

Sitzungsberichte

der

mathematisch - physikalischen Classe

der

k. b. Akademie der Wissenschaften

zu München.

Band X. Jahrgang 1880.

München.

Akademische Buchdruckerei von F. Straub.

1880.

In Commission bei G. Franz.

Nachtrag zur Sitzung vom 7. Februar 1880.

Herr v. Nägeli übergiebt und bespricht nachstehende Abhandlung:

„Ueber die experimentelle Erzeugung
des Milzbrandcontagiums aus den Heu-
pilzen“ von Dr. Hans Buchner.

Die Annahme, dass bestimmte Spaltpilzformen als Ursache der Infectionskrankheiten zu betrachten seien, brachte zunächst noch keine Aufklärung über den Ursprung der Contagien. Denn es gelang nicht, contagiös wirkende Schizomyceten in der Natur aufzufinden, während andererseits die gelegentliche spontane Entstehung mancher contagiöser Krankheiten doch unbezweifelt feststand. Erst die durch Nägeli auf Grund allgemeiner physiologischer Thatsachen aufgestellte Theorie von der functionellen Anpassung der Spaltpilze als Krankheitserreger gewährte eine befriedigende Vorstellung über diese Fragen.

Von diesem Gesichtspunkte ausgehend wurde die folgende experimentelle Untersuchung unternommen, welche in dem pflanzenphysiologischen Institut des Herrn Professor v. Nägeli ausgeführt worden ist. Dieselbe hat den erwarteten genetischen Zusammenhang derjenigen Pilze, welche das Milzbrandcontagium bilden, mit einer bestimmten, natürlich und in grosser Verbreitung vorkommenden, an und für sich nicht infectionstüchtigen Pilzform, und die Möglichkeit wechselweiser Umwandlung der einen in die andere ergeben.

Diese verwandte Form bilden die sogenannten Heupilze, welche in Heuaufgrüssen sich finden und vor den übrigen, dort vorkommenden Schizomyceten dadurch ausgezeichnet sind, dass sie bei mehrstündigem Kochen solcher Aufgrüsse ihre Lebensfähigkeit bewahren, während alle übrigen Formen getödtet werden. Hiedurch bietet sich ein einfaches Mittel, dieselben rein zu cultiviren und auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. Es zeigt sich denn, dass weitgehende Analogien im morphologischen und chemischen Verhalten zwischen diesen Heupilzen und den Bacterien des Milzbrandes vorhanden sind.

Die morphologische Uebereinstimmung war schon seit einigen Jahren (zuerst durch F. Cohn) bekannt. In beiden Fällen finden sich cylindrische Stäbchen oder Fäden von $0,6 - 1,2 \mu$ Breite, an denen entweder unmittelbar oder durch Jodtinctur, Eintrocknen etc., oder erst nach Einwirkung einer bestimmten, hiezu geeigneten Ernährungsweise die Zusammensetzung aus Gliedern erkannt wird, deren Länge bald dem Breitendurchmesser entspricht, bald um das 2—3fache denselben übertrifft. Die kürzeren Glieder entsprechen je einer einzelnen, die längeren je zwei, noch unvollständig getrennten Zellen.¹⁾ Charakteristisch ist dabei das Vorkommen von Winkel-Stäbchen, welche aus je zwei, an den Enden noch lose zusammenhängenden, und in einem stumpfen Winkel gegen einander geneigten, einfachen Stäbchen bestehen. Die Sporenbildung erfolgt in der Weise, dass die Zellen sich ein wenig in die Länge strecken

1) Diess ist der Grund, wesshalb Cohn's Bezeichnung dieser Pilzformen als „Bacillen“ hier nicht beibehalten wird, da mit diesem Namen die irrige Vorstellung verknüpft ist, als beständen die Stäbchen je aus einer einzigen langgestreckten Zelle. — Die Behauptung A. Frisch's, dass die Milzbrandstäbchen nicht cylindrische, sondern platte bandförmige Gebilde seien, beruht auf Täuschung, wie sich beim Rollenlassen der Pilze unter dem Mikroskop leicht ergibt.

und dann die stark lichtbrechende, etwas längliche Spore in ihrem Inneren entwickeln.¹⁾ Die physiologische Ursache der Sporenbildung aber liegt in dem eintretenden Mangel an Ernährungsmaterial.

In chemischer Hinsicht ist beiden Formen ein hohes Sauerstoffbedürfniss und ausserdem noch eine Reihe anderer Merkmale gemeinsam. Zur Ernährung dienen beiden am besten Eiweiss und peptonartige Substanzen, während einfachere Verbindungen, beispielsweise weinsaures Ammoniak, auch bei Zuckerzusatz, dazu nicht geeignet sind. Die Zersetzung der Nährsubstanzen, welche in Folge des Wachstums der Pilze eintritt, zeigt mit der Fäulniss mannigfache Analogien, ohne jedoch mit ihr identisch zu sein. Vorhandene Formelemente, z. B. Muskelfasern, zerfallen wie dort zu einem Brei von schmutziggrauer Farbe; die Reaction der Lösung wird stark alkalisch, und theilweise finden sich auch die nämlichen krystallinischen Zersetzungsproducte. Ebenso wie dort bilden sich Stoffe, die auf den Thierkörper als chemische Gifte wirken, in ähnlicher Weise wie das putride Gift. Im Gegensatze zur Fäulniss aber wird hier kein eigenthümlich widriger, sondern nur ein rein ammoniakalischer Geruch wahrgenommen, der unter Umständen sehr intensiv sein kann. Milhzucker wird von diesen Pilzformen nicht vergoren. Dagegen gelangen Fermente zur Ausscheidung, die coagulirtes Albumin zu lösen im Stande sind. Eiweisswürfel in Flüssigkeiten, welche Reinculturen von Heu- oder Milzbrandbakterien enthalten, werden nach einiger Zeit durchscheinend und zerfallen nach und nach vollständig.

In allen diesen Beziehungen verhalten sich beide Pilz-

1) Es ist durchaus unnöthig, dass die Stäbchen, wie Koch (Beiträge zur Biologie der Pflanzen von F. Cohn II. 3. H. 1877) meint, vor der Sporenbildung erst zu langen Fäden auswachsen müssten. Auch die kürzesten Stäbchen können Sporen entwickeln, wenn die Bedingungen dazu gegeben sind.

formen in gleicher Weise. Dennoch existirt aber eine Reihe von unterscheidenden Merkmalen. Bezüglich des Wachsthum's zeigt sich, dass bei ruhender Nährlösung die Milzbrandbakterien stets am Boden in Form zarter Wolken vegetiren, während die Heupilze durch eine besondere Neigung und Fähigkeit zur Bildung fester und oberflächlich trockner Decken ausgezeichnet sind. Diese sehr auffallende Verschiedenheit ist für die Beurtheilung, mit welcher der beiden Pilzformen man im gegebenen Falle zu thun habe, von grosser Bedeutung. Physiologisch wichtiger aber ist der Unterschied in den quantitativen Verhältnissen des Wachsthum's.

In dieser Beziehung lehren die Versuche, dass in künstlichen Nährlösungen die Heubakterien stets reichlicher vegetiren als die andern. Bei gleichzeitiger Aussaat gleicher Mengen von Heupilzen und Milzbrandbakterien in gleiche Quantitäten von Nährlösung findet sich in jedem Zeitabschnitt die Menge der gebildeten Heubakterien grösser als diejenige der andern Pilzform. Und dieses Verhältniss bleibt dasselbe, wenn auch in beiden Fällen die Nährlösungen continuirlich geschüttelt werden, wodurch jeder Unterschied hinsichtlich der Sauerstoffzufuhr hinwegfällt. Denn bei Ruhe wären allerdings die deckenbildenden Heupilze in dieser Beziehung gegenüber den anderen bevorzugt.

Zweierlei Thatsachen dienen zur Erläuterung dieses Verhaltens. Erstens vermögen die Heubakterien nicht nur Eiweiss resp. Pepton, sondern auch gewisse einfachere krystallisirende Verbindungen noch zu assimiliren, wie z. B. Leucin und Asparagin, welche den Milzbrandbakterien unzugänglich sind, und sie werden auch durch Zuckerzusatz zur Nährlösung sehr begünstigt, während derselbe auf die Menge der sich bildenden Milzbrandbakterien ohne wahrnehmbaren Einfluss bleibt. Letztere haben desshalb nur eine äusserst beschränkte Auswahl von Nahrungsstoffen, da ihnen fast

nur Eiweiss und Pepton zu taugen scheint. Zweitens zeigen sich die Heubacterien bei weitem widerstandsfähiger gegen nachtheilige Einwirkungen; sie ertragen, im Gegensatz zu den Milzbrandbacterien, eine bestimmte schwach saure und eine stark alkalische Reaction der Nährlösung noch ohne merkliche Behinderung des Wachstums¹⁾ und werden auch weniger benachtheiligt durch die Anwesenheit anderer schädlich wirkender Substanzen z. B. ihrer eignen Zersetzungsstoffe.

Die Wirkung dieser beiden Umstände wird in den meisten Fällen nicht von einander zu trennen sein. Uebrigens sind die Heupilze noch in einer andern Hinsicht ausgezeichnet, nämlich in der schon erwähnten Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperaturen, worin sie alle bekannten Organismen und namentlich die Milzbrandbacterien bei weitem übertreffen.

In allen diesen Beziehungen sind sonach die Heubacterien erheblich günstiger situirt als jene andern, und bei Aussaat beider Pilzformen in die nämliche künstliche Nährlösung dürfte man mit Sicherheit darauf rechnen, stets in Kurzem eine Ueberflügelung und Verdrängung der Milzbrandbacterien zu erhalten.

Merkwürdiger Weise kehrt sich aber dieses Verhalten vollständig um, sobald die beiden Pilzformen in den leben-

1) Das verschiedene Verhalten gegen geringe Säuremengen bietet ein weiteres Mittel zur Unterscheidung beider Pilzformen. Eine Lösung von passendem Säuregrad ist z. B. kaltbereiteter, während einiger Zeit auf 110–120° C. (zur Tödtung aller Pilze) erhitzter Heuaufguss. In dieser Flüssigkeit vermehren sich ausgesäte Heupilze rasch und reichlich, und es erfolgt jedesmal die Bildung einer trocknen, gekräuselten Decke, die vorzugsweise aus Sporen besteht. Milzbrandbacterien dagegen sind überhaupt unfähig, in dieser, wenn auch nur sehr schwach sauren Lösung sich zu vermehren, und es entsteht desshalb keine Vegetation, mag man auch die Aussaat derselben beliebig oft wiederholen.

den thierischen Organismus gebracht werden. Während die Heubakterien, zum Wachsthum unfähig, wie eine todte Masse im Gewebe liegen, und etwa durch Eiterung eliminirt werden oder, in's Blut eingespritzt, spurlos zu Grunde gehen, so finden die Milzbrandbakterien im Gegentheil gerade dort ihre günstigste Vermehrungsstätte. Bei geeigneten Thierarten zeigt sich, dass jedesmal auf die Einbringung einer verhältnissmässig sehr geringen Anzahl dieser Pilze in den Körper innerhalb bestimmter, kurzer Zeit der Tod des Thieres erfolgt, und dass dann im Blute, namentlich aber in gewissen Organen die Milzbrandbakterien sich ganz ausserordentlich vermehrt haben.

Um nun die Frage des genetischen Zusammenhangs dieser beiden Pilzformen aufzuhellen, war es nöthig, die Constanz der Eigenschaften zu prüfen. Hiezu aber waren Reinculturen erforderlich, zu denen es bei den Milzbrandbakterien erst eines besondern Verfahrens bedurfte. Es scheint mir vor allem nöthig, auf diesen Punct etwas näher einzugehen.

Methoden der Reincultur.

Bisher sind hauptsächlich zwei Methoden zur Gewinnung von Reinculturen pathogener Pilze angegeben und benützt worden.

Die eine ist die „Methode der fractionirten Cultur“ von Klebs. Sie besteht wesentlich in der fortgesetzten Uebertragung kleiner Mengen von Pilzflüssigkeit aus den abgelaufenen Culturen in neue pilzfreie Nährlösung. Auf diese Weise hofft Klebs, „etwaige Verunreinigungen, die in der Ursprungsflüssigkeit enthalten sein mögen, zu entfernen und denjenigen Körper rein zu erhalten, welcher in der ersteren in überwiegender Menge vorhanden war.“¹⁾

1) Archiv f. experimentelle Pathologie Bd. I. S. 46.

