfte zunächst darin gesucht werden, dass auf den feuchten, schwimmenden Oberflächen zwar die Zufuhr des Sauerstoffs eine sehr reichliche, jene des Nahrungsmaterials dagegen eine verlangsamte ist, da dasselbe erst durch das Filtrirpapier hindurch diffundiren muss. Entsprechend war auch die Vermehrung der Pilze zwar eine sehr reichliche, aber keine sehr rasche; es dauerte immerhin mehrere Tage, bis die erwähnten Schleimüberzüge sich ordentlich entwickelten. Um

diesen Uebelständen abzuhelfen, modificirte ich das Züchtungsverfahren in der Weise, dass die Filtrirpapierstücke anstatt auf der Oberfläche der Nährlösung zu schwimmen, an die Wandung des Züchtungsgefässes geklebt wurden, so dass dieselben über das Flüssigkeitsniveau noch um ein gutes Stück in die Höhe ragten. Die ausgiebige Benetzung dieser feuchten Flächen mit Nährlösung geschah dadurch, dass die Züchtungsgefässe wiederum in den Schüttelapparat eingesetzt wurden.

Wendet man eine zuckerhaltige Nährlösung (am besten 1 Procent Fleischextract und 3 Procent Zucker) an, so entstehen auch unter diesen Umständen bei Aussaat reiner Milzbrandbacterien und Körpertemperatur schleimige Ueberzüge auf den Papierstreifen. Der Zuckerzusatz ist hiezu wesentlich, da die Pilze sonst nicht genügend fest der Fläche des Papiers adhäriren. Der Erfolg dieses Verfahrens, das ich mit den verschiedensten Modificationen im einzelnen in ein paar hundert Versuchen zur Anwendung brachte, war bereits ein wesentlich besserer als derjenige aller bisherigen Züchtungsarten. In den allermeisten Fällen bewirkte schon die einmalige Cultur unter diesen Bedingungen eine merkliche Umänderung im Verhalten der Milzbrandbacterien. Zur Constatirung derselben bedurfte es nicht jedesmaliger Impfversuche an Thieren. Es hatte sich nämlich längst mit Evidenz herausgestellt, dass die mit blossem Auge erkennbare Wachsthumsart der Milzbrand-Heubacterien im Züchtungsglase mit deren Verhalten im Thierkörper absolut parallel geht, so dass aus ersterem auf letzteres ein vollständig sicherer Schluss gezogen werden kann. Um diess zu erläutern, ist es nothwendig, auf die makroskopische Wachsthumsart der Uebergangsstufen zwischen Milzbrand- und Heubacterien näher einzugehen.

Alle diese Uebergangsstufen, welche eine lückenlose Reihe von den ächten Milzbrandbacterien zu den ächten Heubacterien bilden, sind bei bekannter Nährlösung an der makroskopischen Art ihres Wachsthums sofort zu erkennen. Es muss jedoch nicht nur die Nährlösung eine bestimmte und für alle Versuche die gleiche sein, sondern auch alle andern Bedingungen der Züchtung müssen für jede Form gleich gehalten werden, wenn es sich um die Feststellung der Merkmale handelt. Denn die nämliche Pilzform verhält sich bei jeder veränderten Züchtungsweise etwas verschieden.

Als Normallösung wähle ich die 1 procentige Lösung von Liebig'schem Fleischextract. Hievon erhält jedes Züchtungsglas 20 ccm. Als Züchtungsgefäss (dessen Form, ob Eprouvette oder Kölbchen, wegen des verschiedenen Sauerstoffzutritts bei verschiedener Flüssigkeitstiefe keineswegs irrelevant ist) sei ein Fläschchen von der Form des in Abbildung beigefügten (sogenanntes Saftgläschen) angenommen, ein Gefäss, das ich nach vieljähriger Erfahrung für Pilzculturen am meisten empfehlen kann. Diese Saftgläschen sind aus dickem, schwer schmelzbarem Glase gefertigt, um das oftmalige Erhitzen im Dampfkessel unbeschadet ertragen zu können. Der äussere Durchmesser des erweiterten Theiles beträgt 5 cm. Zuerst werden die Gläschen mit Nährlösung (hier 20 ccm, was eine Schichte von 1,2 bis 1,5 cm Höhe gibt) gefüllt; alsdann wird über den mit Watte verschlossenen Hals noch Zeug gebunden, um später beim Stehenlassen der Cultur die Ansammlung von Zimmerstaub am Rande der Oeffnung und das Hineinfallen desselben in das Gläschen bei Lüftung des Pfropfens zu vermeiden; endlich werden die derartig zu-



