

Über Anaerobiose, zwei Fäulniserreger und *Bacillus botulinus*.

Von Karl Würcker.

Aus dem hygienisch-bakteriologischen Institut der Universität Erlangen.

Erster Teil.

Untersuchungen über einige Züchtungs- und Isolierungsmethoden.

A. Die Züchtung in flüssigen Substraten.

Allgemeines und geschichtlicher Überblick.

Die Züchtungsmethoden der Anaerobier sind, soviel man sich auch mit ihnen beschäftigt hat, noch wenig einheitlich, und immer wieder sind neue Vorschläge aufgetaucht, wie den entgegen tretenden Schwierigkeiten zu steuern wäre.

Lange Zeit hatte man peinliche Sorgfalt darauf gelegt, den Zutritt freien Sauerstoffes zu den Kulturen abzuhalten und den in ihnen enthaltenen Sauerstoff zu evakuieren, durch ein möglichst indifferentes Gas zu verdrängen oder durch chemische Mittel zu binden.

Die Evakuierung ließ man aber bald wieder fallen, da es selten gelang, den an den Wänden der Kulturgefäße sich festsetzenden Sauerstoff in genügender Weise zu entfernen, um das richtige Spannungsminimum zu erreichen. Bei Durchleitung von Wasserstoff mißlang die Züchtung in manchen Fällen, da besonders empfindliche Bakterien selbst durch dieses recht indifferente Gas geschädigt werden können; sie ist auch etwas umständlich. Die Absorption des Sauerstoffes, besonders mit Pyrogallol und in der Buchnerschen Röhre, hat sich sehr bewährt; doch sann man auf einfachere Methoden: einmal um Zeit zu sparen, dann um vielleicht das tenere Pyrogallol zu

umgehen, und endlich um in der Beobachtung der Kulturen durch die oft bis zum tiefsten Schwarzbraun eintretende Verfärbung nicht gehindert zu sein.

Die Züchtung ohne Abschluß der Luft.

Die Kultur von Anaerobiern (als Reinkultur ohne Zusatz sauerstoffzehrender Bakterien) möglichst ohne Luftabschluß hat sich verhältnismäßig spät Eingang verschafft.

Zwar hatten bereits 1889 Tizzoni, Cattani und Baquis die Beobachtung gemacht, daß der Tetanusbazillus in Kaninchenblut ohne anaerobiotische Kautelen zur Entwicklung kam. Schon im folgenden Jahre erschien eine Abhandlung von Theobald Smith, in der er mitteilt, daß er strenge Anaerobier in einer Bouillon gezüchtet habe, der ein Stück Organewebe, sei es Leber, Milz oder Niere zugesetzt war, und im Jahre 1899 folgten die Mitteilungen E. v. Hiblers über das Wachstum von *Bac. tetani* und anderen strengen Anaerobiern in dickflüssigem Hirnbrei und sterilisiertem Kaninchenblut, von denen er das erstere Nährsubstrat später auch speziell zur Anreicherung verwendete.

So wichtig diese Entdeckungen waren, scheinen sie doch die verdiente Beachtung nicht gefunden zu haben, bis im Jahre 1905 Tarozzi berichtete, daß er Tetanus-, Pseudotetanus- und Rauschbrandbazillen unter Luftzutritt in gewöhnlicher Bouillon wachsen sah, wenn in ihr nur ein Stück irgendeines steril entnommenen Organes von Kaninchen, Meerschweinchen etc. enthalten war.

Doch die Forderung der sterilen Entnahme des benötigten Organstückes komplizierte das Verfahren vorerst noch.

Tarozzi schrieb den Erfolg einer in der Leber enthaltenen wasserlöslichen, aber nicht hitzebeständigen Substanz zu, die durch Reduktionswirkungen die Anaerobier zur Entwicklung kommen ließe. Daß die Theorie von der Hitzeunbeständigkeit dieser Substanz nicht stichhaltig ist, hat Wrzosek nachgewiesen, nach dessen Angaben selbst eine bis auf 140° erhitzte Organbouillon für anaerobiotische Kulturen verwendbar ist; andererseits wollte Hata nicht unwesentliche Schädigungen beobachtet haben, die der Nährboden unter der Einwirkung höherer Temperaturen von 60° aufwärts erleide. Auch Wrzosek hat eine Minderung der Reduktionswirkung gesehen, aber nur dann, wenn

der Nährboden längere Zeit, d. h. tage- und wochenlang dem Licht und der Luft ausgesetzt war; insbesondere stellte er fest, daß die in den Nährboden eindringende Luft schädige. Der Hitze schreibt er keine Verminderung der Wirkung zu, er fand im Gegenteil, „daß die in Rede stehende Substanz sich nicht bloß in frischen, sondern auch in sterilisierten, nicht frischen, ja sogar der Fäulnis anheimgefallenen Gewebsstücken befindet“, und endlich, daß Holzkohle, Steinkohle und Koks das Wachstum der Anaerobier in Bouillon ermöglichen.

Nach meinen Erfahrungen mit Organbouillon muß ich mich, was die Hitzebeständigkeit oder -unbeständigkeit jener Substanz anbetrifft, den Ausführungen Wrzoseks anschließen. Im Gegensatz zu Hata habe ich durch Erhitzen keine in Betracht kommende Wachstumsverzögerung beobachtet, wenigstens was den Bac. tetani betrifft, da ich mit Rauschbrand- und malignen Ödembazillen keine Untersuchungen angestellt habe. Hata berichtet, daß bei Gewebe, das eine Stunde bei 100° im strömenden Dampf gehalten worden war, erst am dritten Tage Wachstum eintrat. Ich habe meine Organbouillon zwar nur $\frac{3}{4}$ Stunde (vom Strömen des Dampfes ab gerechnet) sterilisiert, hatte die zugesetzte Leber aber in der Regel vorher schon einmal $\frac{3}{4}$ Stunde bei 100° gehalten, so daß bei meiner Bouillon die Organstücke eigentlich $1\frac{1}{2}$ Stunde dem strömenden Dampf ausgesetzt waren. Trotzdem habe ich auch bei dem Bac. tetani schon nach 24 Stunden beginnendes Wachstum feststellen können. Einen Vergleich mit steril entnommenen Organen habe ich nicht gemacht, da Wachstum stets in befriedigender Weise eintrat und ich keinen Mißerfolg zu verzeichnen hatte.

Bei entsprechend sorgfältiger Herstellung der Kulturröhrchen bekommt man auch keine Trübungen, die E. Pfuhr und Hata störend finden. Man muß sich nur vorsehen, daß frische Leber beim Einführen in das Reagenzglas nicht gepreßt und daß womöglich kein Blut herausgedrückt wird. Ferner soll man die darüber zu schichtende Bouillon behutsam an der Glaswand entlang einfließen lassen; noch leichter erhält man eine klare Flüssigkeit, wenn man sterilisierte Leber verwendet. Ein Beschmieren der Wände wird dadurch vermieden, daß man weitere Reagenzgläser verwendet und sie durch ein engeres, dessen Kuppe man abgeschnitten hat, füllt.