Es wird nöthig sein, auf die Voraussetzungen dieses Verfahrens mit einigen Worten einzugehen. Dabei sei bemerkt, dass unter den von Klebs erwähnten „Verunreinigungen“ jedenfalls nur vermehrungsfähige Organismen verstanden werden können, und zwar irgend welche Formen von Schizomyceten z. B. Fäulnisspilze, wie solche fast stets in grösserer oder geringerer Zahl in den pathologischen Flüssigkeiten und krankhaften Geweben sich vorfinden werden, von denen der Ausgang zur Gewinnung von Reinculturen pathogener Pilze zu nehmen ist. Angehörige einer andern Gruppe der niederen Pilze, z. B. die Schimmelpilze, auszuschliessen, dies ist durch die Wahl der Ernährungsbedingungen in der Regel so leicht, dass es hiezu keines besondern Verfahrens bedarf.

Das Zahlenverhältniss zweier Spaltpilzformen in der gleichen Cultur wird nun bestimmt, einmal durch die anfänglich vorhandene Individuenzahl der einen und andern Form, alsdann durch die Schnelligkeit der Vermehrung, welche für jede Pilzform von deren Organisation und von den besondern Ernährungsbedingungen des Versuchs abhängt. Setzen wir den mittleren Fall, dass beiderlei Formen gleichschnell ihre Zahl verdoppeln und demnach gleichviel Generationen in derselben Zeit zurücklegen, so ist ersichtlich, dass dann niemals auf dem Wege der fractionirten Züchtung eine Reincultur erzielt werden kann. In allen übrigen Fällen dagegen wird es allerdings, bei fortgesetzter Uebertragung kleiner Mengen der Züchtung in einen Vorrath neuer (als völlig pilzfrei vorausgesetzter) Nährlösung, dahin kommen müssen, dass der eine Organismus, nämlich der schneller wachsende, den andern schliesslich vollständig aus der Cultur verdrängt. Für diesen Erfolg ist es aber natürlich principiell gleichgültig, welches das Verhältniss der Individuenzahl beider Pilzformen in der Ausgangscultur gewesen. Nur die Zeit wird hiedurch beeinflusst, welche

unter sonst gleichen Umständen zur Verdrängung der einen Pilzform benöthigt ist.¹⁾

Es ergibt sich hieraus, dass die „Methode der fractionirten Cultur“ in der That in den allermeisten Fällen schliesslich zu einer Reincultur führen wird. Diese Reincultur aber enthält denjenigen Pilz, der unter den vorhandenen Bedingungen sich schneller vermehrt, und nicht, wie Klebs meint, denjenigen, der „in der Ursprungsflüssigkeit in überwiegender Menge vorhanden war.“

Sollte daher die erwähnte Methode ihren Zweck erfüllen, so müsste der pathogene Pilz jedesmal zugleich der schneller wachsende sein. Da man jedoch hiefür keine Sicherheit besitzt, schon desshalb weil die Verunreinigungen zufällige und darum ihrer Natur nach unbekannt sind, so ergibt sich, dass die „Methode der fractionirten Cultur“ zur Reinzüchtung pathogener Pilze unbrauchbar ist.²⁾

1) Um eine Vorstellung zu geben, wie rasch unter Umständen diese Verdrängung erfolgen kann, will ich ein bestimmtes Beispiel anführen. Es betrage die Generationsdauer der schneller wachsenden Pilzform 25 Minuten — eine Zahl, die als Durchschnittswerth für die gewöhnlichen Fäulnisbakterien aus vielfachen, mit Dr. Walter Nägeli gemeinschaftlich angestellten Versuchsreihen erhalten wurde, jene der langsamer wachsenden dagegen 40 Minuten. In diesem Falle zeigt sich, dass, selbst unter der Annahme einer tausendmillionenmal grösseren Menge der langsamer wachsenden Form in der Ausgangsflüssigkeit, dennoch bei häufiger (etwa 10maliger) Umzüchtung schon nach 80 Stunden eine nahezu vollständige Verdrängung dieser letzteren Pilzform aus der Cultur stattfindet.

2) Die Milzbrandbakterien vermehren sich in allen künstlichen Nährlösungen langsamer als die gewöhnlichen Fäulnis pilze, wesshalb die Anwesenheit der letzteren in einer Züchtung von Anthraxpilzen bei fractionirter Cultur stets eine Verdrängung der pathogenen Pilze zur Folge hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch andere Krankheitspilze in dieser Beziehung den Milzbrandbakterien sich analog verhalten, weil sie ja stets an die Ernährungsverhältnisse im thierischen Körper und nicht an künstliche Nährlösungen angepasst sind.

Eine zweite Methode ist die neuerdings von Pasteur¹⁾, speciell zur Reincultur der Milzbrandbakterien in Anwendung gebrachte. Anthraxkranken Thieren wurde unter gewissen Vorsichtsmassregeln gegen das Eindringen fremder Keime, nach einem schon seit 1863 geübten Verfahren, Blut entnommen, und davon eine kleine Menge zur Aussaat in pilzfreen Harn verwendet.

Es ist kein Zweifel, dass Pasteur wirkliche Reinculturen der genannten Pilze erhalten hat, da er das sicherste Kennzeichen derselben erwähnt, nämlich das mit blossen Auge erkennbare Wachsthum der Pilze „en filaments tout enchevêtrés, cotonneux“ (verwickelte, wollige Fäden), ohne dass die in den Zwischenräumen dieser Fäden (die aus ganzen Bündeln von Pilzfäden bestehen) befindliche Flüssigkeit nur im geringsten getrübt wäre. Diese Trübung müsste nämlich eintreten, wenn andere, sich vermehrende und in der Lösung umherschwimmende Schizomyceten, z. B. Fäulnisspilze, wie sie gewöhnlich die Verunreinigungen bilden, zugegen wären.

Gleichwohl mangelt diesem Verfahren die wünschenswerthe Sicherheit und eine allgemeine Anwendbarkeit. Denn zu seinem Gelingen wird erfordert, dass in der ursprünglichen Blutportion kein einziger fremder Pilz zugegen sei, der sich bei der Züchtung rascher vermehren könnte als der pathogene. Ausserdem ist die Methode nur dann ausführbar, wenn die Pilze im Blute sich finden, und auch für diesen Fall nur bei grösseren Thieren, deren Blutgefässe die nöthigen Dimensionen besitzen.

Aus diesen Gründen habe ich ein anderes Verfahren in Anwendung gebracht, welches die erwähnten Nachtheile nicht besitzt. In der Milz von Thieren, die an Anthrax

1) Comptes rendus Bd. 84. S. 900.

verendet sind, finden sich Milzbrandbakterien in grosser Zahl und jedenfalls bei weitem in überwiegender Menge gegen andere, zufällig anwesende Spaltpilze. Es ist also nur erforderlich, die Milzpulpa zu zerreiben und mit pilzfreiem Wasser so hochgradig zu verdünnen, dass auf einen nicht zu kleinen Raumtheil, z. B. 10 cmm, nur mehr durchschnittlich je ein einziger Pilz trifft. Nimmt man nun diese letztere Menge zur Infection der Nährlösung, so ist der eine Pilz, den man damit durchschnittlich zur Aussaat bringt, höchst wahrscheinlich von derjenigen Form, die in der Milz bei weitem in Uebersahl vorhanden war d. h. also ein Anthraxpilz.¹⁾

Dieses Isolirungsverfahren hat mir in der That sehr brauchbare Resultate und nur selten einen Misserfolg ergeben. Die Erlangung einer Reincultur von Milzbrandbakterien kann nach den oben gemachten Bemerkungen mit voller Sicherheit constatirt werden, weil das Wachsthum dieser Pilze in eigenthümlicher, schon dem blossen Auge erkennbarer Weise erfolgt.

Eine klare, pilzfreie Nährlösung, z. B. von 0,5 Procent Liebig'schem Fleischextract, die mit hoher Verdünnung von zerriebener Anthraxmilz infectirt wurde, zeigt bei Körpertemperatur folgendes Verhalten. Nach Ablauf von etwa

1) Sobald die richtige Grenze der Verdünnung überschritten wird, bleibt natürlich ein Theil der Aussaaten erfolglos, weil kein Pilz mehr durch dieselben übertragen wurde. Hierin bietet sich, nebenbei bemerkt, ein Mittel, um die Menge der Pilze im Ausgangsmateriale zu bestimmen. Wenn z. B. von einer grösseren Zahl gleichzeitiger Aussaaten die Hälfte ohne Erfolg bleibt, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass in dem zu den Infectionen verwendeten Raumtheil der Verdünnung noch ein Pilz vorhanden war, gleich $\frac{1}{2}$. Aus dieser Grösse und der bekannten Verdünnungszahl lässt sich die ursprüngliche Pilzmenge berechnen. Beispielsweise habe ich in einem bestimmten Falle den Bacteriengehalt der Milz einer an Anthrax verendeten Maus zu $7\frac{1}{2}$ Millionen im Cubikmillimeter gefunden.

18 Stunden erscheinen die ersten Spuren der Vegetation in Gestalt vereinzelter, zierlich gekräuselter Wölkchen am Boden der völlig klaren Flüssigkeit. Allmählig breiten sich diese nun aus und überdecken den ganzen Boden des Gefässes mit einer zarten, leicht beweglichen Wolke von geringer Höhe. Damit ist die Vegetation zu Ende. Modificationen dieses Vorganges treten nur insoferne ein, als sehr häufig schon frühzeitig gekräuselte Ranken, welche aus Bündeln von Milzbrandfäden bestehen, von den am Boden lagernden Wolken sich erheben und die klare Flüssigkeit mit einem ungemein zierlichen Flechtwerk durchziehen. Eine geringe Erschütterung genügt schon, diese zarten Bildungen zu zerstören. Ihr Aussehen stimmt vollständig überein mit der oben citirten Beschreibung, welche Pasteur von den mit blossen Auge wahrnehmbaren „verwickelten, wolligen“ Fäden gibt, die sich bei seinen Reinculturen der Milzbrandbakterien in der vollständig klaren Nährlösung gebildet hatten.

Diese zierlichen Gebilde sind so charakteristisch, dass sie bei einiger Uebung kaum mit irgend welchen Vegetationserscheinungen anderer Pilze verwechselt werden können. Die mikroskopische Untersuchung ergibt, dass dieselben ausschliesslich aus Stäbchen oder Fäden des Anthraxpilzes bestehen. Ungemein viel sicherer zeugt aber das fortwährende Hellbleiben der Nährlösung dafür, dass keine fremden Schizomyceten, insbesondere keine vermehrungsfähigen Fäulniss- oder Heu-Pilze zugegen sind. Denn ein einziges ursprünglich vorhandenes Individuum der letzteren Formen müsste sich sehr bald soweit vermehrt haben, dass dadurch, in Folge des Umherschwimmens dieser Pilze, Trübung der Nährlösung bewirkt würde.

Als Anhang zum Vorausgehenden scheint es mir nöthig, einige Bemerkungen über die bei der Pilzzüchtung erforder-

lichen Vorsichtsmaassregeln zu machen, hauptsächlich deshalb, weil die Methodik der Pilzculturen noch sehr im argen liegt, und die richtigen Grundsätze noch keineswegs allgemeine geworden sind.

Häufig wird schon der Fehler begangen, dass man Gefäss, Nährlösung und Verschlusspfropf, jedes für sich, desinficirt und erst nachträglich das ganze vereinigt, wobei staubhaltige Luft miteingeschlossen werden kann. Dass Erwärmen auf 60 oder 80° C. oder auch auf Siedehitze zur vollständigen Desinfection, d. h. zur Tödtung aller Pilze nicht genügt, darf jetzt wohl als bekannt gelten. Ich brauche in dieser Beziehung nur daran zu erinnern, dass die Heupilze selbst durch vielstündiges Kochen ihre Lebensfähigkeit nicht verlieren.