sammengestellten Züchtungsgläser im Dampfkessel erhitzt. Die Höhe der Erhitzung habe ich schon bei einer anderen Gelegenheit auf 110° C. während 1 Stunde angegeben. Die hiebei erforderliche Zeit der Anwärmung richtet sich nach der Grösse der verwendeten Züchtungsgefässe resp. der darin eingeschlossenen Flüssigkeitsmengen. Für den gegenwärtigen Fall, Saftgläschen mit 20 ccm Lösung, beträgt dieselbe bei dem Dampfkessel, dessen ich mich bediene, 1¼ Stunden. Das heisst, nach dieser Zeit haben die eingeschlossenen Flüssigkeiten ganz sicher 110° erreicht. Die gesammte Erhitzungsdauer beträgt somit 2¼ Stunden.[1]) Schon früher habe ich hervorgehoben, dass derartig behandelte Züchtungsgefässe, gleichviel mit welchem Nährmaterial dieselben gefüllt sind, für immer, auch bei wochen- und monatelangem Aufenthalt im Thermostaten bei 36° unverändert und pilzfrei bleiben. Auf solche mit 20 ccm 1procentiger Fleischextractlösung gefüllte Züchtungsgefässe beziehen sich die nun folgenden Angaben über die Wachsthumsart der Zwischenstufen von Milzbrand- zu Heubacterien.

Unter diesen Uebergangsformen, die eine ununterbrochene Reihe von der einen zur anderen Grenzform dar-

1) Der grössere Dampfkessel, welcher seit 12 Jahren im hiesigen pflanzenphysiologischen Institut zur Sterilisirung von Nährsubstanzen verwendet wird, (vorher wurde ein kleinerer gebraucht) ist ein Cylinder aus Messing, 20 cm im Durchmesser und 45 cm hoch. Der Boden wird 5–8 cm hoch mit Wasser bedeckt. Die Züchtungsgefässe stehen in 2, durch ein dazwischen gelegtes Blech getrennten Etagen übereinander, so dass jedesmal 20 Saftgläschen gleichzeitig sterilisirt werden. Jedes Saftgläschen erhält während des Erhitzens über den Hals eine Glasglocke übergestülpt, um das Eindringen des vom Deckel abtropfenden Condensationswassers in den Wattepfropf zu verhindern. Der Deckel des Kessels wird mit Schraubklemmen aufgeschraubt und der dampfdichte Verschluss durch einen Ring aus starkem, angefeuchtetem Pappdeckel hergestellt.

stellen, können zweckmässig 3 Stufen unterschieden werden, obwohl es leicht wäre noch mehr Zwischenstufen mit genügend kenntlichen Merkmalen zu markiren. Diese Uebergangsformen will ich, von den ächten Milzbrandbacterien beginnend mit I, II, III numeriren. Die Wachsthumsart dieser und der Grenzformen in 1 Procent Fleischextract bei 36° C. gestaltet sich, 36 Stunden nach erfolgter Aussaat, d. h. nach vollendetem Wachsthum, folgendermassen:

Aechte Milzbrandbacterien: Nährlösung klar, am Grunde derselben zarte, weisse Wolken.

Uebergangsform I: Nährlösung klar oder durch Flöckchen getrübt, Bildung eines weissen Randes dort, wo die Oberfläche der Flüssigkeit die Glaswand berührt. Am Grunde der Lösung weisse Flocken.

Uebergangsform II: Nährlösung durch Flocken getrübt. Sehr lockere, schleimig aussehende Decke, die bei der leisesten Erschütterung zu Boden sinkt. Grund mit Flocken und untergesunkenen Deckenfragmenten bedeckt.

Uebergangsform III: Nährlösung klar oder durch Flöckchen getrübt. Schleimig aussehende aber ziemlich consistente Decke. Keine Flocken am Grunde.

Aechte Heubacterien: Nährlösung bis zum Grunde völlig klar. Trockene, feste, weisse, oftmals fein gerunzelte oder wie bestäubt aussehende, schwer unterzutauchende Decke.