Ich habe niemals eine Verunreinigung in meinen Röhrcchen gesehen, die auf ungenügende Sterilisation zurückzuführen war. v. Hibler sterilisierte seinen Hirnbrei 3—4 mal in Zwischenräumen von 1—2 Tagen jedesmal mindestens eine halbe Stunde lang im Dampfapparat; er hält von den Sterilisierungswegen, die Wrzosek und Harras einschlugen, nur den Wrzoseks in allen Fällen für sicher. Wenn man im übrigen die Vorsicht gebraucht, die einige Tage aufbewahrten Röhrcchen auf Sterilität zu prüfen, wird man nicht durch hitzebeständige Keime belästigt werden. Bei einem aufmerksamen Laboratoriumsbetrieb kann das zunächst vereinzelte Vorkommen solcher Verunreinigungen bemerkt und darf im Interesse der Durchführung aller bakteriologischen Aufgaben nicht übersehen werden.

Eine Modifikation der Organbouillon hat E. Pfuhl gemacht, um eine völlig klare Bouillon zu erhalten; er bereitet sie nicht wie üblich aus Muskeln, sondern aus frischer Rinderleber und will damit bei Züchtung von *Bac. tetani*, *Bac. putrificus* Bienstock und anderen strengen Anaerobiern gute Resultate bekommen haben. (Er bemerkt nur, daß sein Tetanusstamm in dieser Bouillon an Giftigkeit verloren habe.) Dadurch würden also die Untersuchungen Wrzoseks über die Wasserlöslichkeit und Hitzebeständigkeit der reduzierenden Substanz bestätigt.

Man ist aber nicht allein auf organische Stoffe angewiesen; auch anorganische sind verwendbar, nämlich Metalle und Salze, die, der Nährbouillon in gewisser Konzentration zugesetzt, oft ein sehr lebhaftes Wachstum der Anaerobier bewirken. Trenkman ist wohl der erste gewesen, der ein anorganisches Reduktionsmittel nahm, und zwar Natriumsulfid (Na_2S), das er in ein flüssiges Nährmittel brachte und damit ohne weiteres Wachstum von Anaerobiern erzielte. Hammerl versuchte es etwas später mit Ammoniumsulfhydrat. Aber damit gelang die Züchtung nicht ganz in der gewöhnlichen Weise; es mußte erst wie beim Wrightschen Verfahren — das sich in variiertem Form auch Burri zunutze gemacht hat — ein mit Pyrogalllösung getränkter Wattebausch in das Reagenzglas geschoben und ein Gummipfropfen wenigstens so lange darüber gesetzt werden, bis ein gewisser Grad der Entwicklung eingetreten war.

Auch Rivas nahm Ammoniumsulfhydrat; er bewirkte aber den Abschluß des Sauerstoffes durch eine 2 cm hohe Ölschicht.

Doch ist diese für einen exakten Luftabschluß allein unzureichend, wie ich später ausführen werde. Rivas versah übrigens, als er die Durchlässigkeit der Paraffinölschicht erkannt hatte, seine Gläser mit einer Einschnürung.

Andere, wie Wrzosek, fanden Eisen, Zink und Kreide, Hata neben Eisen, Zink, Aluminium und in schwächerem Maße Zinn, Schwefelverbindungen des Natriums, besonders Natriumsulfit (Na_2SO_3) als Zusatz zur Bouillon geeignet, letzteres freilich nur dann, wenn ein Stück Agar mit überimpft wurde, während Zusatz von Natriumsulfit allein kein Wachstum hervorzubringen vermochte. Die Giftigkeit eines vollvirulenten Tetanusstammes war nach Hata in der Eisenbouillon sehr reduziert, in der Natriumsulfitbouillon oft stärker als in Organbouillon, mitunter auch stärker als unter Wasserstoff.

Untersuchungen über verschiedene Reduktionsmittel.

So jung die Züchtung der Anaerobier ohne Luftabschluß ist, hat doch das Interesse hierfür schon viele Arbeiten gezeitigt; aber die sich ständig mehrende Literatur über dies oder jenes mit positivem Erfolge angewendete Zusatzmittel ist fast geeignet, in die bestehenden Verhältnisse mehr Verwirrung als Klarheit zu bringen. Ich habe daher wenigstens einen Teil der mannigfachen Reduktionsmittel, bei deren Gebrauch von positiven Resultaten berichtet wird, auf ihren praktischen Wert geprüft und zwar zunächst an vier Stämmen, nämlich an:

Bac. putrificus, bezogen von Král,

Bac. putrificus, der dem Institut von Herrn Dr. Bienstock in Mülhausen überlassen war,

einem von E. v. Hibler gefundenen und als „Art 15“ bezeichneten Eiweißzersetzer,

Bac. tetani aus der Institutssammlung.

Damit wurde geimpft (vgl. die umstehende Tabelle) je ein Röhrchen mit 10 ccm (im strömenden Dampf sterilisiert):

Bouillon nach Tarozzi (aber mit bereits vorher schon einmal sterilisierten Organstücken),

Leberextrakt nach E. Pfuhl,

Hirnbrei nach v. Hibler,

gewöhnlicher Bouillon von schwach alkalischer Reaktion

+ Kartoffelzusatz,

gewöhnlicher Bouillon von neutraler Reaktion + 0,05, 0,07 und 0,1 g Natriumsulfit,
 gewöhnlicher Bouillon von schwach alkalischer Reaktion + 0,5 g Eisenfeilicht,
 gewöhnlicher Bouillon von schwach alkalischer Reaktion + je 1,0 g Tierkohle, Holzkohle, Steinkohle und Koks,
 Leberextrakt nach E. Pfuhl von schwach alkalischer Reaktion + 0,5 g Eisenfeilicht,
 Leberextrakt nach E. Pfuhl von neutraler Reaktion + 0,05, 0,07 und 0,1 g Natriumsulfit.

In fast allen Röhrchen erfolgte Wachstum. Es versagten nur die, die Natriumsulfit (Na_2SO_3) enthielten, und zwar bei Bac. tetani und den beiden Stämmen von Bac. putrificus.

	Entwicklung am ? Tage von:					
	Bac. putrificus		v. Hiblers Art 15	Bac. tetani		
	Kräl	Bienstock				
Nährboden (10 ccm hohe Schicht) bereitet nach	v. Hibler	1	1	1	1	
	Tarozzi	1	1	1	1	
	E. Pfuhl	1	1	1	1	
Bouillon nach E. Pfuhl, zu 10 ccm 0,5 Fe		1	1	1	1	
Neutrale E. Pfuhsche Bouillon, versetzt mit Natriumsulfit (Na_2SO_3), auf je 10 ccm	{	0,05	—	—	1	—
		0,07	—	—	1	—
		0,10	—	—	1	—
Neutrale gewöhnliche Bouillon, versetzt mit Natriumsulfit (Na_2SO_3), auf je 10 ccm	{	0,05	—	—	1	—
		0,07	—	—	1	—
		0,10	—	—	1	—
Gewöhnliche Bouillon (schwach alkalisch) dsgl. zu 10 ccm 0,5 Fe		—	—	—	—	
dsgl. zu je 10 ccm 1 g von	{	Kartoffel	2	2	1	2
		Tierkohle	2	1	2	2
		Holzkohle	—	2	1	—
		Steinkohle	—	1	2	2
		Koks	2	2	2	2
		3	2	1	2	

Ist nun ein Mittel, bei dessen Anwendung man ohne Luftabschluß Wachstum von Anaerobiern beobachtet, damit auch praktisch zu Züchtungszwecken verwendbar? Ich glaube nicht. Denn dazu gehört vor allem, daß die Bakterien abgesehen von der Entwicklung normaler Formen bestimmte typische Eigen-

schaften äußern. Von diesem Gesichtspunkt aus ist insonderheit die Natriumsulfit- sowie die Eisenbouillon nicht empfehlenswert.