Eine Quelle möglicher Fehler liegt stets im Oeffnen der Züchtungsgefässe zum Zwecke der Einbringung der Aussaat. Indess ist diese Gefahr bei weitem geringer, als man gewöhnlich annimmt; sie scheint nur deshalb so gross, weil alle Verunreinigungen, die in Folge ungenügender Desinfection der Züchtungsgefässe oder der zur Aussaat gebrauchten Instrumente u. s. w. auftreten, in der Regel auf das Eindringen von Pilzstäubchen aus der Atmosphäre zurückgeführt werden. Nun ist aber der Pilzgehalt der Luft überhaupt nicht so sehr bedeutend. Bei messenden Versuchen ergab sich derselbe für den Arbeitsraum, in welchem diese Untersuchungen ausgeführt wurden, durchschnittlich zu 10 Spaltpilzen im Liter.¹⁾ Dann ist zu bedenken, dass Pilze und pilzführende Stäubchen in Folge ihrer Kleinheit in der Luft nur äusserst langsam herabsinken und von den leisesten Luftströmungen schon in die Höhe getragen werden. Während der kurzdauernden

1) Im Freien zeigte sich derselbe weit geringer.

Oeffnung des Züchtungsgefässes könnten dieselben daher jedenfalls nur eine ungemein kleine Strecke herabsinken, und von einem eigentlichen Hineinfallen kann offenbar gar keine Rede sein. Ihr Eindringen ist vielmehr nur dadurch möglich, dass sie mit der Luft, in welcher sie schweben, zugleich in die Züchtungsgefässe gerathen. Gefahr wäre also vorhanden, wenn grössere Luftquantitäten während der Oeffnung des Culturapparates in dasselbe eintreten. Dies ist aber bei enghalsigen und ziemlich kleinen Gefässen, wenn sie die Temperatur der umgebenden Luft besitzen, nicht zu befürchten.¹⁾

Um übrigens die Brauchbarkeit des gewöhnlichen Verfahrens der Uebertragung der Reinculturen von Glas zu Glas zu illustriren, theile ich einen Versuch mit, den Herr Dr. Max Gruber im selben Raume ausgeführt hat, in welchem meine Experimente unternommen worden waren. Aus 4 pilzfreien Züchtungsgefässen mit einer Lösung von 0,5 Procent Fleischextract wurde in 46 ebensolche pilzfreie Gefässe je eine kleine Flüssigkeitsmenge, genau wie sonst bei den Aussaaten, übertragen. Alle 50 Gläser kamen dann in den Brütöfen. Nach 5 Tagen waren alle klar und ohne Pilzvegetation. In keinem dieser 50 Fälle wäre daher, bei Uebertragung von Reinculturen, ein Pilz aus der Luft störend dazwischen gekommen.²⁾

1) Je staubfreier der Arbeitsraum gehalten werden kann, desto besser; nasser Boden und feuchte Wände wären am günstigsten. Die Anwendung des antiseptischen Spray dagegen, die einige Pilzforscher von den Chirurgen entlehnt haben, ist hier völlig unzweckmässig. Dieses Verfahren kann nur den Erfolg haben, einen Theil der in der Luft befindlichen Pilzstäubchen zu benetzen und dadurch zum sofortigen Niederfallen zu bringen, wodurch gerade das Umgekehrte von dem Gewünschten erreicht wird. Denn an eine Tödtung der Pilze durch kurzdauernde Berührung mit der antiseptischen Flüssigkeit ist nach den darüber angestellten Versuchen nicht zu denken.

2) Eine Beobachtungsdauer von 5 Tagen genügt zu dieser Ent-

Die Gefahr einer Verunreinigung durch Luftpilze ist also, bei richtigem Verfahren, sehr gering; trotzdem ist dieselbe stets vorhanden, und kann desshalb Sicherheit nur durch fortwährende Controle erlangt werden, die bei den Milzbrandbakterien durch die erwähnten, mit blossen Auge wahrnehmbaren Merkmale der Reinculturen und durch die charakteristischen Formen dieser Pilze unter dem Mikroskop sehr erleichtert ist. Zur fortgesetzten Cultur der Milzbrandbakterien habe ich mich übrigens eines Apparates bedient, der jene Gefahr vermied, indem er die Uebertragung der Pilze in neue Nährlösung im pilzfreien Raume ermöglichte.

Derselbe bestand aus einem grossen Gefässe zur Aufnahme der Reservenährlösung und einem kleinen, durch einen seitlichen Tubus damit verbundenen Züchtungsgefäss, in welches aus dem Reserveglas, durch einfaches Neigen des letzteren, Nährlösung zufließen konnte. Die nach aussen führenden Oeffnungen beider Gefässe wurden pilzdicht verschlossen, das ganze im Dampfkessel keimfrei gemacht.

scheidung vollständig, weil die Uebertragung der Reinculturen jedesmal sogleich nach Beendigung des Wachstums, also spätestens nach 2 Tagen ausgeführt wird. Ein anderes ist es mit der weiteren Frage, ob in jene 50 Gläser absolut keine lebensfähigen Keime aus der Luft gelangt waren. Hiezu bedarf es einer viel längeren Beobachtungsdauer, weil die im Zimmerstaub vorkommenden Pilze in Folge von Austrocknung etc. meist sehr geschwächt sind und desshalb oft lange zu ihrer Erholung und zum Eintreten eines merklichen Wachstums bedürfen. In der That hatte sich im angeführten Falle nach 18 Tagen in 3 von den 50 Gläsern eine spärliche Pilzvegetation entwickelt, während die übrigen 47 dauernd klar blieben. Es ist also stets zu bedenken, dass das Hineinfallen eines Pilzstäubchens in die Züchtung noch keineswegs die Reinheit derselben für die Folge zu vernichten braucht. Im Gegentheil werden in den allermeisten Fällen solche Luftpilze hinter den rascher wachsenden reincultivirten in der Vermehrung zurückbleiben und auf diese Weise wieder unschädlich eliminirt werden.

Hierauf inficirte ich das Züchtungsgefäß unter kurzdauernder Oeffnung des Verschlusses mit einer Reincultur von Milzbrandbakterien. Von da an brauchte dieser Verschluss nicht mehr geöffnet zu werden. Nach Ablauf der Vegetation im Züchtungsgefäße konnte die Pilzflüssigkeit aus dessen Boden durch eine verschliessbare, enge Oeffnung abgelassen werden, die weder ein Eintreten von Luft noch einen Rücktritt der abgelassenen Pilzflüssigkeit gestattete und daher jedem fremden Pilze den Eingang verwehrte. Die dabei im Züchtungsgefäß zurückbleibenden Reste der Pilzflüssigkeit dienten jedesmal zur weiteren Infection der aus dem Reserveglas hinzugegebenen Nährlösung. Solange diese Reservenährlösung reichte, konnte mit dem Apparate fortgezüchtet werden; bei täglich 1- bis 2-maliger Zugabe neuer Nährlösung dauerte dies mitunter bis zu $1\frac{1}{2}$ Monaten.

Umänderung der Milzbrandbakterien in Heubakterien.

Unter Anwendung dieses Verfahrens liess ich reine Milzbrandbakterien in Lösungen von Fleischextract, mit oder ohne Pepton- oder Zuckerzusatz bei einer Temperatur von $35-37^{\circ}$ C. sich vermehren. Da diese Pilze bei Ruhe nur am Grunde der Flüssigkeit vegetiren, wodurch eine ungleichmässige Ernährung bewirkt würde¹⁾, so bediente ich mich eines Schüttelapparates, der dem Züchtungsgefäß eine constante Bewegung ertheilte. Hiedurch war zugleich für eine reichlichere Zufuhr von Sauerstoff Sorge getragen. Mit den erhaltenen Pilzflüssigkeiten wurden fortlaufende Infectionsversuche bei weissen Mäusen gemacht, die für Milzbrand sehr empfänglich sind, und überdies keine merk-

1) Die obersten Schichten der Pilze sind alsdann in Bezug auf Sauerstoff und andere Ernährungsmaterialien ungünstiger situirt als die untersten.

liche Verschiedenheit der individuellen Disposition für diese Krankheit erkennen lassen.¹⁾

Das Ergebniss dieser Züchtungsversuche mit parallelen Impfungen bestand merkwürdiger Weise zunächst darin, dass die infectiöse Wirksamkeit der Pilze um so geringer wurde, je mehr Generationen dieselben in der künstlichen Nährlösung zurückgelegt hatten. So oft auch der Versuch von vorne d. h. mit einer vom Thiere her direct gewonnenen Reincultur sehr wirksamer Bacterien begonnen wurde, so war doch dieses Resultat immer das gleiche; trotz der vollkommenen morphologischen Uebereinstimmung aller durch die Züchtung erhaltenen Pilze, trotzdem bei der völligen Gleichheit ihres chemischen Verhaltens und ihrer Wachstumsweise nicht der geringste Zweifel über die Abstammung der unwirksamen von den wirksamen existiren konnte, so zeigte sich doch bei allen diesen Versuchen, dass die anfangs positiv ausfallenden Impfungen nach einiger Zeit keinen Erfolg mehr hatten.

So ergab ein Versuch mit Züchtung der Milzbrandbakterien in einer Lösung von 10 Theilen Liebig'schen Fleischextracts und 8 Theilen Pepton auf 1000 Wasser, dass die Impfungen mit der 1., 2., 3. und 4. Pilzzüchtung

1) Die Methodik dieser Infectionsversuche war folgende: In die Rückenhaul wurde ein kleiner Schnitt gemacht, mit stumpfer Sonde eine Tasche unter der Haut gebildet, und in diese das ringförmig eingebogene Ende eines Drathes eingeführt, in dessen Oeffnung eine bestimmte Menge durch Adhäsion und Cohäsion (in Form eines Doppelmeniscus) festgehaltner Pilzflüssigkeit sich befand. Die Infectionsinstrumente wurden vor jeder Operation ausgeglüht. — Zur Constatirung des Milzbrandes dient die mikroskopische Untersuchung von Milz und Lunge, in welchen sich beim Anthrax der Mäuse die ihrer Grösse und besondern Form wegen leicht erkennbaren Milzbrandbakterien massenhaft angehäuft finden. Unter Umständen wurden auch Controlimpfungen und Weiterzüchtungen der aufgefundenen Pilze ausgeführt.

sämmtlich Milzbrand erzeugten, jene dagegen mit der 5., 6., 7. und 8. kein positives Ergebniss hatten, soferne bei diesen die gleiche Pilzmeng e wie bei den ersteren zur Anwendung kam. Anders gestaltete sich dieses Verhältniss, wenn bei den späteren Impfungen zur Verwendung grösserer Impfmengen übergegangen wurde.

In einem Versuche mit Ernährung durch blosse Fleisch-extractlösung erwies sich beispielsweise bei Anwendung einer geringen Impfquantität die 1. Pilzzüchtung noch als wirksam, dagegen nicht mehr die 2. 3. und 4. bei der gleichen Menge. Als nun mit grösseren Pilzquantitäten geimpft wurde, war wieder wirksam die 5. Züchtung; unwirksam dagegen blieb schliesslich die 6. Ein anderesmal, bei Ernährung mit Fleischextract, Pepton und Zucker war die 2. Züchtung wirksam, unwirksam die 3. und 4.; wirksam dagegen wieder die 5., als bei dieser zu grösseren Impfmengen übergegangen worden war. Es zeigte sich denn auch, bei Anwendung dieser grösseren Pilzquantitäten einmal die 7., ein andermal die 18. Pilzzüchtung noch von Wirksamkeit, und endlich wurde selbst mit der 36. Cultur, welche in Fleischextractlösung bei Zusatz von Pepton und Zucker nach mehr als einem Monate erreicht worden war, noch tödtlicher Milzbrand erzielt. Im letzteren Falle wurden aber zur Impfung je 10 cmm des dichten, am Boden abgesetzten Pilzbreies verwendet, worin nach ungefäh rer Schätzung weit über 100 Millionen Pilze sich befanden. Kleinere Impfmengen dagegen blieben bei diesen späteren Culturen ohne jede bemerkbare Wirkung.