Aus dieser Uebersicht ergibt sich, dass je mehr die Pilze den ächten Heubacterien sich annähern, um so mehr die Fähigkeit eintritt, in der Nährlösung umherzuschwimmen und an der Oberfläche, unter der directen Einwirkung des

Sauerstoffs, dichte, gallertartige Verbände zu bilden. Erwähnt muss werden, dass von Form I an jedesmal der Entwicklung des oben verzeichneten typischen Wachsthumsbildes ein Schwärmstadium vorhergeht; innerhalb 12 Stunden nach der Aussaat trübt sich die Nährlösung und ist mit Pilzen erfüllt, welche eine selbständige Bewegung zeigen. Diese Eigenbewegungen sind jedoch bei den Zwischenformen noch bedeutend langsamer als bei den ächten Heubacterien.

Zur Orientirung sei bemerkt, dass die nunmehr aufgestellte Uebergangsform II eben dieselbe ist, welche in meiner früheren Mittheilung als „Mittelform" (S. 391 und 407) ausführlicher beschrieben wurde. Ich habe damals nachgewiesen, dass diese „Mittelform" auf Thiere übertragen zwar nicht in geringeren wohl aber in grösseren Mengen nach einer verlängerten Incubationszeit von 4—6 Tagen den Milzbrand hervorzurufen vermag, eine Angabe, die ich nach neueren Erfahrungen vollkommen bestätigen kann. Von der Uebergangsform I dagegen genügt schon eine geringere Menge zur wirksamen Infection; aber immerhin bedarf es wesentlich mehr davon als von ächten Milzbrandbacterien.

Nach diesen Ausführungen kehre ich zu den Resultaten der Umzüchtungsversuche zurück. Die zuletzt geschilderte Methode der Züchtung im Schüttelapparate mit Anbringung eines Filtrirpapierstreifens an der Wandung führte in den meisten Fällen zur Erlangung der Uebergangsform I, manchmal jedoch bis zu Form II und III, wobei dann die weitere Umzüchtung bis zu den Heubacterien nicht mehr schwer fiel. Da es jedoch auf keine Weise gelang, dieses günstige Ergebniss constant zu erhalten, so musste auch dieser Weg schliesslich als unzulänglich verlassen werden.

Nunmehr konnte nur von einer verbesserten Wahl der Nahrungsstoffe noch Vortheil erwartet werden. Bisher war zu den Züchtungen hauptsächlich Fleischextract verwendet worden, das für die Spaltpilze im allgemeinen das beste Nahrungsmittel darstellt. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Milzbrandbacterien als Krankheitspilze an andere Ernährungsweise, an Eiweisslösungen gewöhnt sind und desshalb gerade im Thierkörper am allerbesten gedeihen. Aus diesen Erwägungen kam ich dazu, Eiweisslösungen zur Cultur zu verwenden. Man musste sich allerdings sagen, dass in solchem Nährmaterial die Ueberführung bis zu den ächten Heubacterien niemals gelingen könne, da die letzteren in Eiweisslösungen als solche gar nicht vermehrungsfähig sind. Allein die schwierigste Aufgabe war hier immer der erste Schritt und auf diesen musste hauptsächlich die Bemühung gerichtet sein.

Die mit Anwendung der Eiweisslösung verbundene Absicht ist nun vollständig realisirt worden, und die Züchtung der Milzbrandbacterien unter diesen Bedingungen ist in der That das gesuchte Mittel, um die Pilze mit Sicherheit in kürzester Zeit in die Uebergangsform II umzuwandeln und ihre infectiöse Wirksamkeit ganz ausserordentlich zu vermindern. Der Wunsch, dieses wichtige Ergebniss von anderer Seite bestätigt zu sehen, möge es entschuldigen, wenn ich auf die Versuchsanordnung etwas detaillirt hier eingehe.