In ersterer war das Wachstum der Art 15 v. Hiblers ganz ohne Gärung verlaufen; auch in einer Pfuhsalzbouillon. Ich erwähne das ausdrücklich, weil Art 15 in Pfuhsbouillon sonst eine sehr lebhaft Gärung verursacht, zumal wenn man sie über Pyrogallol stellt. Es lag somit nahe, daß Natriumsulfit eine die Gärung hindernde und damit vielleicht für viele Bakterien entwicklungshemmende Wirkung hat. Daher versetzte ich je drei Röhren mit Pferdeleber und mit Muskeln vom Schwein, überschichtete sie mit 10 ccm neutral reagierender Bouillon und gab dann noch 0,05 g Natriumsulfit hinein. Zur Impfung benutzte ich für je ein Röhren mit Pferdeleber sowohl wie mit Schweinefleisch *Bac. putrificus* Kräl, Bienstock und Art 15 und legte zu jedem Röhren eine Kontrollkultur an, die eine gleiche Quantität und Qualität von Gewebe wie das Versuchsröhren enthielt, nur daß es mit 10 ccm gewöhnlicher Pferdefleischbouillon überschichtet war. Während in allen Kontrollröhren die Entwicklung mit energischer Gärung verlief, entwickelte sich in den Röhren mit Salzzusatz nur die Art 15; ihr Gärungsvermögen war aber auch hier auf ein Minimum reduziert, obwohl die Fäulnis, nach dem intensiven Geruche zu schließen, sehr lebhaft sein mußte.

In der Eisenbouillon war die Entwicklung gut bis auf den Tetanusbazillus, der häufig zu langen Fäden auswuchs und keine Neigung zur Sporulierung zeigte. Hata hat nun festgestellt, daß die Giftigkeit eines vollvirulenten Tetanusstammes in Eisenbouillon auf weniger als 100 g + Ms pro 1 ccm herabsank, und Ferrán und Grixoni haben nachgewiesen, daß der *Bac. tetani* nicht nur streng anaerobiotisch wächst, sondern daß er sich unter Umständen dem Substrat anpassen kann, ja daß er bei geeigneter Umzüchtung vollständig aerobiotisch gedeiht, dann aber die Fähigkeit der Sporen- und Toxinbildung verliert. Man darf daher wohl aus jenem Sinken der Giftigkeit in Eisenbouillon schließen — wie es auch Hata tut —, daß in ihr nicht der Sauerstoffmangel herrscht, der zu einer strengen Anaerobiose verlangt werden muß.

Die Tierkohle hat sich als nicht geeignet erwiesen. Tetanus-

bazillen wuchsen in dieser Bouillon überhaupt nicht, die übrigen geprüften Arten nur sehr mangelhaft.

Bessere Existenzbedingungen boten Holzkohle, Steinkohle und Koks. Doch schienen sie dem *Bac. putrificus* Kräl weniger zuzusagen, da dieser noch am dritten Tage gegenüber dem Bienstockschen Stamm und Art 15 sehr rückständig war. Der Tetanusbazillus ging gleichfalls nur langsam an, die Versporung kam zögernd und mangelhaft, und Art 15 zeigte viele Involutionsformen.

Die Kartoffel scheint, nach der erhöhten Tätigkeit von Art 15 und den Putrificusarten zu schließen, als Zusatzmittel zu Bouillon geeignet, nur schien mir bei *Bac. tetani* die Sporulation etwas verzögert zu sein.

Am besten von allen Flüssigkeiten hat sich die Bouillon aus tierischem Organgewebe bewährt. Doch schwankt ihre Brauchbarkeit je nach der Art der Bereitung. Selbstverständlich sind alle Nährsubstrate, auch die mit Zusatz von festen Stoffen, dem schädigenden Einfluß der Luft ausgesetzt; aber diese trifft in ihnen grundverschiedene Verhältnisse an: einerseits eine Flüssigkeit, in der die reduzierende Substanz gelöst ist, andererseits Organstücke, die als solche reduzierend wirken, und von denen etwas in Lösung geht, sei es, daß sie in Klumpen am Boden liegen oder mehr verteilt der Flüssigkeit ein breiförmiges Aussehen verleihen.

Bei der Pfuhschen Flüssigkeit ist das Reduktionsvermögen nach 5—6 Tagen erheblich gesunken. Ich machte diese Beobachtung besonders mit Art 15, die, sonst Gram-beständig, in Pfuhibouillon plötzlich JG— geworden war. Als die Gram-negativen Bakterien zur Kontrolle, ob man es etwa mit einer Alterserscheinung zu tun habe, in Tarozzische Bouillon (wie ich der Kürze halber die nach seinem Vorgang bereitete, aber sterilisierte Bouillon nennen will) überimpft worden waren, wurden sie wieder JG+ und bei erneuter Überimpfung in Pfuhibouillon aufs neue JG—. Zwar war die Entwicklung sehr reichlich, fast gesteigerter als in anderen Medien, aber die Bildung von kurzen Ketten bis zu sechs und sieben Gliedern verschwand, kaum daß einmal zwei Stäbchen aneinander lagen, und die sonst kräftigen, geraden Bazillen waren mehr oder weniger geschrumpft.

Als ich dieser Erscheinung nachging und eine solche Bouillon unmittelbar nach der Entnahme aus dem Sterilisierungsapparat und nach rascher Abkühlung mit Art 15 impfte, erschien sie zunächst JG +, die Farbbeständigkeit vieler Individuen hatte aber schon nach zweimal 24 Stunden bedeutend nachgelassen, und sechsmal 24 Stunden später war überhaupt keine Gram-positive Form mehr vorhanden.

Auch den anderen geprüften Arten gewährte diese Bouillon nur kurze Zeit die für ihr Fortkommen nötigen Lebensbedingungen; besonders der Tetanusbazillus zeigte schon von Anfang an keine Neigung Sporen zu bilden.

Ein gewisser Wert muß aber der Leberextraktbouillon zugesprochen werden, den sie vor der gewöhnlichen Muskelbouillon voraus hat: ihr ziemlich großer Gehalt an reduzierender Substanz. Ich habe deshalb die Methoden Tarozzis und E. Pfuhs kombiniert, indem ich bei der Tarozzischen Bouillon die Flüssigkeit durch den Leberextrakt E. Pfuhs ersetzte. So wurde die Reduktionswirkung in doppelter Hinsicht ausgenutzt und ein Substrat erhalten, das länger als andere für die Anaerobierzüchtung brauchbar bleibt. Mit dieser Kombination habe ich noch nach vier und fünf Wochen gute Resultate erzielt, stets, ohne das Nahrungsmittel vorher ausgekocht zu haben, schon einen Tag nach der Impfung Entwicklung bekommen und niemals abnorme Erscheinungen im Wachstum oder in Gärungsäußerungen beobachtet.