Diese unzweifelhafte Abnahme der infectiösen Wirksamkeit ist um so merkwürdiger, als gleichzeitig keine weitere wahrnehmbare Veränderung bei den Milzbrandbakterien eingetreten war. Nicht nur die morphologische Beschaffenheit zeigte sich bei der 36. Züchtung vollständig als die gleiche, die Sporenbildung verlief genau in derselben

Weise u. s. w.; auch das Verhalten bei Controlzüchtungen in verschiedene Nährlösungen liess hinsichtlich der Wachstumsart und der chemischen Eigenschaften keine bemerkbare Abweichung erkennen, so dass es nicht möglich gewesen wäre, auf anderem Wege als durch das Thierexperiment eine Verschiedenheit der künstlich gezüchteten von ächten Milzbrandbakterien darzuthun.

Es scheint vielleicht, als ob die schwache Wirksamkeit der späteren Pilzgenerationen, der compensirende Einfluss grösserer Pilzmengen am einfachsten durch die Annahme erklärt werden könne, es sei zur Erzeugung einer Infectiouskrankheit die Mitwirkung eines gelösten, aus dem thierischen Körper stammenden und nur dort entstehenden Stoffes, den man zweckmässig als „Krankheitsstoff“ bezeichnen kann, mit den Pilzen durchaus erforderlich.¹⁾

In der That stünde eine derartige Annahme, die schon von verschiedenen Seiten her als Auskunftsmittel in Betracht gezogen wurde, in Uebereinstimmung mit manchen physiologischen Thatsachen. Die Isolirungsversuche von Chauveau, Burdon-Sanderson, Davaine, ferner von Klebs und Tiegel, Pasteur u. A. widerlegten dieselbe nicht, oder zum wenigsten nicht vollständig. Diese Ver-

1) Es beruht auf irrthümlicher Verwechslung, wenn dieser hypothetische „Krankheitsstoff“ mit den eigenen Zersetzungsstoffen der Pilze zusammengeworfen wird. Die letzteren können selbstverständlich niemals völlig von den lebenden Pilzen getrennt werden, und es hätte dies auch gar keinen Sinn, weil eben der Pilz, sobald er in irgend einer Nährlösung wächst, diese Stoffe mit Nothwendigkeit stets von neuem erzeugt. Jener „Krankheitsstoff“ dagegen wäre eine Substanz, welche nur im erkrankten thierischen Organismus und aus Bestandtheilen desselben, entweder mit oder ohne directe Beihülfe der Pilze gebildet werden könnte.

suche zeigten zwar, dass die gelösten Antheile der Infectionsflüssigkeiten an und für sich, ohne die Pilze, die betreffende Krankheit nicht bewirken konnten; während der andere Theil der infectiösen Flüssigkeiten, welcher die Pilze enthielt, dies vermochte. Es war somit entschieden, dass die Pilze zur Infection durchaus nöthig seien. Eine andere Frage blieb es jedoch, ob die Wirksamkeit der Pilze nicht an die Anwesenheit eines gelösten „Krankheitsstoffes“ gebunden sei. Ich glaube nicht, dass in dieser Beziehung die Versuche jener Forscher etwas Entscheidendes aussagen konnten, obwohl mehrere der erwähnten Experimentatoren sich bemühten, durch wiederholtes Auswaschen die Pilze möglichst von den gelösten Substanzen der Infectionsflüssigkeit zu befreien, und obschon sie mit diesen möglichst reinen Pilzen positive Impfresultate erhielten.

Zum wenigsten blieb noch der Einwand übrig, dass die Pilze, entsprechend dem Verhalten anderer pflanzlicher Zellen, Stoffe aus der Nährlösung, in welcher sie leben, hier also aus der Infectionsflüssigkeit in ihr Inneres aufnehmen können, die in der Folge, bei Uebertragung in einen andern Organismus, die Pilze in ihrer krankmachenden Wirkung zu unterstützen im Stande sind. Solche im Zellinhalte aufgenommene Stoffe würden aber jedenfalls durch blosses Auswaschen nicht zu entfernen sein.

Es gibt, um diese Annahme zu widerlegen, soviel ich sehe, nur ein directes Mittel, nämlich die Züchtung der Infectionspilze durch viele Generationen in stets erneuten Nährlösungen, sowie sie eben hier durchgeführt wurde. Denn auf diesem Wege müssen nicht nur die ausserhalb der Pilze in der Flüssigkeit befindlichen, sondern ebenso auch die im Zellinnern vorhandenen, aus dem Thierkörper stammenden gelösten Stoffe, allmählig vollkommen eliminiert werden. Falls nun die infectiöse Wirkung der Pilze auch dann noch vorhanden ist, wenn keine in Betracht kommen-

den Spuren jener Stoffe mehr zugegen sein können, dann ist bewiesen, dass die Mitwirkung dieser Substanzen zur Erzeugung der Krankheit nicht erfordert wird. In dieser Beziehung sprechen aber gerade auf's deutlichste die im vorausgehenden mitgetheilten Versuche.

Nehmen wir an, die Milzen milzbrandiger Mäuse, von denen bei den gegenwärtigen Versuchen stets der Ausgang zur Erzielung der nöthigen Reinculturen von Anthraxbakterien genommen wurde, hätten ihrer ganzen Substanz nach nur aus „Krankheitsstoff“ bestanden; alsdann ist die Quantität des letzteren, welche noch in der positiv wirkenden Impfmenge enthalten sein konnte, aus der Grösse der vorausgegangenen Verdünnungen leicht zu berechnen.

Es zeigt sich dann für jenen Versuch, bei welchem die 7. Züchtung Milzbrand bewirkte, dass die hier im Impfmateriale möglicherweise noch vorhandene Menge von „Krankheitsstoff“ bereits unendlich gering ist. Die ursprüngliche Mischung der zerriebenen Milzsubstanz mit Wasser ergab hier eine 100000fache, die Einbringung dieser Menge in das erste Quantum von Nährlösung und jede der 6 Umcüchtungen je eine 1000fache Verdünnung. Daraus berechnet sich, dass die in der Impfmenge enthaltene Quantität von „Krankheitsstoff“ nur den hundertquadrillionsten Theil von derjenigen eines entsprechenden Stückchens der Milz betragen konnte. Da aber die Impfmenge in diesem Falle 10 cmm war, so belief sich die Quantität des geimpften „Krankheitsstoffes“ jedenfalls nicht auf mehr als den zehnquadrillionsten Theil eines Milligramm. Dies ist aber eine Grösse, die um mehr als das tausendfache hinter dem Gewichte eines Wasserstoffgasmoecüls zurückbleibt, und die somit für die chemische Betrachtung überhaupt nicht mehr existirt.

Es bleibt nun aber noch die Annahme zu erörtern, dass der „Krankheitsstoff“ in den Pilzzellen selbst einge-

geschlossen sei. In diesem Falle könnte jedes Individuum einer späteren Pilzgeneration in Folge der Theilungsvorgänge nur mehr halb soviel enthalten als das Individuum einer früheren Generation. Von dem Verluste an „Krankheitsstoff“ durch Abgabe an die umgebende Nährlösung sei dabei ganz abgesehen. Da nun die 7 Züchtungen etwa 70 Pilzgenerationen entsprachen, so gehörten die geimpften Pilze der 70. Generation an, und bei diesen betrüge die Menge von „Krankheitsstoff“ nur mehr $\frac{1}{2^{70}}$ oder weniger als den tausendtrillionsten Theil der ursprünglichen. Wenn auch die Pilze im Thiere zu $\frac{9}{10}$ ihrer Masse oder mehr aus „Krankheitsstoff“ und wenn die ganze Impfmenge bloß aus Pilzsubstanz bestanden hätte, so wäre darin doch nicht mehr als der hunderttrillionste Theil eines Milligramm von jenem hypothetischen Stoff übertragen worden. Auch diese Grösse ist also in chemischer Hinsicht als verschwindend zu erachten.

Ohne dass wir erst die entsprechenden Berechnungen für die 18. und 36. Pilzzüchtung auszuführen brauchen, beweist also bereits die „Thatsache der infectiösen Wirksamkeit der 7. Züchtung unter den gegebenen Umständen, dass die Wirkung der Milzbrandbakterien von der Beihilfe eines gelösten, dem thierischen Organismus entstammenden Stoffes unabhängig ist. Andernfalls hätte die infectiöse Wirksamkeit bei fortgesetzter Züchtung und Uebertragung der Pilze schon frühzeitig gänzlich erlöschen müssen.

Sonach kann die Minderung der Infectionstüchtigkeit bei den künstlich gezüchteten Milzbrandbakterien nur durch die Annahme erklärt werden, dass in Folge der angewendeten Ernährungsbedingungen, welche von denen des thierischen Körpers erheblich diffe-

rirten, eine allmähliche Veränderung in der Natur der Pilze vor sich gegangen sei.

Dabei muss auf einen, anscheinend selbstverständlichen, für die Beurtheilung aber sehr wichtigen Punct noch besonders aufmerksam gemacht werden. Es zeigte sich nämlich, dass die Bakterien aus den Organen der erfolgreich geimpften Thiere in allen Fällen von gleicher und zwar von sehr hoher infectiöser Wirksamkeit waren, so dass eine sehr geringe Menge derselben zur weiteren Uebertragung des Milzbrandes genügte. In dieser Beziehung machte es also keinen Unterschied, mit welcherlei Bakterien geimpft worden war. Die Pilze aus den Organen derjenigen Thiere, die mit der 7., 18. oder 36. Züchtung erfolgreich infectirt worden waren, zeigten sich nicht wirkungsschwach wie jene der genannten Culturen, sondern eine sehr kleine Menge derselben reichte hin, um auf's neue den Milzbrand hervorzurufen.

Diese Thatsache kann nur durch eine, der obigen entsprechende Annahme erklärt werden, dass nämlich durch die Ernährungsbedingungen des thierischen Körpers, welche von denen der künstlichen Züchtung verschieden waren, wiederum eine Veränderung und zwar die umgekehrte in der Natur der Pilze bewirkt worden sei.

Bei fortgesetzter Züchtung der Milzbrandbakterien in einer Lösung von Fleischextract, Pepton und Zucker traten nun bei constant bleibender Form allmählig wahrnehmbare Aenderungen auch im Wachsthum und im chemischen Verhalten hervor. Etwa von der 100. Züchtung an, welche ungefähr der 700. Pilzgeneration entsprach,¹⁾ zeigten die

1) Die Berechnung der Generationenzahl in einer Reincultur beruht

Pilze die beginnende Neigung, trotz der constanten Bewegung des Züchtungsgefässes an den höheren Theilen der Wandung desselben, die bei jedem Schüttelstosse benetzt wurden, sich anzulegen und einen Ueberzug zu bilden, was bei ächten Milzbrandbakterien niemals beobachtet wird. Ausserdem wurde die Vermehrung der Pilze trotz des Gleichbleibens der Nährlösung allmählig reichlicher als früher.

Gegen die 900. Pilzgeneration, nach einer Züchtungsdauer von 90 Tagen, wurde dieses Anlegen der Pilze an die Wandungen des Culturgefässes so störend für die Fortführung einer regelmässigen Züchtung, dass eine Aenderung des Verfahrens durchaus nöthig erschien. Denn es kam schliesslich soweit, dass beinahe keine Pilze mehr in der Flüssigkeit sich befanden, sondern alle als Ueberzug an

auf der Kenntniss des Verhältnisses der Aussaat zur schliesslichen Pilzmenge. Bei einer Reihe auf einander folgender Züchtungen, die mit der gleichen Nährlösung angestellt werden, braucht man hiezu die absoluten Grössen nicht zu kennen; es genügt vielmehr als Anhaltspunct, dass am Ende jeder Züchtung, wenn dieselbe bis zum Verbrache der Nahrungsstoffe fortgesetzt wurde, stets eine nahezu gleich pilzhaltige Flüssigkeit vorhanden sein muss. Werden nun z. B. 10 ccm Flüssigkeit aus dem Endstadium einer solchen Züchtung in 10 ccm pilzfreier Nährlösung übertragen, so ist am Ende der neuen Züchtung unter den gemachten Voraussetzungen die Pilzvermehrung eine 1000 fache, die Generationenzahl somit nahezu 10.