Zur Bereitung der Eiweisslösung nahm ich ausschliesslich Eigelb. Selbstverständlich kann dasselbe nicht sterilisirt werden, und es sind desshalb fortwährende Controlversuche nöthig, um klar zu legen, ob nicht von Seite des Eigelbs in störender Weise Pilze in den Versuch eingeführt werden. Diese Controlversuche zeigen denn, dass man das Eigelb ganz wohl zu solchen Zwecken verwenden kann. Gegenüber dem Eier-Eiweiss besitzt dasselbe ausserdem den

grossen Vortheil, dass es sich in wässerigen Flüssigkeiten leicht vertheilt und seine löslichen Bestandtheile an dieselben abgibt. In viel höherem Masse als bei frischen Eiern ist diess bei den sogenannten Kalk-Eiern der Fall, die durch Aufbewahren in Kalkwasser conservirt sind, und diess ist der Grund, wesshalb ich nur die letzteren zum gegenwärtigen Zwecke empfehlen kann.

Die Eintragung des Eigelbs in die oben beschriebenen pilzfreien Züchtungsgläser mit 20 ccm Fleischextractlösung geschieht vermittels Glasröhren von 4 mm Durchmesser im Lichten, die zuerst auf ausfliessendes Eigelb kalibrirt, alsdann im Dampfkessel pilzfrei gemacht, und nun wie gewöhnliche Pipetten verwendet werden. Die Menge von Eigelb bei diesen Versuchen betrug stets 1 ccm Eigelb für jedes Züchtungsglas, somit $^1/_{20}$ von der Menge der Fleischextractlösung.

Derartige Eiweisslösungen sind nun (ohne weiteren Zusatz) wohl geeignet zur Vermehrung aber noch nicht zur Umänderung der Milzbrandbacterien, wie sich sogleich zeigen wird. Bringt man reine Infectionspilze (entweder direct aus der Milz eines an acutem Impf-Milzbrand verendeten Thieres, oder vorher noch in Fleischextract reincultivirt) in dieselben bei 36° C. zur Aussaat, so zeigt sich nach 24 Stunden anscheinend gar keine Veränderung. Die Flüssigkeit ist gerade wie unmittelbar nach der Bereitung derselben gelblich gefärbt und dicht trüb von den suspendirten Eigelbpartikelchen; am Boden befindet sich ein Absatz von specifisch schwereren und gröberen Theilchen. Die mikroskopische Untersuchung ergibt jedoch, dass eine Vermehrung der ausgesäten Pilze stattgefunden hat. Es finden sich nicht in den höheren Schichten der Flüssigkeit, wohl aber, wenn man dieselbe umschüttelt und so auch die tiefen Schichten zur Untersuchung bringt, Milzbrandfäden und Stäbe in nicht sehr grosser Zahl, etwas breiter als im Thier-

körper, aber sonst unverändert und insbesondere ohne Eigenbewegung, wesshalb dieselben eben nur am Grunde sich vermehren. Ueberträgt man dieselben ein zweites Mal in die gleiche Eiweisslösung, so ist nach 24 Stunden der Erfolg der nämliche und ebenso bei einer dritten und vierten Uebertragung u. s. w. Keine Veränderung der Eigenschaften macht sich bemerkbar. Es stimmt diess überein mit der geringen Vermehrung, welche in solchen Eiweissflüssigkeiten stattfindet und die den blossen Zusatz von Eigelb zur Fleischextractlösung trotz des so bedeutend vermehrten Nahrungsmateriales als sehr wenig förderlich, eher als nachtheilig erscheinen lässt.

Die Ursache dieser ungünstigen Wirkung des Eiweisses konnte in der geringen Diffundirbarkeit desselben durch pflanzliche Membranen liegen. Die entsprechende Abhülfe musste dann Zusatz einer gewissen Menge von Alkali zur Eigelbmischung gewähren, wodurch die Diffusionsfähigkeit beträchtlich erhöht wird.

In der That ist der Zusatz von Alkali zur Eiweissflüssigkeit der entscheidende Punkt, auf den es ankommt. Die Vermehrung der ausgesäten Milzbrandbacterien wird hiedurch eine ungemein reichliche, und eben dadurch vollzieht sich denn mit einem Schlage eine merkwürdige Umänderung in ihrer Natur.

Die richtige Menge von Alkali zu diesem Zwecke ist 2 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlösung[1]) auf 20 ccm der Fleischextract-Eigelbmischung. Doch führt auch Zusatz von 1 oder 3 ccm in der Regel zum gewünschten Erfolge. 4 ccm jedoch beeinträchtigt bereits die Entwicklung der Pilze.