Es ist nicht ohne Belang, ob man Leber von diesem oder jenem Tiere verwendet. Pfuhs schreibt zwar Rinderleber vor; da aber eine Begründung fehlt, warum es gerade Rinderleber sein solle, machte ich der Billigkeit halber Versuche mit Pferdeleber. Diese hat sich aber zur Bouillonbereitung nicht zweckmäßig gezeigt, da das aus ihr gewonnene Fleischwasser selbst bei vier- und fünfmal wiederholtem Kochen und Filtrieren im Dampf immer wieder Niederschläge gibt, so daß man nie eine klare Flüssigkeit erhält. Diese Absetzungen treten mitunter auch bei Rinderleber auf, sind aber in der Regel mit nochmaligem Filtrieren und Kochen behoben. Sie stellen sich dann gern ein, wenn man bei der Bereitung des Fleischwassers die Leber zu kurze Zeit im Dampf hält. Man tut daher gut, gleich $1\frac{1}{4}$ — $1\frac{1}{2}$ Stunde zu kochen. In diesen Fällen blieb die erhaltene

Flüssigkeit beim Sterilisieren von Niederschlägen frei. Immerhin gebietet es die Vorsicht, das Fleischwasser vor der Bouillonbereitung der Sicherheit halber nochmals mindestens $\frac{3}{4}$ Stunde im Dampf zu halten.

Als reduzierendes Zusatzmittel zur Bouillon haben sich Rinderleberstückchen jedoch weniger günstig erwiesen. Rinderleber hat die Eigenschaft, beim Sterilisieren krümelig zu zerfallen und etwas schmierig zu werden, so daß sie beim Einführen in die Reagenzgläser zu leicht breiig zerquetscht wird und die nachzufüllende Flüssigkeit trübt. Für diesen Zweck, als Zusatzmittel zur Bouillon, eignet sich in besonderem Maße Pferdeleber, die beim Sterilisieren ziemlich hart wird und sich infolgedessen leicht einführen läßt, so daß die nachzufüllende Bouillon bei einigermaßen vorsichtiger Überschichtung ganz klar bleibt.

Der v. Hiblersche Hirnbrei hält in seiner Brauchbarkeit für das Wachstum der Anaerobier der Tarozzischen Organbouillon etwa die Wage. Sein Vorzug ist, daß er eventuelle Alkalibildung erkennen läßt, und hier liegt sein eigentliches Anwendungsgebiet. Aber dem Hirnbrei fehlt der Vorteil des flüssigen durchsichtigen Nährsubstrates, ohne daß er diesen Nachteil durch die Vorzüge der festen Nährböden aufwäge. So wird ihm die obige Kombination überlegen; ich darf diese wohl als das bis jetzt zur Züchtung von Anaerobiern ohne Luftabschluß geeignetste Verfahren bezeichnen.

Die Buchnerröhre.

Die Buchnerröhre, die bisher bei der Verwendung flüssiger Nährmittel die Technik der Anaerobierzüchtung beherrschte, ist durch die neue Methode nicht ganz aus ihrer Stellung verdrängt worden; ihr Anwendungsgebiet hat sich nur etwas beschränkt. Sie wird uns auch fernerhin unentbehrlich bleiben bei der Verwendung von Serumbouillon; denn Blutserum — stamme es von welchem Tier es wolle — wird man gewöhnlich nicht in größeren Mengen, wie sie die hohe Schicht erfordert, verbrauchen wollen. Bei ausgedehnteren Arbeiten mit Anaerobiern kommen ferner die weiten Röhren und die großen Gummistopfen teuer. Wir haben uns in einer Zeit größeren Bedarfs so geholfen, daß wir die Kulturen in kleinen Röhren von 100×8 mm

anlegten und als äußeres ein gewöhnliches Reagenzglas von 160×16 mm benutzten, wodurch eine wesentliche Ersparnis ohne irgendwelche Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse erzielt wurde. Kulturen in Serumbouillon und alle Weiterzuchtungen über Pyrogallol wurden in der Folge ausschließlich in diesen modifizierten Buchnerröhrchen angelegt.

Die Methylenblauprobe.

Der Vollständigkeit halber habe ich für die besprochenen Reduktionsmittel die Methylenblauprobe angeschlossen außer bei Tierkohle und Natriumsulfit. Bei allen bedurfte es zur Entfärbung eines längeren Kochens von fünf bis fünfzig Minuten. Zwischen diesen Zeiten lagen die verwendeten Zusätze in der Reihenfolge: Leber, Eisen, Kartoffel, Koks, Steinkohle, Holzkohle; doch hatten die drei Kohlearten selbst bei fünfzig Minuten langem Kochen noch einen blaugrünlischen Schimmer behalten.

Die blaue Farbe kehrte außer bei der Leber sehr rasch zurück, so daß die Flüssigkeiten schon nach $\frac{3}{4}$ Stunde wieder ganz blau waren, während die modifizierte Tarrozzische Bouillon noch am anderen Tage hell moosgrün schimmerte. Mit der Zeit nahm aber auch diese die Farbe wieder mehr an, doch hielt sie sich immer in einem mittleren Grün.

Noch kräftiger als die Reduktionswirkung dieser Leberbouillon ist die des Hirnbreis; trotzdem habe ich mit ihm bei Züchtungsversuchen keine besseren Resultate erhalten.

In der Praxis braucht man namentlich für Tarrozzische Bouillon das Methylenblau nicht als Indikator anzuwenden, um zu erkennen, ob und wann das Substrat zur Impfung geeignet ist; denn es ist nicht nötig, als Kriterium völlige Farblosigkeit der ganzen Schicht zu verlangen. Um diese Forderung zu erfüllen, kochen manche Untersucher ihre Nährmittel vor Gebrauch bis $\frac{1}{2}$ Stunde lang aus. Ich habe das bei meiner Bouillon mit Leberstückchen nie getan, sondern sie jederzeit so verwendet, wie ich sie aus dem Schranke nahm; selbst in wochenalten Nährmitteln habe ich trotzdem stets, bis zum nächsten Tage Wachstum bekommen.

Setzte ich einer solchen drei Wochen alten Bouillon zwei Tropfen alkoholische Methylenblaulösung 5 : 100 zu, dann nahm

sie eine satt-grasgrüne Farbe an. Obwohl sie also nicht sauerstofffrei war, zeigte doch nach 24 Stunden der *Bac. tetani* beginnende, *Bac. putrificus* lebhaftere Entwicklung. Bei letzterem reichte die das Wachstum anzeigende Trübung bereits bis an die Oberfläche der Bouillon, obwohl sie in ihren oberen Schichten noch grüne Färbung zeigte; diese verschwand erst am vierten Tage.