Obwohl diese Bestimmung aus verschiedenen Gründen nur eine annähernd richtige sein kann, so habe ich doch vorgezogen, von hier an im Texte nach Generationen anstatt nach Züchtungen zu rechnen und zwar desshalb, weil bei den späteren Culturen andere Gefässe und andere Mengen von Nährlösung verwendet wurden, als bei den früheren, und weil desshalb diese späteren Züchtungen mit den früheren nicht in Parallele gesetzt werden können. In diesem Falle ist allein die Angabe der Generationenzahl im Stande, einen richtigen Ueberblick zu gewähren.

den Wandungen klebten. Die Anwendung der Schüttelbewegung musste daher aufgegeben werden.

Die erste Züchtung bei Ruhe ergab eine starke, weissliche Deckenbildung bei sonst klarer Nährlösung. Es war damit eine bedeutsame Veränderung in der Natur der Pilze in auffälliger Weise constatirt. Aber diese Umwandlung war nicht etwa mit einemmale eingetreten, wie es vielleicht den Anschein haben möchte. Vielmehr kann nicht bezweifelt werden, dass die ganz allmählig auftretende Erscheinung des Anlegens an die Wandungen des Schüttelgefässes bereits eine Folge und somit ein Anzeichen der nämlichen neu entwickelten Eigenschaft der Pilze war wie die jetzt wahrgenommene Erscheinung der Deckenbildung. Beide Vorgänge können nur durch ein erhöhtes Adhäsionsvermögen der Pilze in Folge einer bestimmten Veränderung der Cellulosemembranen erklärt werden, welche dieselben befähigte, einerseits unter sich Verbände von grösserer oder geringerer Festigkeit zu bilden, und anderseits an fremden Körpern, hier an den Glaswandungen des Schüttelgefässes trotz der Bewegungen der darüber hinwegströmenden Flüssigkeit fest zu haften.

Hier war nun aber zum erstenmale ein thatsächlicher Anhaltspunkt dafür gegeben, dass es möglich sein werde, auf dem eingeschlagenen Wege schliesslich Pilze zu erhalten, deren Eigenschaften denen der Heubakterien analog wären; denn diese besitzen gerade die Fähigkeit der Deckenbildung als charakteristisches Merkmal. Allein die gegenwärtig erhaltenen Decken stimmten mit jenen der Heupilze noch nicht völlig überein; und zwar differirte nicht die mikroskopische Beschaffenheit, die bei der Uebereinstimmung der Formen sowohl mit ächten Milzbrandbakterien als auch mit ächten Heupilzen keine Entscheidung geben konnte, sondern die äusserliche, mit blossem Auge erkennbare. Während näm-

lich die Decken der Heupilze an der Oberfläche trocken, meist gerunzelt, von bedeutender Festigkeit und schwer unterzutauchen sind, so zeigten sich diese im Gegentheil von glattem, schleimigem Ansehen und sehr lockerem Gefüge, so dass eine geringe Erschütterung genügte, um theilweise oder gänzliche Auflösung derselben in flockige Massen, welche zu Boden sanken, herbeizuführen.

Von grösserer Wichtigkeit aber war das Verhalten der gezüchteten Pilze in Heuaufguss. Wie erwähnt verhindert die geringe Säuremenge desselben die ächten Milzbrandbakterien an jeder Vegetation, während die Heupilze ihre normalen, dichten Decken darin erzeugen. Die gegenwärtig erhaltenen Pilze nun verhielten sich in besonderer und ganz unerwarteter Weise. Bei Aussaat derselben in Heuaufguss trat zwar Vegetation ein; aber dieselbe ging bei allen angestellten Versuchen ausserordentlich langsam von statten und blieb stets geringfügig, so dass auch am Schlusse derselben nur eine sehr kleine Menge von Pilzen gebildet war. Ebenso auffallend zeigte sich dabei die Form des Wachstums. Bei klarer Flüssigkeit bildeten sich nämlich höchst schwache, durchsichtige Ueberzüge an der Oberfläche, die nur am Rande der Flüssigkeit ein wenig stärker wurden und dadurch etwas weissliche Färbung bekamen. Das ganze Verhalten zeigte somit, dass die gegenwärtig erhaltenen Pilze zwar nicht mehr so empfindlich gegen geringe Säuremengen waren wie die ächten Milzbrandbakterien, dass sie sich vielmehr den Heupilzen in dieser Beziehung bereits annäherten; dennoch aber schien die Säure auf sie noch in bedeutendem Masse schädlich zu wirken. Damit stimmte denn auch der mikroskopische Befund überein; die Pilze, welche im Heuaufguss entstanden waren, zeigten nämlich ein verkümmertes, pathologisches Aussehen, wie es sich stets findet, wenn Milzbrand- oder Heupilze unter ungünstigen Ernährungsbedingungen vegetiren.

Nach diesen Merkmalen musste angenommen werden, dass hier eine, bis dahin unbekannte physiologische Mittelform zwischen den ächten Milzbrand- und den ächten Heupilzen vorliege. Von beiden unterschied sich dieselbe durch ihre Wachstumsart in künstlichen Nährlösungen, besonders aber durch ihr Verhalten gegen die geringe Säuremenge des Heuaufgusses, von den Milzbrandbakterien ausserdem durch den Mangel infectiöser Wirksamkeit. Denn von der 36. Züchtung ab waren die vorgenommenen Impfungen erfolglos geblieben.

Die Züchtung dieser Mittelform von Pilzen wurde nun bei ruhender Nährlösung weiter geführt. Für die nächsten zweihundert Generationen diente hiezu Lösung von blossen Fleischextract. Der Zuckerzusatz konnte deshalb weggelassen werden, weil die anfänglich mit dessen Anwendung verbundene Absicht, bei den Milzbrandbakterien durch langdauerndes Wachstum in zuckerhaltigen Nährlösungen allmählig vielleicht Gärthätigkeit hervorzubringen, sich durchaus nicht realisirt hatte.¹⁾ Nach Zurücklegung der 1100. Pilzgeneration wurde wieder ein Versuch gemacht, die gezüchteten Bakterien in Heuaufguss wachsen zu lassen. Der Erfolg war ein überraschender; es trat ziemlich reichliche Vermehrung ein mit Bildung einer schleimigen, lockeren Decke aus Stäbchen und Sporen. Man war also der Uebereinstimmung mit den Heubakterien wieder um ein beträchtliches Stück näher gerückt; denn die ehemaligen Anthraxpilze vermochten nun beinahe ebensogut geringe Säuremengen zu ertragen wie jene. Nur die Beschaffenheit der Decken war in beiden Fällen noch deutlich verschieden; doch konnte kaum mehr bezweifelt werden, dass auch diese letzte Umänderung noch gelingen werde.

1) Auch fortgesetzte Züchtung der Anthraxpilze in Milch (durch 2 1/2 Monate) hatte den gleichen negativen Erfolg.

Als richtigster Weg hiezu empfahl sich offenbar die Fortsetzung der Züchtung gerade in Heuaufguss, weil in dieser Nährlösung die Eigenthümlichkeiten der ächten Heupilze am vollsten zur Geltung kommen. In der That gelang es durch eine Reihenfolge weiterer Züchtungen in der genannten Lösung die Decken allmählig trockner und fester, schliesslich vollkommen von jener gelbbräunlichen Farbe und stark gerunzelten Beschaffenheit zu erhalten, wie sie jenen der ächten Heupilze eigen sind. Ausserdem hatte sich während dieser letzten Züchtungsreihe auch die bei der mikroskopischen Beobachtung so auffallende, lebhafte, wimmelnde Bewegung der Stäbchen eingestellt, welche den Heubakterien bei gewisser Ernährungsweise eigenthümlich ist, den ächten Milzbrandbakterien jedoch und auch den Uebergangsformen abgeht.¹⁾

Nach 1500 Pilzgenerationen, welche zusammen im Laufe eines halben Jahres zurückgelegt worden waren, musste die Umwandlung der Milzbrandbakterien in Heubakterien als vollendet angesehen werden; denn es war unmöglich, einen Unterschied zwischen den durch Züchtung aus ersteren erhaltenen Pilzen und den ächten, unmittelbar rein cultivirten Heupilzen aufzufinden.

Umänderung der Heubakterien in Milzbrandbakterien.

Der genetische Zusammenhang der Heubakterien mit den Milzbrandbakterien war nunmehr sicher gestellt, und

1) Auch die ächten Milzbrandbakterien zeigen allerdings unter Umständen bei künstlicher Ernährung Eigenbewegungen. Dieselben sind jedoch bei weitem langsamer als jene der Heubakterien. Uebrigens ist das Fehlen von Eigenbewegungen bei der einzelnen mikroskopischen Beobachtung durchaus kein zuverlässiges Merkmal für die eine oder andere der in Rede stehenden Pilzformen, da auch die Heubakterien in vielen Fällen keine Eigenbewegungen zeigen.

zugleich hatte die genauere Kenntniss der letzteren ihre geringe Befähigung zur Vermehrung ausserhalb des thierischen Organismus und damit zur Behauptung gegenüber anderen, concurrirenden Pilzformen erwiesen. Um so mehr musste sich nun die Frage aufdrängen, ob nicht die häufig stattfindende autochthone Entwicklung des Milzbrandes auf eine in der Natur eintretende Umänderung der Heupilze in die infectiöse Form zu beziehen sei.

Den einzigen thatsächlichen Anhaltspunct in Bezug auf das experimentelle Studium dieser Verhältnisse bot die Erscheinung, dass Milzbrandbakterien, die ihre infectiöse Wirksamkeit durch fortgesetzte Züchtung beinahe verloren hatten, im thierischen Organismus dieselbe wieder von neuem erhielten. Die gleichen Bedingungen, welche hier gewirkt hatten, mochten auch für die Umänderung der Heubakterien in die infectiöse Form sich günstig erweisen. Diese Bedingungen liegen aber kaum ausschliesslich in der chemischen Beschaffenheit der thierischen Säfte. Sonst müsste eine Lösung von Eiweiss oder vielmehr, da die Pilze dasselbe nur in löslicher Form assimiliren können, von Eiweisspepton ungefähr das gleiche leisten. In der früheren Züchtungsreihe hatte jedoch Ernährung mit künstlich dargestelltem Eiweisspepton das Verschwinden der infectiösen Eigenschaften nicht verhindert. Daraus geht hervor, dass höchst wahrscheinlich andere, noch unbekannte Bedingungen im Spiele sind, die wohl in thierischen Flüssigkeiten, nicht aber in künstlichen Nährlösungen sich erfüllt finden.

Zunächst lag jedenfalls, nach Analogie jener Impfversuche die Cultur im lebenden thierischen Organismus zu versuchen. Es wurden daher mit den ächten, von gewöhnlichem Heu durch Kochen des Aufgusses unmittelbar rein cultivirten Heupilzen einige grössere Versuchsreihen an Kaninchen ausgeführt.

Ein grosser Theil dieser Experimente zielte dahin,

durch Steigerung der Pilzquantität den Mangel an infectiöser Wirksamkeit zu ersetzen. Die Heupilze wurden zu diesem Zweck in eiweisshaltigen Nährflüssigkeiten unter Sauerstoffzufuhr bei Ausschluss anderer Pilze gezüchtet, und diese stark pilzhaltigen Flüssigkeiten zu den Injectionen verwendet. Meist befanden sich darin zugleich Stäbchen und Sporen; jedenfalls fehlten die letzteren niemals und oft waren sie beinahe ausschliesslich in der Injectionsflüssigkeit vertreten. Als Ort der Anwendung diente nur in wenig Fällen das Unterhautzellgewebe oder die venösen Bahnen, in den allermeisten die Peritonealhöhle, die nach Wegner's lehrreichen Versuchen zur Ueberleitung von Pilzen in den Kreislauf ungemein geeignet ist.

Das Resultat dieser intraperitonealen Injectionen bestand darin, dass kleinere Mengen von Pilzflüssigkeit, 1—6 ccm, in der Regel ohne wahrnehmbare Wirkung blieben. Erst bei grösseren Injectionsmengen erfolgte in der Mehrzahl der Fälle tödtlicher Ausgang, meist innerhalb 24 Stunden. Die Untersuchung der Organe ergab hier beinahe stets reichlichen Gehalt derselben an Heubakterien, und zwar auf alle Organe gleichmässig vertheilt. Der letztere Umstand deutete schon darauf hin, dass es sich hier um eine einfache Vertheilung der injicirten Pilze im Körper handle und nicht um einen infectiösen Process. Denn in der Regel finden sich beim Milzbrand der Kaninchen Lunge und Milz bedeutend reicher an Bakterien als Leber und Nieren. Ausserdem war die Krankheitsdauer viel zu kurz, als dass die Umänderung der injicirten Heupilze in Milzbrandbakterien hätte erfolgen können. In der That ergaben die Controlimpfungen mit diesen Pilzen auf andere Thiere sämmtlich negatives Resultat.

