Untersuchungen über fluoreszierende Wasservibrionen.

Von

Dr. Franz Fuhrmann.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität Graz: Vorstand: Professor Dr. R. Klemensie wicz.)

Seit Robert Koch den Vibrio der asiatischen Cholera entdeckt hatte, erkannte man auch sehr bald das Wasser offener Flußläufe, sowohl in Indien, der Heimat des Choleravibrio, als auch in unseren Ländern als Wohnstätte von Vibrionen. Vom Wasser aus kann der Choleravibrio verheerende Epidemien erregen. Durch diese Erfahrung geleitet, waren viele Forscher eifrig bemüht, besonders offene Flüsse und Wasserleitungen auf ihren Keimgehalt zu untersuchen, insbesondere die sie bewohnenden Vibrionen genau kennen zu lernen. Eine reiche Fülle derartiger Untersuchungen wurde seither bekannt und die Zahl der mehr oder minder genau studierten Wasservibrionen ist schon eine bedeutende. Daß allen jenen Vibrionen, die eine ausgesprochene Ähnlichkeit mit dem Vibrio Koch in biologischen und morphologischen Eigentümlichkeiten aufwiesen, das spezielle Interesse der Forscher in Anspruch nahmen, darf wohl nicht wundern. Aber nicht nur die nächsten Verwandten des Choleravibrio sind dabei zu berücksichtigen, da auch Untersuchungen über Vibrionen, die nur wenige Merkmale mit dem Erreger der Cholera gemein haben, unter Umständen wertvolle Aufschlüsse über die Mannigfaltigkeit der Eigenschaften der Vertreter der großen Gruppe "Vibrio" geben und deren naturwissenschaftliche Erkenntnis fördern helfen.

Diese Überlegungen bewogen mich, die vorliegenden. schon vor längerer Zeit ausgeführten Untersuchungen zu veröffentlichen. Sie beziehen sich auf zwei aus Wasser gezüchtete einen fluoreszierenden Farbstoff bildende Vibrionen, die ich mit dem Namen: Vibrio aquatilis fluorescens α und Vibrio aquatilis fluorescens β bezeichne. Ersterer stammt aus dem Murwasser, geschöpft oberhalb der Stadt Radkersburg, letzterer aus einem zur Untersuchung an das Institut eingesandten Zisternen wasser aus Rudolfswert in Krain.

Vibrio aquatilis fluorescens α.

Unser Vibrio wächst auf der üblichen Nährgelatine mit 10% Gelatine-, 1.5% Pepton-, 0.5% Cl Na-Gehalt bei Zimmertemperatur gut. Wie schon angedeutet, bildet er einen grün fluoreszierenden Farbstoff, der die Nährsubstanz völlig durchdringt und sie intensiv färbt. Die Oberflächenkolonien (Fig. 7) auf einer mit dem Vibrio infizierten, neutralen Gelatine, bei 220 C. gehalten, haben nach 48stündigem Wachstum einen Durchmesser von 1·0-1·5 mm. Sie zeigen eine entfernte Ähnlichkeit mit den Kolonien des Bacillus typhi abdominalis. unterscheiden sich von solchen aber durch die ganz bedeutende Dicke des mittleren Teiles der Kolonie. Im allgemeinen sind die Kolonien blattförmig, der Rand mit mannigfachen Kerben versehen und scharf begrenzt. Die Oberfläche ist fein geädert und läßt sich wie die Typhuskolonie mit einem Moirestoff vergleichen. Sie sind schwach gelblichweiß gefärbt und durchscheinend. An Abklätschen von deraftigen Kolonien erkennt man die Zusammensetzung derselben aus mehrfach übereinander geschichteten Lagen, die von der Basis zur Spitze immer kleiner werden. Die in der Tiefe der Gelatine wachsenden Kolonien sind kugelförmig, bräunlich gefärbt und bieten nichts Charakteristisches dar.

Beim Abheben erweisen sich die Auflagerungen als nicht fadenziehend.

An der Gelatine Stichkultur sieht man im Impfstich kein Wachstum, an der Oberfläche bildet sich die früher charakterisierte Auflagerung. Nach ungefähr 48 Stunden beginnt die Farbstoffbildung und das Nährsubstrat wird flüoreszierend. Eine Verflüssigung der Gelatine findet auch nach Wochen nicht statt.

Das Ausstrichpräparat einer oben beschriebenen

Kolonie läßt leicht gekrümmte Stäbchen erkennen, deren Länge zwischen 2 und 2·5 µ schwankt und deren Breite ungefähr den vierten Teil der Länge ausmacht. Mit wässeriger Gentianaviolettlösung werden sie in der üblichen Färbedauer (1 Sek.) nur schwach gefärbt und zeigen damit eine vielen Vibrionen zukommende Eigentümlichkeit. Wässerige Fuchsinlösungen färben sie viel intensiver. Eine große Zahl von Vibrionen besitzt die Eigenschaft, sich mit wässerigen Fuchsinlösungen sehr intensiv in der üblichen Färbezeit zu tingieren. Diese Eigenart der Färbung erleichtert wesentlich das Auffinden und Erkennen von Vibrionen und Spirillen in Ausstrichpräparaten; ich erwähne nur die Spirillen des menschlichen Zahnbelages, die nach Gentianaviolettfärbungen kaum zu sehen sind, während sie nach Fuchsinfärbungen deutlich erkannt werden.

Nach der Gram'schen Methode behandelt, wird der Vibrio a entfärbt.

Im hängenden Tropfen zeigt unser Vibrio eine lebhafte Eigenbewegung, die jener des Choleravibrio zum Verwechseln ähnelt.

Züchten wir den Vibrio bei höherer Temperatur auf Agar, so ist das Wachstum ein bedeutend rascheres und die Form der Vibrionen eine etwas andere. Nach mehrfachen Versuchen konnte ich die obere Temperaturgrenze, wo noch spärliches Wachstum stattfindet, mit 37—38°C. feststellen, während bei 40°C. bereits die Sterilisierungstemperatur erreicht ist. Das Temperaturoptimum, bei dem der Vibrio am besten gedeiht und am raschesten den fluoreszierenden Farbstoff erzeugt, ist 32°C.