---

1) Meine Normal-Natronlösung ist so gestellt, dass 1 ccm derselben zur Neutralisirung von 1 ccm Normal-Oxalsäure genügt, welche durch Auflösen von 63 g Oxalsäure in 1 Liter dest. Wassers hergestellt wird.

Bei Aussaat von Milzbrandbacterien in solche alkalische Eiweisslösungen zeigt sich in der Regel schon nach 24 stündigem Verweilen bei 36° C. eine auffällige Veränderung, indem statt des gleichmässig trüben Aussehens der nicht inficirten Controlgläser die Flüssigkeit entweder im Ganzen oder vorzugsweise in den oberen Schichten eine milchige Beschaffenheit und eine gelblich weisse entschiedene Färbung annimmt. Bei stärkerer Ausbildung dieser Erscheinung sondert sich die Flüssigkeit in drei verschiedene Schichten. Die oberste besitzt das Aussehen einer dichten, gelblich weissen glänzenden Masse, die am besten mit einer Mischung von Eidotter und Milch oder gelblichem Rahm zu vergleichen ist. Diese Schichte nimmt die Hälfte der Flüssigkeitshöhe ein oder mehr. Darunter folgt ein trübes gelbliches Serum, und am Grunde ein dichter Absatz von gröberen Eidotterpartikelchen. Diese Erscheinung ist die Wirkung einer Fermentthätigkeit der Pilze, welche Gerinnungen des Eiweisses veranlasst. Die ganze obere rahmartige Schichte besteht aus Eiweissgerinnseln, deren Schwimmfähigkeit auf einen relativ beträchtlichen Gehalt an mechanisch eingeschlossenem Fett schliessen lässt.

Die mikroskopische Untersuchung liefert ein höchst merkwürdiges Ergebniss. Je mehr die Erscheinungen ausgebildet sind, umsomehr Pilze findet man an der milchig werdenden Oberfläche. Zuletzt, wenn die Rahm-artige Schicht sich völlig entwickelt hat, ist die Menge der Pilze in jedem der Oberfläche entnommenen Präparat eine ausserordentlich grosse, so dass beinahe an eine wirkliche Pilzhaut gedacht werden kann. Die Formen dieser Pilze sind wesentlich diejenigen der Milzbrandbacterien, nur meist nicht unerheblich breiter. Je nach der Entwicklung der Cultur überwiegen entweder (in den früheren Stadien) die einfachen oder Doppelstäbchen (Breite 1,0—1,5 μ, Länge der einfachen Stäbchen 4,5 – 6,0 μ), oder (bei fortgeschrit-

tener Entwicklung) längere mehrgliedrige Fadenstücke, hie und da auch lange Fäden. In manchen Fällen kann ein Präparat von der Oberfläche ganz täuschend das Aussehen einer Probe aus der Milz eines milzbrandigen Thieres zeigen, da die längeren Stäbe und Fadenstücke, wie dort zwischen die Gewebselemente, so hier zwischen die Eiweissgerinnsel verfilzt sind. Die Contouren der Stäbchen und Fäden sind ebenso zart wie jene der Milzbrandbacterien. Ihre Enden sind in frischem Zustande abgerundet, nach dem Antrocknen und Färben mit Anilinbraun scharf abgesetzt, aber nicht schwach verdickt wie jene der Milzbrandbacterien. Der wichtigste Unterschied gegenüber den letzteren besteht aber darin, dass diese Stäbe nun Eigenbewegungen zeigen. Diese Bewegung ist nicht so rasch, dass sie als Schwärmen bezeichnet werden könnte. Die Pilze sind dabei immer noch ganz gut mit dem Mikroskop zu verfolgen, obwohl die Bewegung häufig den Charakter eines ruhelosen und lebhaften Umhersuchens annimmt. Allein die Ortsveränderungen können wegen der hemmenden Eiweissgerinnsel, an welche die Pilze fortwährend anstossen, nicht sehr bedeutend sein. Es kommt vor, dass das ganze Gesichtsfeld mit solchen umhersuchenden ganz gleichmässigen kurzen, sehr breiten Stäben erfüllt ist, und es gewährt dies einen sehr eigenthümlichen Anblick. Die Art der Eigenbewegung ist im Uebrigen die gleiche wie bei den Heubacterien: vor- und rückwärts Gehen und Rotiren um verschiedene und wechselnde Achsen, was bei den winkelig zusammenhängenden Doppelstäbchen den täuschenden Anschein der Schlängelung hervorruft.