Schließlich möchte ich noch die auffallende Beobachtung erwähnen, daß sich Anaerobier in gewöhnlicher Bouillon ohne jedwede Zusätze oder Kautelen entwickelten. Eine solche Erscheinung erwähnt nur Pringsheim und zwar für den *Bac. putrificus* in steriler Aufschwemmung von Gliadin aus Weizen und Albumin in Nährsalzlösung, sowie für sein *Clostridium americanum* in Winogradskyscher Nährlösung. Burri und Kürsteiner stellten bei rein aerobiotisch gehaltenen Kulturen des *Bac. putrificus* und *Paraplectrum foetidum* in 2%iger Dextrosebouillon und entzuckerter 3%iger Peptonbouillon in hoher, 10 ccm fassender Schicht nie Wachstum fest, sondern nur, wenn diese nach der Impfung mehrere, mindestens aber sechs Stunden vor Luftzutritt geschützt gewesen war.

In mehreren Tarozziröhrchen, die ich mit isolierten Kolonien von *Bac. putrificus* Bienstock geimpft hatte, hatte sich eine derbe, bis an die Oberfläche der Flüssigkeit aufsteigende Haut gebildet. Obwohl ich von isolierten Kolonien ausgegangen war, fürchtete ich doch eine Verunreinigung durch Aerobier und impfte aus sämtlichen Röhrchen in gewöhnliche Bouillon über. Fast alle Proben blieben steril; nur eine, bei der die Schicht zufällig etwas höher war (8 statt 6 ccm wie gewöhnlich), und in die ein gut pfenniggroßes Stück einer solchen Haut hineingebracht worden war, zeigte Trübung und Gärung und mikroskopisch *Bac. putrificus* in Reinkultur. Eine davon gemachte Weiterimpfung in gewöhnliche Bouillon blieb ohne Entwicklung, es hatte also keine Verunreinigung durch Aerobier vorgelegen. Da von kleineren Stückchen jener Haut in anderen Röhrchen kein Wachstum ausgegangen war, läßt sich schließen, daß die massenhaft eingebrachten *Putrificus*bazillen die erforderliche Reduktionswirkung für eine neue Generation herbeigeführt haben.

B. Die Züchtung in festen Substraten.

Kritik bisheriger Verfahren.

Die, wenn auch vorläufig noch empirische Erkenntnis von dem Sauerstoffbindungsvermögen animalischer und vegetabilischer Gewebe hat zwar die Züchtung der Anaerobier in flüssigen Medien bequemer gemacht, aber die Versuche, die Züchtung in festen Nährböden in ähnlich einfacher Weise zu gestalten, sind bisher weniger erfolgreich gewesen. Für sie ist die Zahl der Methoden und ihrer Modifikationen noch sehr groß, und die immer erneuten Vorschläge zur Vereinfachung beweisen, daß eine einfache Methode noch nicht gefunden ist.

Das älteste Verfahren, die Züchtung in hoher Schicht, von W. und R. Hesse und dann von Liborius begründet, hat sich bis heute erhalten, nicht bloß zur Züchtung von Reinkulturen, sondern auch zur Trennung von Keimen aus Gemischen, zu der sie namentlich Veillon und Zuber sowie v. Hibler gebrauchen. Zur Überschichtung eignet sich nach Ghon und Sachs am besten Agar, auch für Gelatine und Bouillon.

Die Erfolge mit diesem Verfahren waren zufriedenstellend. Nur die Abimpfung hat ihre Mißlichkeiten, auch die mit Kapillarröhrchen; denn es ist nicht ganz leicht, die nachgiebige Kapillare durch die Agarsäule hindurch auf eine bestimmte Kolonie zu dirigieren, zum mindesten bedarf es einer größeren Übung. Ich blieb bei dem alten Verfahren, bei dem man den Agar aus dem zerbrochenen Reagenzglase in eine sterile Petrischale gleiten läßt. Doch darf ein ihm anhaftender Nachteil nicht unerwähnt bleiben: unter der Agarsäule hat sich oft eine bakterienhaltige Flüssigkeit angesammelt, die bei der Abimpfung von einzelnen Kolonien leicht eine Quelle der Verunreinigung bildet.

Für die Trennung der Keime mittels des Schälchenverfahrens sind viele Apparate teils für einzelne, teils für eine größere Anzahl von Schalen angegeben worden; am häufigsten wird jetzt wohl die Botkinsche Glocke, allenfalls in ihrer von Maassen abgeänderten Form angewendet. Eine Aufzählung und Beschreibung aller jemals angegebenen Apparate glaube ich übergehen zu können und verweise im allgemeinen auf das Lehrbuch von Heim.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden benutzt: der Apparat von Lange, der von Maassen, die hohe Schicht und endlich die Glimmerplattenmethode. In dem Langeapparat gelang es nicht, Kolonienbildung zu erzielen; die Pyrogalllösung wurde unter der Glocke binnen 24 Stunden tiefschwarzbraun, obwohl bei der Alkalisierung der Lösung besonders vorsichtig zu Werke gegangen worden war. Der Fettwachsverschluß war wohl nicht absolut luftdicht.

Hingegen glückte mir die Züchtung im Maassenschen Apparat, jedoch erst, nachdem die Glasglocke nicht bloß durch Paraffinum liquidum, sondern nach dem Vorgang von Schattentfroh und Graßberger auch noch durch Unterschichtung mit Pyrogalllösung abgedichtet worden war, die nach beendeter Wasserstoffdurchleitung durch Einfließenlassen von Kalilauge alkalisch gemacht wurde.

Wie wenig das Paraffinöl allein den Anforderungen eines exakten Luftabschlusses genügt, erkennt man hierbei recht deutlich: von Tag zu Tag wird die alkalische Pyrogalllösung in der äußeren Wanne dunkler, schließlich fast schwarz, während die gleiche Lösung im Innern des Apparates noch nach 12 Tagen ein helles Braun zeigt.

Die Pyrogalllösung im Innern des Zylinders wurde ebenfalls erst nach beendeter Wasserstoffdurchleitung alkalisiert. Dazu war ein kleines Reagenzglaschen, etwas kleiner als der Schalendurchmesser, mit Kalium causticum fuscum gefüllt und so mit dem offenen Ende auf den Rand der Schale gelegt worden, daß es bei einem leichten Anstoß in sie fallen mußte.

Ghon und Sachs verwendeten elektrolytisch gewonnenen käuflichen Wasserstoff, den sie durch ein Verbrennungsrohr über eine Kupferspirale leiteten. Der Einfachheit und Billigkeit halber benutzte ich den Kippischen Apparat. Der aus reinem Zink und verdünnter Salzsäure gewonnene Wasserstoff wurde durch drei Waschflaschen geleitet, die mit 10%igem Bleinitrat, 10%igem Silbernitrat und 2%iger Pyrogalllösung gefüllt waren. Letztere wurde, nachdem das Gas etwa fünf Minuten durchgegangen war, alkalisch gemacht und danach erst der Maassensche Apparat angeschlossen. Die Schale im Innern enthielt 50 ccm 10%iger Pyrogalllösung, dazu etwa 5 g Kalium hydricum, die äußere Wanne Paraffinum liquidum, darunter 150 ccm einer

7 $\frac{1}{2}$ %igen Pyrogalllösung, der schließlich 25 cem 10%iger KOH-Lösung zugesetzt wurden. Anstatt der von Schattenfroh und Graßberger angegebenen sieben Waschvorrichtungen haben sich die genannten drei Lösungen als genügend erwiesen.