Eine Strichkultur auf Nähragar läßt nach 24 Stunden bei 32°C. bereits einen 4-5 mm breiten, gelblichen, feuchtglänzenden Streifen längs des Impfstriches erkennen. Der Belag ist mäßig dick, beim Abheben nicht fadenziehend und in Flüssigkeiten leicht aufschwemmbar.

Das davon angefertigte Ausstrichpräparat (Fig. 6) zeigt die einzelnen Vibrionen etwas kürzer und dicker, noch weniger gekrümmt, als es beim Wachstum auf Gelatine der Fall ist. Im hängenden Tropfen untersucht, lassen die Vibrionen eine sehr lebhafte Bewegung erkennen. Die

Geißeln unseres Vibrio (Fig. 11) sind schwierig darzustellen, einerlei, nach welcher Methode gearbeitet wird. Ich färbte sie nach der im Laboratorium üblichen Methode von Luksch¹ mit gutem Erfolg und beobachtete im allgemeinen 3—5 Geißelfäden an jedem Ende des Vibrio. Sie sind gewöhnlich an der Abgangsstelle zusammengeklebt und stellen einen dicken, geschwungenen Faden dar, dessen Ende aufgefasert erscheint.

Lange aufbewahrte Agarkulturen bekommen eine braunrote Färbung und gleichen dann alten Cholerakulturen.

Bevor ich auf die biologischen und morphologischen Erscheinungen eingehe, die sich beim Züchten des Vibrio auf flüssigen Nährsubstanzen zeigen, möchte ich einige Worte über das Wachstum desselben auf den übrigen üblichen. festen Nährsubstanzen einfügen.

Auf der Kartoffel bei neutraler oder leicht alkalischer Reaktion wächst der Vibrio ziemlich langsam. Es entsteht nach einigen Tagen ein braungelber, dünner Belag, der dem des Choleraerregers gleicht. Etwas dunklere Überzüge bildet der Vibrio auf der Kartoffelscheibe bei höherer Temperatur.

Die Kultur auf Scheiben von gekochtem Hühnerei, deren Eiweißrand beimpft wurde, gleicht vollständig der des Erregers der Cholera. Nach 1—2 Monaten ist das gesamte Eiweiß in eine bernsteinartige, dunkelgebe, durchsichtige Masse umgewandelt.

Auf flüssigen Nährböden wächst der Vibrio gut. In Nährbouillon gedeiht derselbe vorzüglich bei einem Temperaturoptimum von 32°C. Schon nach 24 Stunden gewahren wir eine allgemeine Trübung des Nährsubstrates, eine mächtige, trocken aussehende Kahmhaut, die beim Schütteln in größere Flocken zerfällt, und einen geringen Bodensatz. An der Oberfläche der Kultur beginnen nach dieser Zeit die ersten Fluoreszenzerscheinungen aufzutreten. Nach 2—3 Tagen ist die ganze Flüssigkeit fluoreszierend. In Ausstrichpräparaten von Bouillonkulturen (Fig. 8) konnte ich zwar niemals Spirillenbildungen begbachten, doch sah ich sehr häufig von

¹ Zentralblatt f. Bakt. u. Parasitenkunde, XII. Bd., 1892, pag. 430.

2-4 Stäbchen gebildete Ketten, die unregelmäßige Windungen zeigten.

Peptonwasserkulturen lassen ähnliche Verhältnisse erkennen, nur ist das Wachstum bedeutend geringer. Nach 24 Stunden sieht man eine allgemeine Trübung in der Flüssigkeit und eine geringe Menge eines Bodensatzes, eine Kahmhaut fehlt. Das Ausstrichpräparat bietet das gleiche Aussehen wie Bouillonkulturenausstriche.

In sterilisierter Milch wächst unser Vibrio gut, ohne dabei irgendwelche sichtbare Veründerungen derselben zu bewirken. Erst nach monatelangem Wachsen gewahrt man an ihr einen leichten Stich ins Braungelbe.

Der Vibrio gehört zu den obligaten Aëroben, was an der Gelatinestichkultur ersichtlich ist, da im Impfstich kein Wachstum eintritt.

Traubenzucker zu vergären vermag der Vibrio nicht, wie die Abwesenheit von Gasblasen in Traubenzucker-Gelatinekulturen und der negative Ausfall der Gärungsprobe ergibt.

Verwenden wir als Nährboden eine mit Lackmustinktur schwach gefärbte, genau neutralisierte Nährgelatine, so tritt nach wenigen Stunden ein Farbenumschlag in Rot ein. Diese Säurebildung ist auch auf Platten mit stark alkalischer Gelatine, die bereits durch Salzniederschläge getrübt ist, gut zu erkennen, indem sie in der Umgebung der Vibrionenkolonien durch Auflösung dieser Niederschläge eine Aufhellung hervorbringt, wodurch jede Kolonie von einem durchsichtigen Hofumsäumt erscheint (Fig. 4).

Um die Quantität der in einer bestimmten Zeit von den Vibrionen gebildeten Säure zu bestimmen, kultivierte ich dieselben auf Petruschkys Lackmusmolke¹. In dieser Nährlösung gedeiht der Vibrio gut, trübt nach 24 Stunden dieselbe und bewirkt einen Farbenumschlag von neutralem Violett in Rot. Nach fünftägigem Wachstum ergab sich als Mittelzahl mehrfacher Versuche ein Säuregehalt von 2% 1/10 Normal. Auch ältere Kulturen erreichen keine höheren Werte an Säure.

¹ Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., Bd. VI, 1889, p. 657.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß sowohl der Vibrio Koch als auch eine Reihe von Wasservibrionen auf alkalischen Nährsubstraten bedeutend besser gedeihen als auf neutralen oder gar sauren. So wird von Dahmen¹ angegeben, daß das Optimum der Alkaleszenz für den Erreger der asiatischen Cholera dadurch erreicht wird, daß 100 ccm einer mit Lackmuspapier genau neutral gestellten Gelatine mit 1 g kristallisiertem kohlensauren Natron versetzt werden. Es entspricht dies einem Gehalt von zirka 0·38% wasserfreier Soda oder 7 ccm Normal Na₂CO₃-Lösung in 100 ccm Nährsubstrat. Nach Flügge² werden 1000 ccm Nährgelatine mit 55 ccm einer 10·6% igen Na₂CO₃-Lösung versetzt, was einem Gehalt von 0·18% wasserfreier Soda gleichkommt.