Sehr auffallend ist in morphologischer Beziehung nur noch die Erscheinung, dass die Sporen dieser Pilze, die sonst in jeder Hinsicht den Sporen der Milzbrand- und Heubacterien analog sind, eine ganz ausserordentliche Länge im Verhältniss zum Querdurchmesser besitzen. Bei so

grossen Pilzformen und bei den jetzigen optischen Hülfsmitteln (ich benützte homogene Immersion $^1/_{18}$ Seibert) kann darüber, dass, was ich hier beschreibe, wirklich die Sporen sind, nicht der mindeste Zweifel bestehen. Denn die Beobachtung vermag, da sich in jedem der Eiweissgläser an der Oberfläche Sporen in ungeheurer Menge entwickeln, mit voller Zuverlässigkeit ausgeführt werden. Es beträgt die Länge der Sporen, welche sonst bei den Milzbrand-Heubacterien das dreifache des Querdurchmessers nicht überschreitet, hier bis zum fünffachen desselben (0,7 μ breit, 3,5 μ lang) wodurch anstatt der sonst vorhandenen Neigung zur Eiform wahre Sporen-Stäbchen entstehen; in allen anderen Beziehungen (starkes Lichtbrechungsvermögen, Entstehung in der Mitte der Zelle) besteht völlige Analogie mit den gewöhnlichen Sporen. Uebrigens sind keineswegs alle Sporen so lange gestreckt; vielmehr existiren Uebergänge von gewöhnlichen kürzeren zu jenen länglichen Formen, und oft kann man im selben Faden Sporen von verschiedener Länge beisammen sehen.

Zum Beweise, dass diese Pilzform, die ich — nur bis zur unten folgenden Feststellung ihrer Natur einstweilen — kurz als „Eiweissbacterien" bezeichnen will, aus den Milzbrandbacterien abstammt und nicht von Pilzen, die mit dem Eigelb zufällig eingeführt werden, theile ich folgende Versuche mit.

1) 20 Saftgläschen mit je: 20 ccm 0,5 Procent Fleischextract + 1 ccm Eigelb + 2 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge — davon 10 inficirt mit Milzbrand-Milz (zerrieben und mit pilzfreiem Wasser verdünnt), die 10 übrigen nicht inficirt.

Nach 36 Stunden: Controlgläser Aussehen unverändert, mikroskopisch keine Pilze zu finden. Von den inficirten Gläsern zeigen 6 eine ausgebildete obere Gerinnungsschichte,

4 nur einen milchigen Rand. In allen finden sich mikroskopisch die oben geschilderten „Eiweissbacterien."

2) 18 Saftgläschen je: 20 ccm 1 Procent Fleischextract + 1 ccm Eigelb + 2 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge — davon 9 inficirt mit Milzbrand-Milz wie oben, die übrigen 9 nicht inficirt.

Nach 36 Stunden: Controlgläser im Aussehen unverändert, mikroskopisch in 2 davon vereinzelte dünne Stäbchen, in den übrigen keine Pilze. Von den inficirten Gläsern 2 total milchig, 3 zeigen obere Gerinnungsschichte, 4 nur einen weisslich gelben Gerinnungsrand. In allen finden sich mikroskopisch „Eiweissbacterien."

3) 12 Saftgläschen je: 20 ccm 0,5 Procent Fleischextract + 1 ccm Eigelb, ferner zu je 4 und 4 Zusatz von 1, 2, 3 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge. Die Hälfte inficirt mit reincultivirten Milzbrandbacterien, die Hälfte nicht inficirt.

Nach 24 Stunden: Controlgläser Aussehen unverändert, in einem traubenförmig angeordnete Micrococcen, in einem anderen ein paar dünne kurzgliedrige Fäden gefunden, die anderen pilzfrei. Von den inficirten Gläsern, die mit 2 und 3 ccm Natronlauge versetzten milchig: „Eiweissbacterien." Die mit 1 ccm versetzten anscheinend unverändert; nach dem Umschütteln spärliche Milzbrandbacterien.