Der Wasserstoff soll $\frac{3}{4}$ Stunde lang möglichst kräftig strömen; deshalb waren auf die Ein- und Ausführungsröhren gut gefirnißte Gummischläuche gesetzt worden (ohne irgendwelche Glaskapillaren); diese wurden danach mit Glasstäben verschlossen, abermals gefirnißt und unter die Flüssigkeit in der Wanne getaucht.

Auf diese Weise habe ich unter anderem von *Bac. putrificus* innerhalb 12 Tagen eine Kolonie von 13 mm, innerhalb 20 Tagen eine Kolonie von 19 mm Durchmesser bekommen (Fig. 1).

Die für Schälchenkulturen bestimmten großen Apparate sind aber in der Anschaffung und im Gebrauch nicht billig. Bei dem Maassenschen Apparat braucht man an Pyrogallol jedesmal 10 g für die äußere Wanne, 5 g in der Glocke und 2 g für die Waschflasche, zusammen 17 g, also für 25 Pfg. (1 Kilo zu 14.50 Mk. gerechnet). Die Gummischläuche werden von der in der Wanne befindlichen Kalilauge so mitgenommen, daß sie in der Regel nicht mehr zu verwenden sind; man braucht etwa 30 cm, d. i. für 21 Pfg. Einschließlich Abnützung kann man die einmalige Ansetzung auf 50 Pfg. berechnen, was jedenfalls zu teuer ist, wenn man nur eine oder zwei Schalen einstellen will.

Bei dem Langeschen Verfahren sollen 25 g Pyrogallol, also um etwa 37 Pfg. genommen werden; dabei kann man durch Zwischenlegen von Glasstäben höchstens drei Petrischalen übereinander unterbringen, dann läßt sich aber in den beiden unteren Schalen der Entwicklungsvorgang von außen nicht verfolgen.

Das Verfahren von Lentz ist erst bei Abschluß dieser Untersuchungen erschienen und konnte deshalb nicht mehr geprüft werden.

Das Glimmerverfahren, seine Entstehung und weitere Ausgestaltung. Methylenblauprobe.

Die Mißstände, die den großen Apparaten insofern anhaften, als sie zu einem bequemen Arbeiten nicht handlich genug sind und verhältnismäßig viel Zeit, Kosten und Platz beanspruchen,

sind die Ursache vieler Variationen des Plattenverfahrens gewesen. Kürsteiner stellt kleine Glaströge in Wright-Burrische Röhren. Alle anderen Untersucher dagegen, so schon Kamen u. a., neuerdings erst wieder Zinsser, konstruierten modifizierte Petrischalen. Die Abdichtung erfolgte fast bei allen mit Fetten und Ölen.

Wer aber diese Mittel längere Zeit gebraucht hat, weiß, wie unangenehm das Arbeiten mit ihnen ist, und daß eine handlichere Technik des Plattenverfahrens sehr am Platze wäre. Für eine solche diente die Glimmerscheibe, wie sie R. Koch zum Nachweis des Sauerstoffbedürfnisses der Choleravibrionen zuerst benutzt hat, als Vorbild.

Schon Liborius hat sie für die Züchtung der Anaerobier verwenden wollen, aber keinen Erfolg erzielt. Auch Veillon und Zuber zollen ihr keinen Beifall; sie sagen: „l'anaérobiose ainsi obtenue est tout à fait insuffisante“. Da die kleinen Scheiben wegen der leichten Diffusion des Sauerstoffes in die darunter befindliche Nährbodenschicht nicht ausreichten, nahm Sanfelice größere und zwar aus Glas, brachte die Nährbodenschicht zwischen zwei Glasplatten der üblichen Größe und schloß die Ränder mit Gelatine, die mit einem Antiseptikum versetzt war, ab. In ähnlicher Weise verfuhr Trenkman mit zwei Uhrschälchen. Neuerdings hat Liefmann wieder auf das Glimmerverfahren zurückgegriffen und empfohlen, die Scheiben so groß zu nehmen, daß ringsherum am Rande $\frac{1}{2}$ cm des Nährbodens unbedeckt bleibt. Fehrs und Sachs-Mücke haben den Nährboden entweder zwischen die Glasschicht eines ineinander gestellten Schalenpaares gebracht oder ihn in eine große Drigalskischale gegossen, geimpft und vor oder nach der Erstarrung eine 9×12 Platte daraufgelegt; sie gaben den Glasplatten wegen ihrer Billigkeit und größeren Ausdehnung den Vorzug.

Was zunächst den letzteren Punkt betrifft, so spielt unseres Erachtens der etwas höhere Preis der Glimmerplatten keine ausschlaggebende Rolle, zumal da es, wenigstens bei dem zu beschreibenden modifizierten Verfahren, nicht darauf ankommt, eine größere Nährbodenfläche zu haben, als sie die gewöhnlichen Kulturschalen von 90 mm Durchmesser bieten.

Aus einer Glimmerscheibe üblicher Dicke, die bei einer Größe von etwa 90 mm im Quadrat je nach der Reinheit des Glimmers 25—35 Pfg. kostet, kann man mit einem gut passenden Skalpell 3—4 Blätter spalten. Der geringe Preisunterschied wird außerdem dadurch noch zum großen Teil ausgeglichen, daß man in Petrischalen wesentlich weniger Nährboden braucht.

Liefmann hat vorgeschrieben, die Glimmerscheibe auf den erstarrten Nährboden aufzulegen und allenfalls entstehende Luftblasen durch Ausdrücken zu entfernen. Man vermeidet sie aber viel sicherer, wenn man die Glimmerscheibe auf den noch flüssigen Nährboden auflegt. Daß damit ein besserer Erfolg erzielt wird, habe ich sowohl mittels der Methylenblauprobe nachgewiesen als auch aus der Entwicklung der Kolonien gesehen.

Der mit Methylenblau versetzte Agar war nach dem Auflegen der Glimmerscheibe auf bereits erstarrten Agar von Anfang an blau. Ein Zusatz von Reduktionsmitteln konnte das sofortige Eintreten der Blaufärbung nicht hintanhaltend, sondern schwächte höchstens die sonst intensiv blaue Farbe etwas ab. Legt man aber den Glimmer auf das noch flüssige Substrat, dann bleibt auch bei gewöhnlichem Agar der unter dem Glimmer liegende Teil vorerst farblos; erst allmählich beginnt vom Rande her die blaue Farbe zurückzukehren, doch dauert es mindestens fünf Tage, bis sie den Mittelpunkt erreicht hat.