Die Wachstumsverhältnisse des Vibrio aquatilis fluorescens a auf verschieden alkalischer Gelatine untersuchte ich nach der im Laboratorium üblichen Methode. Zu dem Ende ging ich von einer neutralen Nährgelatine mit 20% Gelatinegehalt aus und verdünnte mehrere Portionen derselben mit soviel destilliertem Wasser und Normallösung von Soda, beziehungsweise Essigsäure, daß dieselben zum Schlusse 10% Gelatine, 1, 2% Säure, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8% Normal-Alkali enthielten. Um nun die einzelnen Röhrchen mit der annähernd gleich großen Vibrionenmenge zu impfen, verrieb ich eine Öse voll frischer Agarkultur in Bouillon sehr sorgfältig, tauchte die Platinnadel vor jedem Impfstich zirka 5 mm tief in die vorher aufgeschüttelte Aufschwemmung ein und brächte diese Quantität unter Drehen der Nadel in einem Zuge auf die schief erstarrte Gelatinefläche. Daß vor jeder Impfung die Nadel ausgeglüht wurde, ist wohl selbstverständlich.

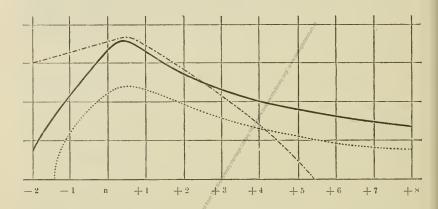
Die nach der soeben beschriebenen Methode angelegten Kulturen wurden bei 22°C, gehalten.

Stichkulturen von peptonisierenden Bakterien in solcher verschieden alkalischen Gelatine, wie wir sie sehr häufig mit Choleravibrionen und Anthraxbazillen im Laboratorium anlegten, gaben an der Größe des in einer bestimmten Zeit entstandenen

¹ Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., Bd. XII, 1892, p. 620.

² Zeitschr. f. Hyg., Bd. XIV, 1893, p. 195.

Verflüssigungstrichters einen recht brauchbaren Maßstab für die Wachstumsenergie. Unser Vibrio verflüssigt die Gelatine nicht, weshalb ich das Wachstum nur aus der Breite der in gewissen Zeiträumen angegangenen Auflagerung erschließen konnte. Nach diesen Breitenmaßen, welche auf die Abscissenaxe eines Koordinatensystems aufgetragen wurden, während die Alkaleszenzgrade auf der Ordinatenaxe markiert sind, konstruierte ich eine Kurve, an der die Wachstumsverhältnisse gut zu erkennen sind.



Die punktierte Linie gibt uns ein annäherndes Bild vom Verlauf des Wachstums auf verschieden alkalischer Gelatine nach 72 Stunden. Am üppigsten ist dasselbe zwischen neutral (n) und 1% Normal-Na₂CO₃-Gehalt. Es liegt das Alkaleszenzoptimum also ungefähr bei 6·7% Normal-Alkaligehalt. Von hier fällt das Wachstum fast in einer geraden Linie ab und ist bei 4% Normal-Alkaligehalt ungefähr gleich groß, wie bei 1% Normal-Säuregehalt. Innerhalb 72 Stunden ist bei einem größeren Säuregehalt als 1·4% kein nennenswertes Wachstum zu verzeichnen. Etwas verändert sich der Verlauf der Kurve, die das Wachstum nach fünf Tagen demonstriert und durch eine vollausgezogene Linie wiedergegeben ist.

Bei 2% Normal-Säuregehalt ist noch ein spärliches Wachstum zu beobachten. Bei den verschiedenen Alkaleszenzgraden ist dasselbe gleichmäßig gestiegen, sodaß hier beide Kurven annähernd parallel verlaufen.

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse bei der Zucht des Vibrio auf verschieden alkalischer und saurer Nährbouillon, die analog der Gelatine hergestellt wurde. Hier diente als Maß des Wachstums die Intensität der in bestimmten Zeiten auftretenden Trübungen und die Masse der Bodensätze. Eigentlich müßten die Abscissenabstände bedeutend höher gewählt werden, da in Bouillon von mäßigem Säure- und Alkaligehalt ein üppigeres Wachstum als auf Nährgelatine zu beobachten ist. Aus Raumersparnis zeichnete ich die Kurve für das Wachstum auf Bouillon mit einer strichpunktierten Linie direkt über die anderen, ohne jede Rücksicht auf das bessere Wachstum. Der Verlauf der strichpunktierten Linie zeigt uns, daß schon reichliches Wachstum bei 2% Normal-Säuregehalt vorhanden ist, bei zirka 1.5% Normal-Alkaligehalt liegt das Maximum und bei zirka 5.5% Normal-Alkaligehalt hört das Wachstum ganz auf. Sehr auffallend ist die Erscheinung, daß in flüssigen Nährsubstraten ein ganz bedeutender Gehalt an Säure von den Vibrionen sogar besser vertragen wird, als ein höherer Alkaligehalt. Die Temperatur scheint hier einen geringeren Einfluß auf die Üppigkeit des Wachstums auszuüben, da bei Schwankungen derselben, zwischen 22° und 32° C., annähernd gleich starke Trübungen, Kahmhautbildungen und Bodensätze in gleichen Zeiten auftraten.

Es erübrigt noch, diese Vibrionenspezies auf ihre Tierpathogenität zu untersuchen.

Tierversuche.

Zu denselben verwendete ich die üblichen Laboratoriums-Versuchstiere, die weiße Maus das Meerschweinchen und Kaninchen. Erstere infizierte ich von der Bauchhöhle aus und subkutan. Beiden Infektionen gegenüber verhielten sich die weißen Mäuse vollkommen refraktär.

Das Meersch wein chen ist gegen eine intraperitoneale Einspritzung einer Aufschwemmung junger Agarkultur dieses Vibrio empfindlich. Bei einer Dosis von 15 mg 24stündiger Agarkultur, aufgeschwemmt in zirka 5 ccm Bouillon oder Peptonwasser, krepierten die Tiere innerhalb 24 Stunden unter Erscheinungen, die ich hier kurz beschreibe.