Die Todesursache lag hier wesentlich in der Vergiftung durch die eingespritzten Zersetzungsstoffe der Heupilze, deren Wirkung durch Hyperaemie und theilweise Ecchymosir-

ung des Magens und fast des ganzen Darmtractus und blutige Färbung des diarrhoischen Darminhalts sich äusserte.¹⁾

Wenn nun aber doch eine geringe Vermehrung der Pilze und damit eine beginnende Umwandlung ihrer Natur stattgefunden hatte, der nur der Vergiftungstod des Thieres hindernd in den Weg trat, so war vielleicht durch Uebertragung der Pilze in einen zweiten Organismus und von diesem in einen folgenden eine Fortsetzung der Umänderung zu erreichen. Ein derartig angestellter Versuch liess jedoch bei der 5. Uebertragung bereits so deutliche Zeichen septischer Vorgänge erkennen, dass die Fortführung desselben aufgegeben werden musste. Zu dieser Zeit aber erwiesen die Controlimpfungen noch keine merkliche Umänderung in der Natur der Heupilze.

Es blieb also doch die Steigerung der Pilzquantität vorläufig der einzige Weg. Um hierbei die giftige Wirkung zu vermeiden, welche die Anwendung grösserer Mengen nach dem bisherigen Verfahren verbot, bestrebte ich mich, die Heupilze möglichst von ihren Zersetzungsstoffen zu befreien. Hiezu benützte ich die Eigenschaft derselben, bei ruhiger Nährlösung in Form dünner Decken zu vegetiren. Durch Diffusion müssen hier die gebildeten Zersetzungsstoffe fortwährend in der übrigen Lösung vertheilt werden, und bei abgelaufener Vegetation kann die abgehobene Decke ihrer Flüssigkeitsmenge entsprechend nur etwa den 100. Theil der gelösten schädlichen Substanzen enthalten.

Trotz dieser Vorsichtsmassregeln hatten die mit grossen Pilzmengen ausgeführten Injectionen in den Peritonealraum sämmtlich rasch tödtlichen Erfolg unter den Erscheinungen

1) Durch eine Reihe besonderer Versuche habe ich nachgewiesen, dass die Zersetzungsstoffe, welche durch reincultivirte Heu- oder Milzbrandbakterien gebildet werden, an und für sich d. h. bei Ausschluss der Pilze giftig wirken, analog den chemischen Producten der Fäulniss, welche dem Lebensprocess der Fäulnisspilze ihre Entstehung verdanken.

der Vergiftung. Da es nun möglich schien, dass die Diffusion die Zersetzungsstoffe aus den Pilzdecken noch ungenügend entfernt hatte, so wurden einige Versuche angestellt, wobei die Pilzdecken erst zerrieben, dann in viel reinem Wasser vertheilt und schliesslich von letzterem durch rasches Absaugen desselben wieder befreit wurden. Aber auch in diesen Fällen war die Wirkung der Injectionen nicht minder giftig.

Diese Erscheinung ist nur erklärlich unter der Voraussetzung, dass die Heupilze selbst toxisch wirkende Substanzen enthalten. Denn nur in diesem Falle können die letzteren durch einfaches Auswaschen nicht entfernt werden. Dafür sprechen aber auch andere Gründe. Für den Fall nämlich, dass die giftigen Stoffe hauptsächlich durch Gärung und somit, wie dies für die Gärungsproducte der Sprosshefe anzunehmen ist, vorzugsweise ausserhalb der Zellen gebildet werden, ist doch nach Analogie anderer pflanzlicher Zellen sehr wahrscheinlich, dass kleine Mengen davon aus der Lösung in's Innere der Pilze aufgenommen werden. Im andern Falle aber, wenn der grösste Theil der giftigen Verbindungen dem Stoffwechsel der Pilze seinen Ursprung verdankt, versteht es sich von selbst, dass gewisse Quantitäten davon im Zellinnern vorhanden sind.¹⁾

Gerathen nun die Pilze unter nachtheilige Bedingungen,

1) Der Befund von Anders (*Deutsche Zeitschrift f. Chirurgie* Bd. VII. S. 1.), dass der toxisch wirkende Pilzrückstand aus Pasteur'scher Nährlösung durch oftmaliges Auswaschen seine giftige Wirksamkeit verliert, erklärt sich durch den dabei stattfindenden längeren Aufenthalt der Pilze im Wasser. Denn in diesem Falle können allerdings durch die eintretende langsame Diffusion mit der Zeit die gelösten Stoffe aus dem Innern der Pilze entfernt werden; da übrigens die Pilze im Wasser jedenfalls kümmerlich weiter vegetirten, so musste ausserdem eine allmähliche Erschöpfung, ein Involutionsprocess bei denselben sich einstellen, der nothwendig zur Ausscheidung der gelösten Substanzen führte.

welche die Involution und das schliessliche Absterben veranlassen, dann müssen die gelösten Stoffe aus dem Innern der Zelle in die umgebende Flüssigkeit übertreten. Solche Bedingungen sind aber für die Pilze im Innern des thierischen Organismus überall da gegeben, wo dieselben nicht zum Wachsthum und zur Vermehrung gelangen können, und dies war für den grössten Theil der injicirten Heupilze jedenfalls der Fall.

Somit bestand keine Aussicht, auf dem bisherigen Wege zum Ziele zu kommen. Die Anwendung grösserer Mengen von Pilzen führte jedesmal zum rasch tödtlichen Ausgang; geringere Quantitäten aber blieben ohne merkliche Wirkung. Die Pilze gelangten also in diesen letzteren Fällen trotz der reichlich dargebotenen Nahrung nicht zum Wachsthum; denn, hätten sie sich vermehrt, so wären Krankheit und schliesslich der Tod des Thieres die unausbleibliche Folge gewesen.

Der Grund für diese merkwürdige Erscheinung kann wohl kaum in der Anwesenheit irgend eines bestimmten, auf die Heupilze schädlich wirkenden Stoffes im thierischen Organismus gesucht werden. Denn gerade diese Pilze sind gegenüber den Milzbrandbakterien im Ertragen der verschiedensten giftigen Substanzen bei weitem im Vortheil, und zeigen sich überhaupt, ausserhalb des Körpers, widerstandsfähiger gegen jede Art von schädlicher Einwirkung. Wir werden desshalb dahin geführt, die physiologischen Functionen des Gewebes selbst, d. h. diejenigen Vorgänge, an welche der Bestand des Lebensprocesses geknüpft ist, als Quelle jener nachtheiligen Einflüsse zu betrachten.¹⁾

1) Ich erinnere hier an die molecular-physiologische Gärungstheorie Nägeli's, welche die Schwingungszustände des lebenden Plasma der Hefezelle auf das Gärmaterial übergeben und dadurch den Vorgang der Gärung zu Stande kommen lässt. In analoger Weise wäre nach Nägeli auch die unbestreitbar vorhandene Einwirkung gärender Hefezellen auf

Das nächste Mittel zur Verminderung dieser Einwirkungen liegt alsdann in der Herabsetzung der physiologischen Thätigkeit des Gewebes, sei es nun, dass dieselbe durch Beschränkung der Blutzufuhr zu einem Organe oder durch abnorme Temperatur oder durch Vergiftung u. s. w. hervorgebracht wird. In Bezug auf letztere Einwirkung hatten die bisherigen Versuche hinlänglich gezeigt, dass eine Intoxication des ganzen Organismus nicht zum gewünschten Ziele führen könne. Mehr durfte man in dieser Hinsicht erwarten, wenn nur ein einzelnes Organ oder eine abgegrenzte Partie desselben zur Vermehrungsstätte der Pilze gewählt wurde. Denn in diesem Falle konnte eine viel stärkere und länger andauernde Schwächung der physiologischen Thätigkeit des Gewebes ohne directen Nachtheil für das Leben des Thieres hervorgerufen werden.

Eine Reihe derartiger Versuche bestand in Injectionen reiner Heupilze in das Kaninchenohr nach vorhergängiger Unterbindung der entsprechenden Carotis. Durch letzteres Verfahren hatte bekanntlich Samuel¹⁾ die Wirkung fauliger Substanzen auf das Gewebe, die sonst nur eitrige Entzündung erregt hätten, bis zur Erzeugung von Brand zu steigern vermocht. Gleichzeitig versuchte ich die Einbringung grösserer Mengen von Heupilzen in frische Muskelwunden, deren Umgebung durch heisses Wasser verbrüht und dadurch, bis auf eine gewisse Tiefe, getödtet war. Aber auch diese Experimente führten nicht zu dem gewünschten Ziele eines Wachsthums der Heupilze im thierischen Gewebe. Vielmehr entstand bei den Injectionen in's Ohr meist Entzündung mit Ausgang in Brand, bei den Muskelwunden eine langwierige Eiterung. Von den Heupilzen war in beiden Fällen stets in Kurzem nichts mehr nachzuweisen.

andersartige Pilzzellen zu denken, die sich im Wirkungsbereich der ersteren befinden. (C. v. Naegeli, Theorie der Gärung. München 1879).

1) Archiv f. experim. Pathologie I. Band 1874. S. 317.

Die Ursache dieser letzteren Misserfolge lag offenbar zunächst in dem Sauerstoffbedürfnisse der Heubakterien, welches in den Muskeln und andern sauerstoffarmen Geweben keinesfalls befriedigt werden kann. Ich erinnere in dieser Beziehung daran, dass auch die Milzbrandbakterien nur innerhalb des Gefässsystems, nur im sauerstoffhaltigen Blute sich vermehren, wofür uns, abgesehen von der mikroskopischen Untersuchung, das charakteristische Fehlen entzündlicher Erscheinungen beim Milzbrand Zeugniß gibt. Denn entzündliche Processe würden in den Geweben wohl nicht fehlen, wenn die Pilze daselbst zur Vermehrung kämen.¹⁾ Ganz anders wird dieses Ver-

1) Da hier die bereits erkannten Eigenschaften der Pilze in pathologisch-physiologischer Beziehung eine wichtige Aufklärung geben, so möchte ich die angedeutete Anschauung über den Milzbrand etwas näher begründen.

Vollständig ausgeprägt ist der Mangel entzündlicher Vorgänge beim Milzbrand kleinerer Thiere, wie z. B. der Kaninchen und Mäuse, bei denen mit Ausnahme des mikroskopischen Nachweises der Pilze meist kein anderer pathologischer Befund getroffen wird als eine mehr oder weniger beträchtliche Schwellung der Milz. Aber auch die Hämorrhagien und die serösen Transsudate, welche beim Anthrax grösserer Thiere als charakteristisch gelten, sind nicht als Folgen entzündlicher Processe aufzufassen, sondern als Anzeichen einer bestimmten Veränderung der Gefässwände.