Die weitere vergleichende Untersuchung wurde unter Verwendung des Bac. tetani geführt. Den Ausgang bildete eine Leberbouillonkultur mit Leberstückchen. Davon wurde eine 2 mm-Öse in gewöhnliche Bouillon geimpft und aus dieser mit zwei Ösen die zweite und mit weiteren vier Ösen die dritte Verdünnung angelegt, und zwar diese beiden Verdünnungen in dreierlei Nährböden, nämlich in gewöhnlichem, Traubenzucker- und Leberbouillonagar. Mehrere Platten blieben steril, in den übrigen gingen eine, höchstens zwei Kolonien auf. Anaerobier versagen bekanntlich bei solchen Züchtungen leichter als Aerobier, aber die nachfolgende Tabelle zeigt sowohl nach Häufigkeit des Angehens als auch hinsichtlich der Größe der gewachsenen Kolonien, daß es besser ist, den Glimmer auf den noch flüssigen Nährboden aufzulegen.

A. Auflegen auf den erstarrten Agar.

Zweite Verdünnung:

Es ging nur in gewöhnlichem Agar etwas an und nur eine Kolonie; sie war nach

1	2	3	12 Tagen
0,665	1,0	1,3	1,73 mm groß.

Dritte Verdünnung:

In keinem der drei Nährböden Wachstum.

B. Auflegen auf den flüssigen Agar.

Zweite Verdünnung:

	Kol. nach	1	2	3	12 Tagen
Gewöhnlicher Agar	1	0,53	1,46	1,73	2,13 mm groß
Traubenzuckeragar	1	0,2	1,0	1,73	1,86 " "
Leberbouillonagar	2	0,53	1,2	1,5	1,6 " "
		0,8	1,4	1,6	1,7 " "

Dritte Verdünnung:

Von den drei Nährböden Wachstum nur in

Leberbouillonagar	1	0,8	1,33	1,46	1,6 " "
-------------------	---	-----	------	------	---------

Anfänglich wurde ganz ähnlich vorgegangen wie beim Liefmannschen Verfahren, nur mit dem Unterschied, daß die Glimmerscheibe den genannten Erfahrungen zufolge auf den noch nicht fest gewordenen Nährboden aufgelegt wurde. Dabei ergab sich aber der Nachteil, daß eine Anzahl von den im Nährmittel gleichmäßig verteilten Keimen, nämlich die mehr nach der Peripherie zu gelegenen, mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht zum Auskeimen kamen.

Um diesem Nachteil zu begegnen, habe ich über den Glimmer noch eine Agarschicht gegossen. Liefmann hat etwas Ähnliches gemacht, indem er „den Rand ringsherum mit einer kleinen Schicht Agars“ übergießt, und zwar von dem Gesichtspunkt aus, eine etwaige Verbreitung von aerobiotischen Keimen bei Gemischen von Anaerobiern mit Aerobiern hintanzuhalten. Selbstverständlich wird dadurch auch die Luft vom Eindringen unter die Glimmerplatte besser abgehalten und so die Wachstumsbedingung für die Anaerobier verbessert. Da es der Durchsichtigkeit der Kultur nicht schadet, wenn die Agarschicht die ganze Glimmerscheibe bedeckt, gießt man einfach ein zweites Agarröhrchen gleichmäßig über die Fläche aus.

In weiterer Verfolgung dieser Technik bin ich dann dazu gekommen, diese zweite Nährbodenschicht unter die Glimmerscheibe zu verlegen.

Im letzten Jahrzehnt ist man von dem ursprünglichen Verfahren der Kochschen Verdünnungen mehr und mehr zur Verteilung der Keime in einer Ebene mittels Glasspatels oder Platinschlinge übergegangen. Im vorliegenden Fall wird sich die Verteilung durch Ausstreichen schon deshalb mehr empfehlen, weil man dabei die Aussaaten mehr auf die Mitte der Agarfläche konzentrieren kann. Anfänglich habe ich deshalb ähnlich wie bei Typhusuntersuchungen eine Anzahl von 4—8 Petrischalen, die mit frisch ausgekochtem Nähragar (am besten 3%ig) beschickt waren, mit einem ihrem geringeren Durchmesser entsprechenden etwas kleineren Drigalskispatel der Reihe nach bestrichen (man kann dazu auch die Platinschlinge nach E. und A. Kindborg benutzen), dann den Inhalt eines Agarröhrchens darüber gegossen und schließlich die Glimmerplatte auf den noch flüssigen Agar gelegt. Später habe ich von dem Ausgangsmaterial erst eine Verdünnung in Bouillon angelegt und bin bei der Plattenaussaat von dieser ersten Verdünnung ausgegangen, wodurch ich mich auf zwei bis drei Petrischalen beschränken konnte. Den Durchmesser der Glimmerscheibe nahm ich höchstens 3 mm geringer, als der Schalendurchmesser betrug. Der späteren Abimpfung nach Abnahme der Glimmerplatte ist die dünne Agarschicht nicht hinderlich.

Fig. 2 zeigt eine nach diesem Verfahren gewonnene 3 Tage alte Kolonie des *Bac. tetani* in 5,2facher Vergrößerung. Die Kolonie stammt von einer Platte dritter Verdünnung, auf der noch vier weitere Kolonien von gleicher Größe und eine kleinere sich entwickelt hatten. Man sieht deutlich das dichte Zentrum und die von ihm ausgehenden zarten Wucherungen in das umgebende Substrat. Der schwarz umrandete Kreis ist der Rand einer Gasblase, die durch das Photogramm laufenden Streifen sind Kratzer und Fehler im Glimmer. Die Aufnahme erfolgte unter aufliegender Glimmerscheibe, um die Verhältnisse naturgetreu wiederzugeben.

Vorsicht ist nur bei der Züchtung und insonderheit bei der Trennung stark gasbildender Anaerobier aus Gemischen zu empfehlen. Auf den ersten Platten nämlich, auf die bei der

Aussaats natürlich ziemlich viele Keime kommen, wird infolge des Druckes der durch den Glimmer am Entweichen gehinderten Gase reichlich Kondenswasser ausgepreßt, wodurch Keime fortgetragen werden und ein diffuses Wachstum im Substrat eintritt. Öftere Nachschau ist daher unbedingt nötig. Schon nach 16—20 Stunden sind häufig die Kolonien mit bloßem Auge gut sichtbar, und es ist nun wichtig, rechtzeitig abzuimpfen, da wenige Stunden später bereits ein diffuses Wachstum eingetreten sein kann.

Weniger in Erscheinung tritt dieses Fließen der Keime, wenn man den Agargehalt des Nährmaterials auf 3% erhöht. Freilich aufzuhalten ist es auf den dicht besäten Platten auch durch diese Konzentration nicht, aber immerhin wird es durch sie um einige Stunden verzögert.