Die kurze Zeit nach dem Tode vorgenommene Autopsie ergab eine beträchtliche Ansammlung klarer Flüssigkeit in der Pleurahöhle und ein prall mit flüssigem Blut gefülltes, rechtes Herz. Die Bauchhöhle enthielt eine größere Menge blutigeitriger. getrübter Flüssigkeit, das Mesenterium war mäßig gerötet, die Milz etwas vergrößert. In der Peritonealflüssigkeit fanden sich die Vibrionen massenhaft in Reinkultur vor. Im Herzblute waren durch die Kultur keine Vibrionen nachzuweisen. In Organschnitten fand ich ebenfalls keine Vibrionen. Mit Pleuraflüssigkeit angelegte Kulturen zeigten nur sehr wenige, weit von einander auswachsende Kolonien des Vibrio.

Ich impfte mit diesem Vibrio noch eine Reihe von Meerschweinchen, um die Virulenz desselben womöglich zu steigern. Nach vielfachen Versuchen war die kleinste tödliche Dosis auf zirka 5 mg pro 100 g Meerschweinchenkörper herabgedrückt. Diese Virulenz blieb einige Zeit hindurch konstant, doch gelang es mir nicht, sie weiter zu steigern.

Kaninchen erwiesen sich gegenüber einer Einspritzung selbst beträchtlicher Kulturmengen in die Ohrvene vollkommen in different.

Vibrio aquatilis fluorescens 3.

Wie schon eingangs erwähnt, stammt dieser Vibrio, der sich in einigen morphologischen und biologischen Eigenschaften von dem vorher beschriebenen unterscheidet, aus Zisternenwasser, das zur Untersuchung auf Typhusbazillen eingesandt wurde.

Auf der Gelatineplatte wächst der Vibrio als runde, zarte. durchscheinende Auflagerung, die leicht milchig getrübt erscheint. Eigenartig ist der die Kolonie in schön gewundener Form umgebende Kragen. In Fig. 10 ist eine derartige Kolonie nach 24stündigem Wachstum (bei 22° C.) photographiert. Die Mitte derselben ist leicht kuppenförmig gewölbt und von einem scharf abgesetzten, zierlichen Kragen umsäumt, der vielfach scharf begrenzte Einbuchtungen aufweist. An einem Abklatschpräparat erkennt man, daß die Mitte aus zahlreichen übereinanderliegenden Auflagerungen besteht, während

den Kragen eine einzige Auflagerung bildet. Schon 12 bis 16 Stunden nach der Aussaat der Keime in die Gelatine erscheinen die ersten, kaum sichtbaren Kolonien und zugleich beginnt der Nährboden zu fluoreszieren. Die tiefliegenden Kolonien sind braun gefärbt, kreisrund, kugelförmig, ohne besondere charakteristische Merkmale. Eine Peptonisierung der Gelatine findet auch nach Wochen nicht statt.

Die Gelatinestichkultur zeigt nur an der Oberfläche Wachstum, während der Impfstich steril bleibt.

Auf schief erstarrte Gelatine überimpft, wächst der in Rede stehende Vibrio mit einer mäßig dicken, scharf begrenzten Auflagerung von schwach braungelber Farbe. Beim Abimpfen gewahrt man eine zähe Konsistenz der Schicht, ohne daß sie fadenziehend ist. Nach einem Tage hat der fluoreszierende Farbstoff den Nährboden vollständig durchdrungen.

Im hängenden Tropfen zeigt der Vibrio eine lebhafte Eigenbewegung. Hie und da sieht man auch S-Formen und ringförmige Fäden, von zahlreichen einzelnen Stäbchen gebildet, deren Länge zwischen 2 und 3 p. schwankt und deren Breite ungefähr ein Drittel der Länge mißt. Sie nehmen basische Anilinfarben, besonders Fuchsin, leicht auf, etwas schwerer Gentianaviolett und Methylenblau. Nach Gram behandelt, werden sie entfärbt.

Ein etwas anderes Aussehen leigen die auf schief erstarrtem Nähragar gezüchteten Kulturen. Die Auflagerung längs des Impfstriches ist dicker und von stark feuchtglänzender Oberfläche, die Ränder derselben nicht scharf konturiert, sondern verwaschen, was wohl auf den großen Wassergehalt dieses Nährsubstrates zurückgeführt werden darf. Das sich im Röhrchen unten ansammelnde Kondenswasser ist getrübt und hat eine zarte Kahmhaut. Der soeben gegebenen Beschreibung entspricht eine Agrarkultur nach 24stündigem Wachstum bei 22° C. Wird der Vibrio bei 32° gezüchtet, treten die genannten Erscheinungen erst nach einigen Tagen auf. Das Temperaturoptimum liegt bei 22° C. Bei 32° C findet noch mäßiges Wachstum statt, während bei der Körpertemperatur von 37° C. Wachstumsstillstand eintritt. Ich setzte

Kulturen durch mehrere Tage einer Temperatur von 37° C. aus, ohne die Spur eines Wachstums zu erkennen. Abgestorben waren die Vibrionen selbst nach 14tägigem Aufenthalt in dieser Temperatur nicht, denn davon hergestellte Ableger gediehen bei Zimmertemperatur wieder vorzüglich. Eine mehrstündige Einwirkung einer Temperatur von 40 °C. genügte zu ihrer Sterilisierung. Bei der Zucht des Vibrio im Warmschrank bei 28°C. ist das Wachstum noch relativ gut, doch treten die Fluoreszenzerscheinungen erst sehr spät auf, gewöhnlich nach dem fünften Tage. Auch die Bewegungsfähigkeit der Vibrionen wird durch höhere Temperaturen ungünstig beeinflußt. Die lebhafteste Eigenbewegung zeigten sie nach 24stündiger Zucht beim Temperaturoptimum (22° C.). Von derartigen Kulturen wurden die in Fig. 3 wiedergegebenen Geißelpräparate nach der Methode von Luksch (l. c.) hergestellt. Die Vibrionen zeigen an jedem Ende 2-3 Geißelfäden, die spirillenartig gewunden erscheinen und das Zwei- bis Dreifache der Körperlänge messen.

Auf die Eiweißzone von Scheiben aus gekochten Hühnereiern überimpft, bildet der Vibrio bei Zimmertemperatur nach 48 Stunden einen braungelben Belag. Nach zwei Monaten ist das gesamte Eiweiß in eine durchsichtige, bernsteinartige, braungelbe Masse umgewandelt.