Eine Ausnahme hiervon scheint jedoch der Milzbrandcarbunkel zu machen, bei dem entzündliche, ja sogar brandige Erscheinungen die Regel sind. Nach Bollinger (v. Ziemssen's Handb. d. spec. Pathologie und Therapie. II. Auflage. 1876. III. Bd. Zoonosen. S. 520.) findet man nun bei der mikroskopischen Untersuchung der Carbunkel „in den bedeutend erweiterten Capillaren neben einer Anhäufung farbloser Blutkörperchen zahlreiche Bakterien und eine feinkörnige Masse, die theils aus metamorphosirten Blutbestandtheilen theils aus Bakterienkeimen besteht.“ Das für uns Wichtige bei dieser Angabe ist, dass ausser den wohlbekannten Milzbrandbakterien noch andere Gebilde wahrgenommen wurden, die für Pilze gehalten werden mussten. Bei den geringen Erfahrungen, welche damals noch über die Physiologie

hältniss bei solchen Pilzformen sein, die des Sauerstoffs ohne Nachtheil entbehren können wie z. B. bei den gewöhnlichen Fäulnissbakterien. In der That ist es durch

der Milzbrandbakterien existirten, konnten diese körnchenförmigen Pilze wohl für Keime oder Sporen derselben gehalten werden. Nun bilden sich aber die Sporen nur unter ganz bestimmten Bedingungen, die im Innern des thierischen Gewebes fehlen. Jene feinkörnige Masse kann daher, soweit dieselbe aus Pilzen bestand, nur irgend welche einzellige, mit den Milzbrandbakterien genetisch nicht zusammenhängende Schizomyceten enthalten haben. Die Ansiedlung und Vermehrung solcher fremder Pilze wäre in diesem Falle als eine secundäre Erscheinung zu betrachten und als abhängig von der vorausgehenden Vegetation der Milzbrandbakterien. Durch die Anhäufung der Bakterien in den Capillaren wird nämlich locale Stauung des Kreislaufes und dadurch Ernährungsstörung in den umliegenden Gewebspartien erzeugt werden können, ausserdem aber auch Vergiftung dieser angrenzenden Theile durch die ausgeschiedenen Zersetzungsstoffe. Beide Einflüsse begünstigen, wie dies im Texte zur Sprache kommen wird, die Vermehrung solcher Pilze, welche des Sauerstoffs zu ihrer Existenz nicht bedürfen. Das Auftreten entzündlicher Reizung, ja sogar brandiger Erscheinungen wäre nun meines Erachtens als Folge dieser letzteren Pilzentwicklung aufzufassen und nicht als unmittelbare Wirkung der Milzbrandbakterien, die nur innerhalb der Blutgefässe und nur insoweit vermehrungsfähig sind, als die Blutcirculation noch Sauerstoff herbeizuschaffen vermag.

Diese Annahme eines doppelten Parasitismus würde übrigens auch darauf hindeuten, wesshalb beim rasch tödtlich verlaufenden Impfmilzbrand fast niemals Carbunkel entstehen. Der doppelte Parasitismus, der zum Carbunkel führt, würde naturgemäss länger zu seiner Entwicklung brauchen als der einfache, und der Tod wäre daher in diesen Fällen ein zu frühzeitiger, als dass eine Ausbildung solcher Processe erfolgen könnte. Beim spontanen Anthrax verlaufen allerdings die wahrnehmbaren Krankheitserscheinungen oft ebenfalls sehr kurz. Dies beweist jedoch nicht, dass keine schleichende Entwicklung der Krankheit, keine längere Incubation vorausging, während deren die Carbunkeln, z. B. auf der Darmschleimhaut, sich ausbilden konnten. Die gegenwärtigen Untersuchungen werden noch darauf hinführen, dass eine solche Incubationsperiode beim spontanen Milzbrand sehr wahrscheinlich ist.

Die erysipelatösen Processe endlich, welche beim Anthrax nicht selten beobachtet werden, dürften meines Erachtens für die ent-

eine Reihe übereinstimmender Beobachtungen und Experimente bewiesen, dass durch verschiedene schwächende Einwirkungen auf das Gewebe, durch locale Aufhebung des Kreislaufes, durch Vergiftung, selbst mit antiseptischen Mitteln, Entwicklung von Spaltpilzformen im Körper hervorgerufen werden kann. Auch bei den vorhergehenden Versuchen war dieser dort unbeabsichtigte Erfolg vielfach störend dazwischen getreten. Es waren nicht selten kleinere Pilzformen in den Organen gefunden worden, obwohl nur reingezüchtete Heupilze zur Einspritzung kamen.

Ebenso erklärte sich aus der stattfindenden Giftwirkung mittelbar das Auftreten entzündlicher und brandiger Erscheinungen bei den Injectionen in abgegrenzte Organtheile.

Eine Herabsetzung der physiologischen Thätigkeit des sauerstoffarmen Gewebes kann also jedenfalls die Heupilze nicht begünstigen. Nur im Blute schiene ein solches Unternehmen Erfolg zu versprechen; indess ist es unmöglich, das Blut zu vergiften, ohne zugleich die übrigen Gewebe zu schwächen und dadurch eben jene störende Entwicklung anderer Pilzformen herbeizuführen, die in den bisherigen Versuchen bereits sich mehrfach geltend gemacht hatte.

Damit war ich am Ende derjenigen Experimente, welche bezweckt hatten, die Heupilze unmittelbar im thierischen Körper zur Vermehrung und damit zur Annahme infectiöser

zündliche Wirksamkeit der Milzbrandbakterien vorläufig ebensowenig etwas sicheres beweisen als die Carbunkel, da ihre Entstehung auf ähnliche Weise erfolgen kann, wie es für letztere angenommen wurde. Beides sind eben Complicationen, die nicht nothwendig zum Krankheitsbilde gehören und daher, wie ich glaube, in der Natur der Milzbrandbakterien nicht unmittelbar begründet sind.

Eigenschaften zu bringen. Es musste jetzt die Züchtung in thierischen Flüssigkeiten ausserhalb des Körpers versucht werden.

Allerdings können derartige Nährflüssigkeiten nicht durch Erhitzen desinficirt werden; desshalb blieb es fraglich, ob die Fäulnisspilze, die möglicherweise in diesen Materialien bereits vorhanden waren, bei der Züchtung hintangehalten werden könnten.¹⁾

Die Züchtung in Eiereiweiss mit etwas Fleischextractlösung, welche zuerst unternommen wurde, hatte jedoch ein sehr befriedigendes Resultat. Es bildete sich an der Oberfläche, wo der Sauerstoff einwirken konnte, eine weissliche Decke, die nur aus Heupilzen und zwar Stäbchen und Sporen bestand. Auf diese Weise wurde mehrmals umgezüchtet. Alsdann hielt ich es für angezeigt, die weitere Cultur dieser, vermuthlich bereits etwas veränderten Pilze im Blute auszuführen, da ich mir hievon für den angestrebten Zweck mehr versprach als von einer fortgesetzten Züchtung in Eiereiweiss.

Die nöthigen Massnahmen bestanden darin, dass nur völlig gesunde Thiere (Kaninchen) zur Blutgewinnung genommen wurden, damit nicht etwa das Blut bereits fremde Pilze in grösserer Menge enthielt; dann in völliger Desinfection aller Instrumente und Apparate.²⁾ Das Blut wurde der Carotis entnommen und direct in das Defibrinirungs-

1) Die Annahme, dass stets vereinzelte Spaltpilze innerhalb des Thierkörpers, im Blute und in den Geweben sich befinden, folgt meines Erachtens aus der Thatsache, dass Krankheitskeime so leicht in den Organismus gelangen. Auf demselben Wege, seien dies nun die Lungen oder der Darm, müssen nothwendig auch andere Spaltpilzformen, die sich in der Athemluft und im Darmcanal stets finden, in geringer Zahl in den Kreislauf und in die Organe gelangen, wo sie normaler Weise regelmässig zu Grunde gehen.

2) Unter vollständiger Desinfection verstehe ich, wenn nichts besonderes angegeben ist, die Erhitzung im Dampfkessel.

gefäss geleitet. Von da kam es in das Züchtungsgefäss, das während der Cultur sich im Schüttelapparate bei Körpertemperatur befand. Die Bewegung musste zum Zweck der Sauerstoffzufuhr angewendet werden. Ruhiges Stehenlassen wie bei der Eiweissflüssigkeit wäre hier unzweckmässig gewesen; die Blutkörperchen hätten sich dabei zu Boden gesenkt, ihr Sauerstoffabsorptionsvermögen, das den Pilzen zu gute kommen sollte, wäre gar nicht zur Wirkung gelangt.

Bei Infection mit einer sehr geringen Pilzmenge blieb das Blut unter diesen Bedingungen durchschnittlich 12 Stunden hellroth, arteriell und scheinbar unverändert. Alsdann bemerkte man die beginnende Auflösung der Körperchen an der eintretenden Carmoisinfärbung. In diesem Zeitpunkt oder wenig später wurde bereits in eine neue, frisch dem Thier entzogene Blutportion umgezüchtet. Es ist indess von Interesse, auch die weiteren Veränderungen des Blutes zu kennen.

Von der 15. Stunde an wurde dasselbe allmählig dunkelroth und vollständig lackfarben. Niemals ward fauliger Geruch bemerkt, sondern nur der eigenthümliche Blutgeruch und, bei längerdauerndem Pilzwachsthum, etwa nach Ablauf von 24 Stunden, jedesmal eine Entwicklung von reinem Ammoniak, das auch leicht in der Luft des Züchtungsgefässes nachgewiesen werden konnte. Es verhielt sich also das Blut in dieser Hinsicht wie alle andern Nährsubstanzen, bei denen bisher die Zersetzungs Vorgänge durch Reinculturen von Heupilzen studirt worden waren.

Die mikroskopische Untersuchung ergab zur Zeit der beginnenden Auflösung der Blutkörperchen stets schon die Anwesenheit zahlreicher Heubakterien. Andere Spaltpilze wurden in den ersten 24 Stunden niemals gefunden. Wohl aber stellten sich dieselben, bei fortgesetztem Schütteln des Blutes, am 2. oder 3. Tage ein, indem gleichzeitig an den

Heubacterien die von zahlreichen anderweitigen Erfahrungen her wohlbekannten mikroskopischen Erscheinungen der Involution mit aller Deutlichkeit sich zeigten, welche hauptsächlich in unregelmässiger Aufquellung, Zusammenziehung des Zellinhalts und endlich in Zerfall zu einem Körnerhaufen bestehen. Sporenbildung trat in diesen Versuchen während des Schüttelns nicht ein.

Die Erscheinung, dass bei diesen Blutzüchtungen in den ersten 24 Stunden keine der überall verbreiteten Spaltpilzformen z. B. keine Fäulnisspilze auftraten, während die Heubacterien sich reichlich vermehrten, ist ohne Zweifel bedeutungsvoll, bedarf aber noch der näheren Aufklärung. Jedenfalls lag der Grund nicht darin, dass solche Keime vollständig fehlten. Dies beweist schon das Auftreten fremder Pilze am zweiten Tage. Es musste also eine besondere Ursache wirksam sein, welche diese Spaltpilzformen so vollkommen darniederhielt, dass in den ersten 18 Stunden noch keine irgend merkliche Vermehrung derselben erfolgte. Das letztere schliesse ich nämlich nicht aus dem Ergebniss der mikroskopischen Untersuchung, die bei einer stark eiweisshaltigen Flüssigkeit über die Anwesenheit kleinerer Spaltpilzformen keinen sichern Aufschluss gibt, sondern aus den angestellten Controlzüchtungen in eiweissfreie Nährlösungen, die absolute Reinculturen von Heupilzen lieferten.

Zu vermuthen steht, dass es sich dabei um die gleichen Einflüsse handelt, die auch im lebenden Körper eine Vermehrung von Fäulnisspilzen im Blute bei normalen Zuständen verhindern; es ist nicht unwahrscheinlich, dass diese Wirkungen auch nach der Entnahme des Blutes aus dem Körper noch eine gewisse Zeit andauern und erst allmählig, zugleich mit dem Leben des Blutes erlöschen werden.

Um so merkwürdiger bleibt es, dass die Heupilze unter den gleichen Umständen sich reichlich vermehrten. Man möchte glauben, dass dies mit ihrer Vorliebe für den

Sauerstoff zusammenhängt. Jedenfalls sind hier Räthsel, deren Aufklärung einen tiefen Einblick in die Natur der infectiösen Wirkung verschaffen wird.

Schon von der ersten Cultur im Blute an zeigte das Verhalten der Heupilze in den Controlzüchtungen, dass sich deren Natur geändert hatte.

In Fleischextractlösung bildeten die Pilze zwar Decken, aber nicht von der consistenten und trocknen Beschaffenheit jener der ächten Heupilze, sondern von schleimigem Ansehen und äusserst lockerem Gefüge, so dass eine leichte Erschütterung genügte, um dieselben zum Sinken zu bringen. Es traf dieses Verhalten mit demjenigen der Mittelformen zwischen Milzbrand- und Heupilzen, die in der früheren Züchtungsreihe erhalten worden waren, vollständig überein. Entscheidend aber in dieser Beziehung erwies sich die Controlzüchtung in Heuaufguss. Während die Heupilze in dieser Flüssigkeit reichliche Decken bilden, die Milzbrandbakterien dagegen vermehrungsunfähig sind, folgten die gegenwärtig erhaltenen Pilze keinem dieser beiden Extreme. Es trat ein spärliches Wachsthum ein, es bildete sich bei sonst klarer Flüssigkeit nur ein weisslicher Rand dort, wo die Oberfläche der Lösung die Glaswandung berührte. Dieser Rand bestand aus Stäbchen und Fäden von den Formen der Milzbrand- oder Heupilze, aber etwas krankhaft verändert, was mit der kümmerlichen Ernährung derselben vollkommen übereinstimmte.