4) 15 Saftgläschen je: 20 ccm 0,5 Procent Fleischextract + 1 ccm Eigelb, ferner zu je 5 und 5 Zusatz von 2, 3, 4 ccm $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge, diesmal vor dem Erhitzen im Dampfkessel. 9 Gläser inficirt mit reincultivirten Milzbrandbacterien. 6 Gläser nicht inficirt.

Nach 36 Stunden: Controlgläser Aussehen unverändert, mikroskopisch keine Pilze. Von den inficirten Gläsern zeigen

die mit 2 ccm Natronlauge versetzten ausgebildete obere Gerinnungsschichte, die mit 3 ccm versetzten sind milchig, die mit 4 ccm unverändert. In allen, mit Ausnahme der letzteren mikroskopisch „Eiweissbacterien."

Zu diesen Versuchen bemerke ich noch, dass dieselben nicht etwa aus einer grösseren Zahl von mehr oder minder geglückten als die günstigsten ausgewählt sind, sondern, dass ich überhaupt keine misslungenen Versuche zu verzeichnen hatte. Der Erfolg tritt jedesmal ein, doch nicht immer bis zu demselben Grade; oft ist die Veränderung nur sehr gering ausgesprochen, kann aber alsdann durch eine zweite Züchtung in der gleichen Nährlösung sicher deutlich gemacht werden.

Aus diesen Resultaten geht, wie ich glaube, mit vollständiger und jeden Einwand ausschliessender Gewissheit hervor, dass die „Eiweissbacterien" direct von den Milzbrandbacterien abstammen. Gegen die Aussaat mit Milzbrand-Milz könnte man einwenden, dass hier möglicher Weise noch andere Pilze mit eingeführt werden. Durch die Aussaat reincultivirter Milzbrandbacterien in anderen Versuchsreihen wird dieses Bedenken beseitigt. Denn ich habe schon mehrfach hervorgehoben, dass gerade die Milzbrandbacterien, weil sie die Fleischextract-Lösung klar lassen, absolut sicher und überdiess sehr leicht reincultivirt werden können. Auch der Umstand, ob man die Natronlauge erst nach der Sterilisirung der Fleischextract-Lösung oder vorher zusetzt, ändert nichts an dem Erfolge.

Es handelt sich nun um die weiteren Eigenschaften der aus den Milzbrandbacterien erzielten Pilzform. Zur Erledigung dieser Frage müssen die „Eiweissbacterien" in verschiedene bekannte Nährlösungen übertragen werden.

1) Eiweisslösung. Bereitung wie oben mit Eigelb, jedoch ohne Zusatz von Alkali. Es zeigt sich

die wichtige Erscheinung, dass die „Eiweissbacterien" nunmehr die Fähigkeit besitzen, auch in nicht alkalischer Eiweissflüssigkeit genau dieselben Veränderungen hervorzurufen, wie die Milzbrandbacterien nur bei Alkalizusatz, d. h. Bildung einer weissgelblichen, Rahm-artigen schwimmenden Gerinnselschichte mit stärkster Pilzvermehrung an der Oberfläche. Das Wachsthum ist dabei ein ungemein rasches und die Veränderung nach 20 Stunden jedesmal schon auf ihrem Höhepunkt; die Pilze sind also nunmehr auf diese Ernährungsweise angepasst. Bemerkt muss werden, dass jedesmal im Gefolge dieser intensiven Pilzentwicklung die Cultur einen schwach fauligen Geruch erhält (wie älterer Schweizerkäse, aber keine Beimengung von H_2S). Dass keine Fäulnissbacterien vorhanden sind, ergibt nicht nur die mikroskopische Untersuchung, sondern vor Allem die Controlzüchtung in verschiedene klare Nährlösungen. Es ist ganz sicher, dass diese Production flüchtiger Riechstoffe nur der chemischen Thätigkeit der „Eiweissbacterien" zugeschrieben werden darf. Ich habe mich in sehr vielen Fällen ganz bestimmt von diesem Sachverhalte überzeugt.

2) Fleischextractlösung, 1 procentig. Das Wachsthum gestaltet sich nach Ablauf der Entwicklung genau so wie es oben in der Uebersicht für die Uebergangsform II angegeben wurde. Zu erwähnen ist, dass bei dieser Ernährungsweise die Sporen nicht mehr so lang gestreckt sind wie im Eiweiss, sondern die gewöhnlichen Dimensionen der Milzbrand-Heusporen besitzen.