Die mit dem Vibrio beschickte neutrale Kartoffelscheibe zeigt nach einigen Tagen einen gelben, feuchtglänzenden Belag. Im allgemeinen ist das Wachstum auf diesem Nährsubstrat relativ schlecht.

Auf schief erstarrtem Rinderblutserum wächst unser Vibrio gut und bildet nach 24 Stunden einen zarten, feuchtschimmernden farblosen Belag.

Bouillonkulturen des Vibrio zeigen nach 24stündigem Aufenthalt bei 22°C. mäßige Trübung der Flüssigkeit, eine dünne, beim Schütteln leicht in kleine Flöckchen zerfallende Kahmhaut und einen geringen Bodensatz. Die oberen Schichten der Flüssigkeit beginnen nach dieser Zeit zu fluoreszieren. Bei höherer Temperatur ist das Wachstum schlechter und Fluoreszenzerscheinungen treten später auf. Ausstrichpräparate von Bouillonkulturen zeigen sehr ausgeprägte

Fadenbildungen, wobei die Fäden von 30 und mehr Stäbehen gebildet werden und mannigfaltig verschlungene Formen annehmen (Fig. 1 und 2).

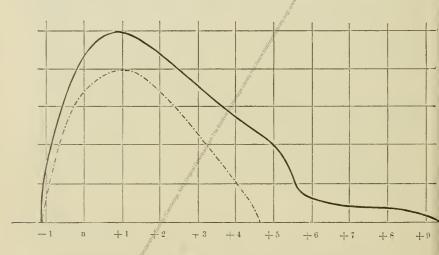
Auf Peptonwasser gedeiht der Vibrio schlecht und sein Wachstum nach 24 Stunden erkennt man nur an einer minimalen Trübung und einem ebensolchen Bodensatz. Selbst nach langer Zeit kommt es zu keiner Kahmhautbildung. Bezüglich des mikroskopischen Bildes eines Peptonwasser-Ausstrichpräparates verweise ich auf das über die Bouillonkultur Gesagte.

In Petruschkys Lackmusmolke (l. c.) tritt nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur Trübung der Flüssigkeit ein. Nach weiteren 24 Stunden beobachtet man einen deutlichen Farbenumschlag in Blau. Vier Tage alte Molkekulturen titrierte ich und verbrauchte zur Herstellung der neutralen Reaktion in 100 ccm Kultur im Mittel 0.76% 1/10 Normalsäure, was also einer Menge von 0.75% gebildeten 1/10 Normal-Alkali entspricht. In sechstägigen und älteren Lackmusmolkekulturen stieg die Menge des gebildeten Alkali im Maximum bis auf 1.05% 1/10 Normal-Alkali. Auch auf Gelatine, die mit Lackmustinktur gefärbt wurde, trät nach zwei Tagen ein Farbenumschlag in Blau ein, der aber wegen der Fluoreszenzerscheinungen hier weniger gut zu sehen ist. Unser Vibrio gehört also zu den schwach Alkali bildenden Bakterien.

Im Gärungskölbehen wird die Traubenzuckerbouillon nur im offenen Schenkel getrübt, ohne vergoren zu werden. Der Vibrio gehört zu den obligaten Äeroben, wie aus dem eben Gesagten zu entnehmen ist und wie es auch der Versuch der Züchtung desselben im Vakuum oder im Wasserstoffstrome beweist, wo jedes Wachstum unterdrückt wird.

Milchkulturen des Vibrio weisen keine makroskopisch kenntlichen Veränderungen der Flüssigkeit auf. Das Wachstum desselben auf dieser Nährsubstanz ist aber ganz ausgezeichnet, da sowohl das Ausstrichpräparat eine große Menge von Vibrionen in einem Gesichtsfelde zeigt als auch Abimpfungen von Milchkulturen auf andere Nährböden jederzeit gelingen.

Wie wir früher gesehen haben, bevorzugt der Vibrio aquatilis fluorescens α zum besten Wachstum einen geringen Alkaleszenzgrad der Gelatine, der zwischen 0.4 und 1% Normal-Alkali liegt. Um nun auch den Vibrio aquat. fluor. β dahin zu untersuchen, legte ich die gleiche Versuchsreihe unter den gleichen Abimpfungsmodalitäten an, wie es früher eingehend beschrieben wurde. Auch hier wird eine Kurve die Verhältnisse am besten erläutern. Diese wurde nach den schon oben angeführten Gesichtspunkten konstruiert und stellt den Wachstumsverlauf für eine Bouillon- und Gelatinekulturenreihe mit verschiedenem, in gleichen Abständen steigenden Säure- und Alkaligehalt nach fünftägigem Aufenthalt bei 22°C, dar.



Betrachten wir zuerst die strichpunktierte Linie, die der Gelatinereihe entspricht. Wir konstatieren Wachstum zwischen 1% Normalsäure- und 5% Normal-Alkaligehalt. Die Wachstumsgröße bei 1% Säure- und 4% Alkaligehalt ist annähernd gleich, genau gleich groß bei Neutral und 2% Alkali. Das Alkaleszenzoptimum liegt bei 1% Normal-Alkali. Nach kürzeren Wachstumszeiten hätte unsere Kurve einen wesentlich anderen Verlauf. Denn nach 24 Stunden beobachtete ich nur in den Röhrchen von Neutral bis 2% Normal-Alkali Wachstum, nach weiteren 24 Stunden erstreckt sich dasselbe zwischen —1 und +4. erst nach fünf Tagen ist das Maximum

der Wachstumsbreite zwischen — 1 und + 5 erreicht. Mit dem zunehmenden Wachstum hält das Auftreten der Fluoreszenz gleichen Schritt.

Vergleicht man diese Kurve mit der Wachstumslinie des Vibrio α , so fällt sofort die geringe Breite ersterer auf; während beim Vibrio α von -2 vielleicht noch über +8 deutlich wahrnehmbares Wachstum statt hat, gedeiht der Vibrio β nur innerhalb enger Säure- und Alkaleszenzgrade. Das Optimum der Alkaleszenz ist für letzteren etwas weiter auf die positive Seite verschoben. Im allgemeinen gleicht die Gelatinekurve des Vibrio β der Bouillonkurve des Vibrio α .