Nach diesen Anhaltspuncten zu urtheilen stimmten die nunmehr erhaltenen Pilze mit jenen der 900. Generation der früheren Züchtung überein und hatten sich demgemäss, in der Richtung gegen die infectiöse Form bedeutend verändert. Es fragte sich nun zunächst, ob durch länger fortgesetzte Blutzüchtung eine weitere Umänderung zu erzielen sei. Bis zur 14. Cultur im Blute war diess indess nach Ausweis der Controlzüchtungen nicht der Fall, und

es ist somit sehr unwahrscheinlich, dass sie überhaupt möglich sei.¹⁾ Desshalb wurde jetzt von neuem zum Thierexperiment mit diesen veränderten Heupilzen übergegangen.

Eine grössere Zahl von Injectionsversuchen, die mit den Blutzüchtungen unmittelbar angestellt wurden, ergab, dass das Blut giftig wirkte, wenn die Züchtung schon 24 Stunden angedauert hatte, dagegen noch nicht bei 12—15 stündiger Cultur. Aber auch in den letzteren Fällen entwickelte sich selbst bei Anwendung grosser Blutmengen kein Milzbrand.

Da Sporen zu diesen Versuchen günstiger sein mochten als Stäbchen, und da im geschüttelten Blute keine Sporen sich bildeten, so züchtete ich solche in Fleischextractlösung durch Aussaat aus einer der Blutculturen. Von dem erhaltenen Sporenbodensatz bekamen 15 weisse Mäuse steigende Mengen, von 0,1—1,0 ccm, unter die Rückenhaut injicirt. Hievon erholten sich die beiden mit der geringsten Injectionsmenge bald und blieben am Leben. Alle Mäuse, welche 0,3 ccm und mehr erhalten hatten, und eine der beiden mit 0,2 ccm injicirten starben am 1.—3. Tage. Bei allen fand sich an der Injectionsstelle beginnende oder fortgeschrittene Abscessbildung d. h. trübe graue Flüssigkeit mit viel von der Injection herrührenden Sporen aber noch viel mehr Fäulnisspilzen, obwohl eine Reincultur eingespritzt worden war. Mehrfach fand sich beträchtliche Milzschwellung; aber die Organe enthielten nur vereinzelte Heubacterien. Es handelte sich hier demnach vorwiegend um septische Vorgänge.

1) Die vollständige Umwandlung in Milzbrandbakterien käme wohl nur dann zu Stande, wenn das angewendete Blut vollständig die Eigenschaften des im Thierkörper kreisenden besässe, was gerade in Folge des Pilzwachsthums jedenfalls nur für den Anfang der Züchtung der Fall sein kann.

Bei der zweiten von denjenigen Mäusen dagegen, welche 0,2 ccm erhalten hatten, verlief die Sache anders. Dieselbe schien anfangs davonzukommen; denn am 2. und 3. Tage nach der Injection zeigte sie sich vollständig munter. Am 4. Tage jedoch wurde sie wider Erwarten todtgefunden. Bei der Section fand sich die Impfstelle am Rücken mit einer geringen harten Kruste bedeckt, kein Eiter darunter, die Musculatur jedoch an dieser Stelle ein wenig verfärbt. Das Peritoneum war klar und vollständig normal, ebenso alle Unterleibseingeweide; nur die Milz fand sich gewaltig vergrössert. Deren Untersuchung ergab sehr grosse Mengen der charakteristischen Milzbrandstäbchen. Ebenso enthielt die Lunge massenhaft Bakterien, Leber und Nieren dagegen sehr wenig. Der ganze Befund machte es sohin unzweifelhaft, dass hier ein Fall von Milzbrand vorliege. Zur vollständigen Gewissheit wurde übrigens aus der Milz mittels der Isolirungsmethode eine Reincultur hergestellt, welche in der That erkennen liess, dass es sich um ächte Milzbrandbakterien handle. Ausserdem erwiesen die vorgenommenen Controlimpfungen das gebildete Contagium als sehr wirksam, indem bei ganz kleinen Impfmengen (schon 0,005 mg der Milzsubstanz) der Tod längstens innerhalb 24 Stunden mit dem nämlichen Befunde des Milzbrandes erfolgte.

Ein zweiter Versuch an 17 weissen Mäusen mit Mengen von 0,1—0,8 ccm hatte ganz analogen Ausgang. Die geringsten Quantitäten blieben ohne weitere Folge, die grösseren führten zum Tod durch Abscedirung. Eine der mit 0,3 ccm injicirten schien sich am 2. Tage erholt zu haben. Am 5. jedoch fand sie sich todt, und die Section und die vorgenommenen Controlversuche ergaben ausgesprochenen Milzbrand.

Es wurden nun bei 5 Kaninchen Injectionen mit 1—12 ccm der etwas verdünnten Sporenflüssigkeit in den Peritonealraum ausgeführt. Eines dieser Thiere zeigte sich

gleich am folgenden Tage krank und erlag am 5. Tage unter peritonitischen Erscheinungen. Die übrigen 4 erholten sich nach der Einspritzung bald und wurden in den folgenden Tagen vollständig munter. 3 davon blieben auch am Leben, das 4. jedoch fand sich am 5. Tage unvermuthet todt. Die Section ergab vollständiges Fehlen aller entzündlichen Erscheinungen; der Peritonealüberzug aller Unterleibsorgane erwies sich vollkommen ungetrübt, ebenso die Organe mit Ausnahme der Milz normal. Die letztere dagegen war merklich geschwollen. Mit Ausnahme dessen war überhaupt kein abnormaler Befund für die Besichtigung mit blossen Auge vorhanden. Die Untersuchung der Milz und Lunge ergab dagegen das Vorhandensein massenhafter Stäbchen von dem charakteristischen Aussehen der Milzbrandbakterien; Leber und Nieren enthielten nur vereinzelte solche Pilze. Die vorgenommenen Controlimpfungen und Züchtungsversuche endlich machten es zweifellos, dass hier wiederum ein Fall von ächtem Milzbrand vorlag.¹⁾

Diese Resultate bestätigten also die gehegte Erwartung. Sie sind von entscheidender Bedeutung, weil bei dem geübten Infectionsverfahren eine unabsichtliche Uebertragung von ächtem Milzbrandcontagium auf die Thiere vollständig ausgeschlossen war. Ausserdem wurden auch Stallungen zum Aufenthalt der Versuchsthiere benützt, in denen noch niemals Milzbrandfälle sich ereignet hatten.

1) Wegen der grossen Wichtigkeit dieser Resultate habe ich geglaubt, die Diagnose auf Milzbrand gegen allfällige Zweifel möglichst sicher stellen zu sollen, und desshalb Organtheile vom obigen Falle an Herrn Professor Bollinger gesandt mit der Bitte, durch Impfungen das Vorhandensein des ächten Milzbrandcontagiums seinerseits constatiren zu wollen. Das Resultat dieser Controlversuche, welches Herr Professor Bollinger der morphologisch-physiologischen Gesellschaft in München mittheilte, lautete in der That dahin, dass durch Impfung mit Theilen der übersandten Organe eclatanter Milzbrand mit allen dazu gehörigen Befunden erzielt worden sei.

Die lange Incubationsdauer von 4–5 Tagen, während deren die Thiere völlig munter waren, charakterisirte überdies unverkennbar diese, nach Pettenkofer's Bezeichnungsweise, ektogen erzeugten Milzbrandfälle gegenüber den contagiös oder endogen hervorgerufenen, bei denen, wenigstens für die Mäuse, der Tod 24 oder längstens 48 Stunden nach der Impfung zu erfolgen pflegt; diese längere Zeitdauer ist wohl erforderlich, damit die Umwandlung der veränderten Heupilze im Körper in Milzbrandbakterien erfolgen kann.

Bezeichnend war endlich die Erscheinung, dass in den beiden, an Mäusen ausgeführten Versuchsreihen gerade die mittlere Injectionsmenge positives Resultat ergab, d. h. die grösste, welche noch nicht zu Abscedirung und damit zu frühzeitigem Tode führte. Hierin lag schon eine Andeutung, dass das Procentverhältniss der positiven Fälle erhöht werden könne, wenn sich die Entstehung der Abscesse bei grösserer Impfmenge vermeiden liess.

Für die Theorie ist es allerdings genügend, wenn ein einziger, sicher constatirter Fall von Milzbrand durch Heubakterien in einwurfsfreier Weise erzeugt ist. In praktisch-aetiologischer Beziehung aber fragt es sich, unter welchen Bedingungen am leichtesten der ektogene Infectionsstoff im Thierkörper in endogenen sich umzuwandeln vermag. Die Antwort auf diese Frage wird durch specielle Versuche bei verschiedenen Thierspecies erbracht werden müssen, weil die verschiedene thierische Organisation hier jedenfalls von merklichem Einflusse ist.

Vorläufig habe ich in dieser Beziehung nur bei den weissen Mäusen die Untersuchung weiter geführt, und zwar nach dem oben erwähnten Gesichtspunkte. Die Injectionsmenge musste vergrössert, die Entstehung von Abscessen aber hintangehalten werden.

Die injicirte Pilzflüssigkeit verweilt bei diesen Thierchen

offenbar längere Zeit unter der Haut; es treten Gewebssäfte in dieselbe, und, da die injicirten Heupilze an dieser sauerstoffarmen Stelle vermehrungsunfähig sind, so vermehren sich die Fäulnisspilze, welche in einer solchen Injectionsstelle nie fehlen, und es entsteht in Kurzem ein Fäulnissherd. Die Ursache dieser Pilzentwicklung liegt aber keineswegs in dem Erguss von Gewebssäften an und für sich; bei subcutanen Knochenfracturen sehen wir beispielsweise keine Abscesse sich bilden, einfach desshalb, weil die ergossenen Säfte der normalen Beschaffenheit der thierischen Flüssigkeiten noch nahe genug stehen, um gleich diesen eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegen die Fäulnisspilze zu besitzen.

Der Grund der Abscedirung lag also hauptsächlich in der Verdünnung und Vergiftung der ergossenen Gewebssflüssigkeiten durch die injicirte Pilzflüssigkeit, wodurch dieselben zur Ernährung von Fäulnisspilzen ungemein geeignet wurden. Die Verdünnung wenigstens liess sich vollständig vermeiden durch Anwendung trockenen Impfmateriales. Hiezu wurden Leinenbändchen in die Sporenflüssigkeiten getaucht, alsdann getrocknet und unter die Rückenhaut der Mäuse gebracht. Auf diese Weise gelang es nun in der That ausserordentlich viel bessere Resultate zu erzielen. Nach Feststellung der richtigen Impfmenge konnte schliesslich in jedem einzelnen Falle durch die veränderten Heupilze nach Ablauf einer Incubationsdauer von 4–6 Tagen der Milzbrand mit allen charakteristischen Befunden erzeugt werden.

Der genetische Zusammenhang der Milzbrandbakterien mit den Heupilzen und die Möglichkeit des Uebergangs der einen in die andern ist damit vollkommen und in beiden Richtungen erwiesen. Zur Feststellung der natürlichen Aetiologie des Milzbrandes genügen diese Ergebnisse zwar noch nicht vollständig, da es ja nicht gelang, mit den

unveränderten Heupilzen den Milzbrand zu erzeugen und da die vielleicht besonderen Eigenschaften der an den Milzbrandlocalitäten vorkommenden Heupilze bisher noch nicht erforscht sind. Es lässt sich jedoch bereits erkennen, dass unseren Vorstellungen in dieser Beziehung eine wesentliche und grundsätzliche Aenderung bevorsteht, die auch für das praktische Verhalten nicht ohne Einfluss bleiben wird. Um so eher wird dies der Fall sein müssen, da die geltenden aetiologischen Theorien mit den Thatsachen durchaus im Widerspruche sich befinden.