3) Heuaufguss (nach Roberts; 1,004 sp. G.) schwach sauer. Verhalten ebenso wie bei Uebergangsform II. Spärliches Wachsthum mit Randbildung.

4) Thierkörper; weisse Mäuse. Von 10 Mäusen wurden 2 mit je 1 cmm einer mit pilzfreiem Wasser durch

Zerreiben 100 fach verdünnten Milzbrand-Milz inficirt. Tod an Milzbrand nach 20 und 24 Stunden. Von dem gleichen Infectionsmaterial wurde in Eiweissgläschen mit Alkali ausgesät. Nach 24 Stunden noch ungenügende Pilzmenge. Desshalb übertragen in ein zweites Eiweissglas, diesmal ohne Alkali-Zusatz. Nach 20 Stunden an der Oberfläche wie immer ausserordentliche Menge milzbrandartiger Bacterien und Sporen. Von dieser oberflächlichen Schichte nunmehr je 20 cmm auf die 8 übrigen Mäuse subcutan übertragen. Alle diese Thierchen zeigten sich niemals krank und blieben am Leben.

Nehmen wir an, der Pilzgehalt der oberflächlichen Eiweissschichte sei halb so gross gewesen als jener der Milzbrand-Milz, was gewiss nicht zu viel ist, so ergibt sich hieraus, dass die in alkalischem Eiweiss gezüchteten Pilze eine mehr als tausendfache Abschwächung der infectiösen Wirksamkeit zeigen. Im Interesse der gegenwärtigen Frage lag es natürlicher Weise nicht, zu untersuchen, ob auch durch grösste Impfmengen nicht Milzbrand erzeugt werden könnte. Das negative Resultat mit dem tausendfachen der gewöhnlichen Impfmenge ist hier entscheidend; jeder Experimentator, der diese Versuche wiederholt, wird bestätigen können, dass die grössten für gewöhnlich als zulässig betrachteten Impfmengen von diesen veränderten Milzbrandbacterien unwirksam sind.

Damit, dass die Milzbrandbacterien in eine deckenbildende, mit Eigenbewegung begabte und infectiös sehr wenig wirksame Uebergangsform umgeändert sind, ist der wesentliche Theil der Ueberführung in die ächten Heubacterien erledigt. Die weitere Umwandlung vollzieht sich unter denjenigen Bedingungen, die ich in meiner früheren Mittheilung angegeben habe.

Zum Schlusse gebe ich eine Uebersicht der drei hier untersuchten Haupt-Pilzformen, woraus deren Wachsthumsverhalten in verschiedenen Medien zu entnehmen ist. Nach den Resultaten meiner Untersuchungen muss ich die ganz bestimmte Ueberzeugung aussprechen, dass diese drei Pilzformen lediglich Anpassungsformen ein und desselben Organismus, des Bacterium subtile sind[1]).

	Milzbrand-bacterien	Uebergangs-form II	Heubacterien
1 Procent Fleisch-extract	Lösung klar Wolken am Grund.	Lösung flockig getrübt, lockere, schleimige Decke, Flocken u. Deckenstücke am Grunde.	Lösung klar, feste, weisse, trockene, schwer unterzutauchende Decke.
Heuaufguss schwach sauer[2])	Keine Vermehrung	Bildung eines spärlichen weissen Randes an der Oberfläche der Flüssigkeit.	Trockene, schwer benetzbare, meist gerunzelte oder bestäubt aussehende Decke.
Thierkörper	In sehr geringer Menge infectiös: Milzbrand.	In tausendfacher Menge unwirksam; in noch grösserer infectiös: Milzbrand.	In den grössten Mengen unwirksam.

1) Auf die morphologischen Fragen werde ich, wie erwähnt, in einer demnächstigen Mittheilung eintreten. Auf das absprechende Urtheil, welches neuerdings über meine Untersuchungsresultate gefällt wurde, beabsichtige ich an anderm Ort eine eingehende Beantwortung zu geben.

2) Die Bereitung des Heuaufgusses ist hier nach dem oben S. 149 angegebenen Verfahren vorausgesetzt.