Wesentlich anders gestalten sich die Wachstumsverhältnisse in saurer und alkalischer Bouillon, wie es nach 14tägiger Beobachtungsdauer bei 22° C. die vollausgezogene Kurve zeigt. Der Wachstumsverlauf in kürzeren Zeiten ist ein ganz eigentümlicher. Nach 24 Stunden beobachtete ich in den Röhrchen mit 1% Säure- bis 4% Alkaligehalt Trübung und geringen Bodensatz. Aus der Größe dieser beiden Faktoren konnte man schon zu dieser Zeit das Alkaleszenzoptimum mit 1% Normal-Alkali bestimmen. In den nächsten 24 Stunden trat in diesem Röhrchen Fluoreszenz und eine zarte Kalımhaut auf. Die Breite des Wachstums änderte sich nur sehr wenig und die nach dieser Zeit angefertigte Kurve deckt sich vollständig mit der strichpunktierten Linie Während der nächsten elf Tage war keine besondere Veränderung zu bemerken. Nach 14tägigem Aufenthalt bei 22° C. begannen sich die Röhrchen mit 6 bis 9% Alkaligehalt ganz wenig zu trüben und zeigten einen sehr geringen Bodensatz. Diesem Stadium entspricht die vollausgezogene Kurve, die hier einige Ähnlichkeit mit der Wachstumskurve des Vibrio a auf Gelatine aufweist.

Tierversuche.

Weiße Mäuse zeigten sich gegen subkutane Einspritzungen des Vibriorefraktär.

Für Meerschweinchen erwies sich der Vibrio pathogen. Ein Tier erhielt beim ersten Versuch eine Aufschwemmung von 20 mg junger Agarkultur in 5 ccm Peptonwasser, intraperitoneal eingespritzt. Nach drei Stunden

traten die ersten Krankheitserscheinungen auf, indem das Tier das Haarkleid sträubte und die Freßlust gänzlich verlor. Nach 5 Stunden nahmen die Krankheitserscheinungen noch zu und die im Rektum gemessene Körpertemperatur begann beträchtlich zu sinken. Innerhalb der nächsten 12 Stunden erholte sich das Tier. Ich ließ es töten und fand bei der sofort vorgenommenen Sektion außer einer geringen Vermehrung des leicht getrübten Peritonealexsudates nichts. Darin und im Herzblute konnte ich weder kulturell noch durch das Ausstrichpräparat Vibrionen nachweisen.

Ein zweites Meerschweinchen erhielt 15 mg Agarkultur auf 100 g Körpergewicht, in einigen Kubikzentimetern Bouillon aufgeschwemmt. Es traten schon nach 2 Stunden die oben beschriebenen Krankheitserscheinungen auf, nach 7 Stunden verendete das Tier. Die Autopsie ergab folgende Befunde: Die Pleuralflüssigkeit war etwas vermehrt, aber klar; das rechte Herz prall mit Blut gefüllt. Die Bauchhöhlenflüssigkeit bedeutend vermehrt, dünnflüssig und nur wenig blutigeiterig getrübt. Die Milz groß, die Nebennieren gerötet und das Mesenterium mäßig injiziert. Die von Herzblut angelegten Kulturen blieben steril, während die mit dem Peritonealsaft beimpften Agarröhrchen ein üppiges Wachstum des Vibrio in Reinkulturzeigten.

Ich infizierte nun ein drittes Meerschweinchen mit den aus dem Peritonealexsudate angewachsenen Kulturen in einer Dosis von ca. 5 mg auf 100 g Körpergewicht. Nach leichtem Unwohlsein erholte sich dieses Tier rasch.

Ein viertes Meerschweinchen bekam auf 100 g Körpergewicht 10 mg eines frischen Ablegers der vom zweiten Tier gewonnenen Vibrionen-Kulturen. Das Meerschweinchen ging nach 14 Stunden ein. Der Sektionsbefund deckte sich mit dem früheren vollständig, ebenso der Ausfall der angelegten Kulturen. Nur aus dem Peritonealsafte gingen solche an, während der Herzblutausstrich steril blieb. Von einer besonderen Steigerung der Virulenz konnte ich bisher nichts beobachten. Um annähernd die Virulenz des Vibrio β zu bestimmen, infizierte ich eine größere Reihe von Meer-

schweinchen mit verschiedenen gewogenen Mengen 24stündiger Agarkultur. Von einer Wiedergabe der Tabellen in extenso kann ich füglich absehen, da die dabei gewonnenen Resultate gerade keine ermutigenden waren. Trotz mehrerer Versuchsreihen krepierten immer nur die Meerschweinchen, welche eine Dosis von mindestens 10 mg Kultur auf 100 g Körpergewicht erhielten. Eine größere Virulenz des Vibrio β konnte ich durch fortgesetzte Tierpassagen nicht erreichen. Vielleicht wäre die Virulenz für das Meerschweinchen bedeutend gestiegen, wenn ich den Vibrio auf Meerschweinchenagar gezüchtet hätte, wie ich es für den Vibrio cholerae asiaticae beschrieb. Da ich aber die Untersuchungen über diese Wasservibrionen viel früher ausführte als die Virulenzsteigerungsversuche von Choleravibrionen, wollte ich wegen anderer Arbeiten die ersteren nicht nochmals aufnehmen.

Die oben angeführten Tierexperimente zeigen ans, daß es bei der tödlichen Infektion mit diesen Vibrionen nicht zu einer Septikaemie kommt. Ein Übertritt dieser Vibrionen in die Blutbahn der mit ihnen infizierten Tiere dürfte überhaupt zu keiner Zeit der tödlichen Erkrankung vorkommen, da auch geimpfte Meerschweinchen, die zu verschiedenen Zeiten der Krankheit getötet wurden, ein völlig steriles Herzblut besaßen. Schon kurze Zeit nach der intraperitonealen Einverleibung von Kulturaufschwemmungen entwickelt sich in der Bauchhöhle eine rege Phagocytose. Das Peritonealexsudat enthält zu allen Zeiten der Erkrankung eine große Menge von Eiterzellen mit segmentierten Kernen und zahlreichen Vakuolen, in denen Vibrionen massenhaft aufgenommen sind.

Die früher beschriebenen Versuche legten die Vermutung nahe, daß den tödlichen Ausgang der Infektion ein in den Vibrionen aufgespeichertes oder von ihnen vielleicht abgeschiedenes Gift bedingt. Um darüber Klarheit zu schaffen, züchtete ich in Erlenmayer Kolben die Vibrionen auf größeren Mengen Bouillon und filtrierte derartige Kulturen durch Berkefeld-Filter. Diese Filtrate spritzte ich Meerschweinchen

¹ Fuhrmann F., Über Virulenzsteigerung eines Stammes des Vibrio cholerae asiaticae. Sitzungsbericht d. kais. Akad. Wien; Bd. CXII, III. Abt., 1903.

in größeren und kleineren Portionen in die Bauchhöhle. Alle von lebenden, 24stündigen Bouillonkulturen gewonnenen Filtrate erwiesen sich als vollständig ungiftig. Wurden die Kulturen länger als 5 Tage gezüchtet, so enthielten die Filtrate geringe Giftmengen, da sehr große Dosen derselben Meerschweinchen töteten. Damit war bewiesen, daß in die Nährflüssigkeit von jungen Kulturen kein Gift ausgeschieden wird und erst spät solches in geringen Mengen darin auftritt. Ich legte nun nochmals größere Quantitäten von Bouillonkulturen und Agarkulturen 1 an und sterilisierte sie nach 24stündigem Wachstum durch Chloroformdämpfe. Die davon hergestellten Filtrate besaßen eine große Giftigkeit, denn es genügten wenige Kubikzentimeter davon, um damit Meerschweinchen innerhalb von 24 Stunden durch intraperitoneale Einspritzung zu töten. Dadurch scheint die Annahme bestätigt, daß unser Vibrio Gift bildet, dieses aber während seiner Lebensdauer nicht an die Umgebung abgibt. Das Gift ist also zum größten Teil an die Zellen gebunden.

Da die Unterschiede der eben beschriebenen Vibrionen keine sehr bedeutenden sind und vornehmlich im Temperaturoptimum, welches bei ersterem um 32°C. liegt, bei dem Vibrioβ dagegen um 22°C., und in der geringen Säureproduktion des ersteren und Alkalibildung des anderen gipfeln, abgesehen von nicht schwerwiegenden, morphologischen Abweichungen, liegt der Verdacht nahe, daß es sich gar nicht um zwei verschiedene Vibrionen handelt. Es ist ja eine bekannte Tatsache, daß Bakterien bei der Zucht im Laboratorium auf den verschiedenen Nährsubstanzen oft sehr wesentliche biologische Eigentümlichkeiten einbüßen oder verändern. In unserem Falle sind diese Einwände nicht stichhältig, da beide Wasservibrionen beinahe zur gleichen Zeit aus den erwähnten

¹ Die Filtrate von Agarkulturen stellte ich folgendermaßen her: 24stündige Agarkulturen wurden durch Chloroformdämpfe sterilisiert, die Auflagerungen abgeschabt und mit sterilem Wasser in sterilen Gefäßen verrieben. Diese Bakterien-Emulsionen wurden dann mit Berkefeld-Filtern filtriert.

Wässern isoliert und sofort einer genauen Untersuchung unterworfen wurden, deren Ergebnisse hier niedergelegt sind. Demnach erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß es sich in der Tat um zwei verschiedene Vibrionen handelt, wenngleich es zumindest auffallend ist, daß zwei so weit entfernte Wässer so nahe verwandte Vibrionen beherbergten.

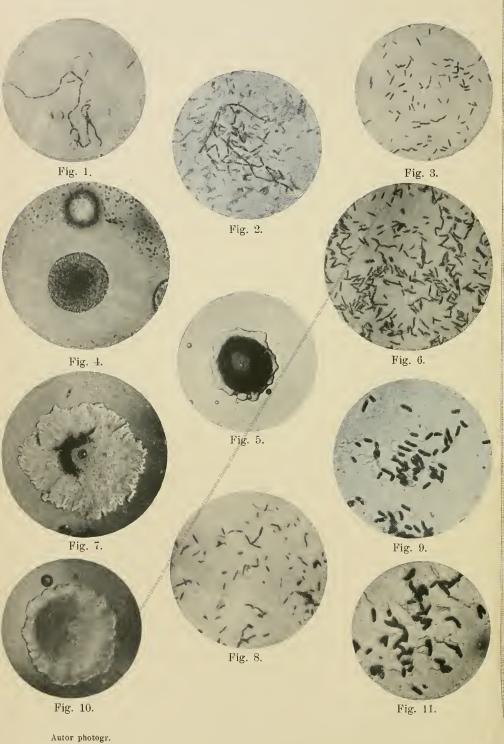
Ich füge noch eine tabellarische Übersicht der morphologischen und biologischen Merkmale beider Vibrionen bei, aus der sich die Differenzen ohneweiters entnehmen lassen.

| | Vibrio aquatilis fluorescens a. | Vibrio aquatilis fluorescens β. |
|--|---|--|
| Oberflächenkolon ie auf neutraler Gela- tine bei 22° C.: | Blattförmige, vielfach gebuchtete, in der Mitte verdickte, schwach gelbweiß gefärbte, durchscheinende Auflagerungen. Gelatine nicht peptonisierend; Fluoreszenz des Nährsubstrates nach 24 Stunden. | Kreisrunde, in der Mitte kuppenförmig erhobene, mit einem zarten, gewellten Kragen umsäumte, fast durchsichtige Auflage- rungen, Gelatine nicht ver- flüssigend. Nach 24 Stunden Bildung des finoreszieren- den Farbstoffes. |
| Gelatine- Stiehkultur: | Wachstum nur an der Ober- fläche, der Impfstich bleibt steril. | Wachstum nur an der Ober- fläche, der Impfstich bleibt steril. |
| Ausstrichpräparat von jungen Gelatinekulturen: | leicht gekrimmte, 2-3 9. lange Stäbehen, nicht spirillenbildend, Gram-isch nicht färbbar. | Wenig gekrümmte Stäbchen von 1½-2 ½ Länge, des öfteren zu Fäden von mehreren Gliedern vereinigt, nach Gram nicht färbbar. |
| Agarkultur bei 32º C. nach 24 Stunden : | lichtgelbbranner, mäßig dicker Belag, Fluoreszenz des Nährbodens nach 24 Stunden, Stäbehen messen 11/2-24/2 µ, 1/3-1/4 der Länge breit. | Spärliches Wachstum, keine Fluoreszenz. Erst nach 48 Stunden mäßige, gelbweiße Auflagerung. Ausstrichpräparat zeigt Stübehen von $1-1^{1}/_{2}$ µ Dicke, $0.3-0.5$ µ Breite. |
| Kartoffelkultur bei 32° C.: | braungelber, dünner Belag. | Erst nach einigen Tagen Wachstum; Auflagerung gelblich und sehr dünn. |

| | Vibris aquatilis fluorescens a. | Vibris aquatilis Auorescens β. |
|--|--|---|
| Eikultur (gekochtes Ei) bei 22° C.: | schwach gelbbraune Autlagerung auf dem infizierten Eiweiß, das nach 2 Monaten in eine braungelbe, bernsteinartige, durchsichtige Masse nugewandelt wird. | Wie bei Vibrio α. |
| Eigenbewegung, Geißeln: | Typische Vibrionenbewegung, am lebhaftesten nach 24stündiger Zucht auf Agarbei 32°C. 3—5, an der Abgangsstelle verklebte, Geißelfäden an jedem Poledes Vibrio. | Typische Vibrionen- bewegung, am lebhaftesten nach 24stündigem Wachs- tum auf Agar bei 22° C. 2—3 Geißeltäden an jedem Pole Die Länge derselben miktdie2—3fache Bazillen- länge. |
| Bonillonkultur nach 24 Stunden bei 32° C.; | Dicke Kahmhant, allgemeine Trübung und Boden satz. Fluoreszenz in den oberen Partien der Flüssigkeit. Leichtgekrümmte Stäbehen, des öfteren zu Fäden von 2-4 Gliedern vereint. | Noch kein Wachstum zu beobachten. Nach einigen Tagen Trübung und ge- ringer Bodensatz. Starke Fadenbildung. |
| Peptonwasserkultur nach 24 Stunden bei 32° C.: | Geringe Trübung der Flüssigkeit und mäßiger Bodensatz. Stäbehen gleichen denen aus Bonil- lankultur. | Noch kein Wachstum, Erst nach 5-6 Tagen spurweise Trübung der Flüssigkeit und sehr geringer Boden- satz. |
| Lackmusmolkekul- turen nach 5tägigem Wachstum bei 22°C.: | Bildung von 2% ¹ 10 Normal- Sänre Allgemeine Trübung und Bodensatz. | Bildung von 1.05% ¹ 10 Normal-Alkali, Allgemeine Triibung und Bodensatz. |
| Milehkultur nach einigen Wochen: | Keine makroskopisch sicht- baren Veränderungen der Flüssigkeit. Wachstum gnt. | Wie bei Vibrio α. |
| Gärnngsprobe: | negativ, nur Trübung im offenen Schenkel. | Wie bei Vibrio α. |
| Temperaturoptinium | 32º C. | 22° C. |
| Alkaleszenzőpti- | Zirka 0·5º/o Normal-Alkali- gehalt des Nährsubstrates. | 1% Normal Alkaligehalt des Nährbodens. |
| Tickpathogenität: | Weiße Maus und Kaninchen refraktär. Meerschweinchen werden durch intraperitoneale Einspritzung von mindestens 15 mg junger Agarkultur auf 100 g Körpergewicht, innerhalb 24 Stunden getötet. | Weiße Maus refraktär. 10 mg frischer Agarkultur auf 100 g Körpergewicht töten Meerschweinchen nach intraperitonealer In- fektion innerhalb 24 Stunden. |



F. Fuhrmann, Untersuchungen über fluoreszierende Wasservibrionen.



Erläuterungen zu den Photogrammen.

Sämtliche Aufnahmen wurden mittelst des großen, mikrophotographischen Apparates von Zeiß und Apochromaten derselben Firma hergestellt. Als Lichtquelle diente eine 30 Amp. Bogenlampe. Alle Aufnahmen sind unter Anwendung des Chromsäure-Kupfer-Filters von Zettnow in 1 em dieker Schicht auf orthochromatischen Platten der Firma Lumiere angefertigt.

Fig. 1 u. 2 zeigen das Bild eines Ausstrichpräparates einer älteren Bouillonkultur des Vibrio β , bei 22^0 C. gezüchtet. Färbung mit wässrigem Methylenblau. Vergr. = 1000

Fig. 3. Ausstrichpräparat des Vibrio β von einer 24stündigen Agarkultur, Gefärbt mit wässriger Fuchsinlösung. Vergr. = 1000.

Fig. 4. Bild einer Oberflächenkolonie des Vibrio α , auf Nährgelatine mit 6% Normal-Alkaligehalt gewachsen. Am Rande sind noch kleine dunkle, hellumsäumte Fleckchen zu sehen, die auskrystallisierten Salzen entsprechen. Die gebildete Säure hat in der Umgebung der Kolonien diese Salze gelöst und die Gelatine durchsichtig gemacht. Vergr. =30.

Fig. 5. Photogramm einer Oberflächenkolonie des Vibrioß, auf Gelatine mit 1% Normal-Säuregehalt gewachsen. Vergr. = 50.

Fig. 6. Bild eines Ausstrichpräparates des Vibrio a, gezüchtet auf Nähragar bei 32°C., gefärbt mit wässriger Fuchsinlösung. Vergr. = 1000.

Fig. 7. Oberflächenkolonie des Vibrio z, auf neutraler Nährgelatine nach 48stündigem Wachstum bei Zimmertemperatur. Vergr. = 30.

Fig. 8. Photogramm eines Ausstrichpräparates des Vibrio α aus einer älteren, neutralen Bouillonkultur. Färbung mit wässriger Methylenblaulösung. Vergr. = 1000.

Fig. 9. Bild eines Geißel-Präparates vom Vibrio β bei 1000facher Vergrößerung.

Fig. 10. Oberflächenkolonie des Vibro β auf neutraler Nährgelatine nach 24stündigem Wachstum bei 22^0 C. Nergr. =50.

Fig. 11. Photogramm eines Geißel-Präparates des Vibrio α bei 1000facher Vergrößerung.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen des naturwissenschaftlichen Vereins

<u>für Steiermark</u>

Jahr/Year: 1905

Band/Volume: 41

Autor(en)/Author(s): Fuhrmann Franz

Artikel/Article: Untersuchungen über fluoreszierende

Wasservibrionen. 82-101