Sanfelice und Liefmann haben empfohlen, zur Abhaltung von Luftkeimen den Rand der Platten mit etwas Gelatine bzw. Agar, denen ein Antiseptikum zugesetzt ist, zu übergießen. Im allgemeinen ist dies bei meinem Verfahren nicht nötig. Nur wenn aus besonderen Gründen Platten längere Zeit aufgehoben werden sollen oder das Wachstum — etwa wegen Züchtung bei Zimmertemperatur — nur langsam von statten geht, ist diese Vorsichtsmaßregel zweckmäßig. Ich habe dabei einfach über die fertige Kulturplatte eine dritte Agarschicht (6 cm) gegossen, die mit fünf Tropfen einer 5%igen Karbollösung versetzt war. Die Karbolisierung soll vor allen Dingen die Ansiedlung von Schimmelpilzen verhindern, die einem auf lange aufzubewahrenden Platten oft recht lästig werden. Man erreicht dies durch den genannten geringen Zusatz vollkommen, ohne dabei die Kulturen zu schädigen.

Sollte es gelingen, diese Plattenmethode auch für Gelatine verwendbar zu machen, kann man die Übersichtung bei ihnen in derselben Weise vornehmen, da Gelatine — natürlich die gewöhnliche 10%ige Gelatine vorausgesetzt —, der auf 7 cm fünf Tropfen 5%iger Karbollösung zugesetzt sind, ebenso rasch erstarrt wie gewöhnliche Gelatine.

Die Züchtung in Gelatine ist mir mit diesem Plattenverfahren aus bisher nicht bekannten Ursachen noch nicht gelungen. Daß infolge des langsameren Wachstums bei Zimmertemperatur zuviel Sauerstoff unter die Glimmerscheibe diffundiert, kann

vielleicht mit eine Rolle spielen, aber nicht ausschlaggebend sein, da als Kontrolle bei 20° gehaltene Agarplatten nach vier Tagen Entwicklung einiger Kolonien brachten.

Ich muß zugeben, daß bei meinem Plattenverfahren etwas weniger Keime zur Entwicklung kommen als bei der Züchtung in hoher Schicht, aber wesentlich mehr als bei der Gußmethode. Aussaaten in erster Verdünnung, hergestellt durch Übertragung einer 2 mm-Öse von der Ausgangskultur in hohe Schicht oder auf meine Platten, können bei den hier wie dort massenhaft sich entwickelnden, dicht gedrängt stehenden Kolonien für eine ernsthafte Züchtung und Isolierung nicht in Betracht kommen. Die vergleichenden Untersuchungen wurden unter Verwendung einer Kultur des *Bac. tetani* in zweiten Verdünnungen geführt, indem die erste Verdünnung durch Übertragung einer 2 mm-Öse aus der Ausgangskultur in Bouillon angelegt und von dieser erst zwei 2 mm-Ösen in die hohe Schicht bzw. auf die Platten übertragen wurden. Dabei zeigte sich, daß sich gegossene Platten: gestrichenen Platten: hoher Schicht = 1 : 8 : 12 verhalten. Steht also die Methode der gestrichenen Platten unter Glimmer der Züchtung in hoher Schicht auch hinsichtlich der zu Kolonien entwickelten Keime etwas nach, so wird dieser Umstand doch reichlich durch die bequeme Abimpfung aufgewogen. Dabei ist natürlich, da auch bei den gestrichenen Platten anscheinend nicht alle Keime zur Entwicklung kommen, zu bedenken, daß, wenn die Abimpfung durch Ausstechen ganzer Kolonien erfolgt, in der Nähe dieser Kolonie ein nicht entwickelter Keim liegen kann, der, mit in das flüssige Substrat gebracht, die Ursache für eine unreine Kultur wäre, so daß sich eine Wiederholung der Aussaat nötig machen würde.

Reduktionsmittel.

In Betreff des Wertes und der Wirkung von Reduktionsmitteln, soweit sie in meine Untersuchungen einbezogen worden sind, kann ich im allgemeinen auf den dritten Abschnitt dieser Arbeit (S. 213 ff.) verweisen.

So ausschlaggebend sie in flüssigen Medien für die Züchtung ohne Luftabschluß sind, spielen sie bei den festen Nährböden eine mehr sekundäre Rolle. Bei diesen ist nach wie vor die Beseitigung oder Abhaltung der Luft das Wesentliche. Des-

wegen darf aber der Vorteil, der durch den Zusatz reduzierender Mittel in der Bindung gewisser Sauerstoffmengen liegt, nicht verkannt werden.

Zunächst setzte ich meinen Nährböden 0,5% Traubenzucker zu. Schädigungen der Bakterien, wie sie von manchen Autoren angegeben werden, konnte ich bei dieser Konzentration nicht finden. Nachdem ich mich aber von der verhältnismäßig großen Reduktionswirkung des Leberextraktes überzeugt hatte, verwendete ich für meine festen Nährböden lediglich Leberabkochungen. So zubereitete Substrate reduzieren wesentlich stärker als gewöhnliche mit 0,5% Traubenzuckerzusatz, ohne daß eine Schädigung des Bakterienwachstums nachweisbar wäre.

Zweiter Teil.

Untersuchungen über *Bac. putrificus*, *Bac. postumus* und *Bac. botulinus*.

Im nachfolgenden sollen die Bazillen näher beschrieben werden, mit denen ich meine Untersuchungen geführt habe. Es waren *Bac. putrificus* und *Bac. postumus*, die beide wegen ihrer Beziehung zur Fäulnis das Interesse erweckten.

Der *Bac. postumus* wurde von Herrn Professor Heim gelegentlich seiner Studien über die Fermentierung der Gewebe durch Anaerobier gefunden, die überhaupt den Anlaß zu den Untersuchungen über die anaerobiotische Züchtung gegeben haben. Herr Professor Heim hatte bei der Untersuchung seiner Faulgemische bemerkt, daß einige Tage nach dem Einsetzen der Fäulnis, bei der immer *putrificus*artige Stäbchen beobachtet wurden, andere Stäbchen von borstenförmigem Aussehen kamen, die sich den Reinzüchtungsversuchen hartnäckig widersetzen. Er übergab mir das Fäulnisgemisch mit dem Bemerken, daß hier nachgesehen werden solle, ob vielleicht einer der borstenförmigen Bazillen in Reinkultur erhalten werden könne, wenn man ihm bereits abgebautes Nährmaterial gäbe, und sprach die Vermutung aus, daß, wenn es einmal gelungen sei, ihn auf diese Weise rein zu bekommen, er dann vielleicht auf gewöhnlichen Nährmitteln zu züchten sein würde. Beides hat sich, wie bei der Beschreibung des *Bac. postumus* dargelegt werden wird, be-

stätigt. Der Name wurde gewählt, weil er nachträglich auftrat, wenn das Eiweiß bereits bis zu einem gewissen Grade abgebaut und die erste Flora zur Sporenbildung gekommen war, während ihre Vegetationsformen in den Hintergrund getreten waren.

Außerdem wurde der *Bac. botulinus* in den Bereich unserer Untersuchungen gezogen, weil der im Institut vorhandene Stamm dem *Bac. putrificus* ähnlich, wenn nicht gleich erschien, wobei sich herausstellte, daß die von Král bezogene Kultur nicht der *Bac. botulinus* war.

I. Bacillus putrificus.

Im Jahre 1884 wurde von Bienstock gelegentlich der Untersuchung menschlicher Fäzes ein sporulierendes Stäbchen gefunden, das, wie er damals schon, namentlich aber in späteren Arbeiten feststellte, eine weitgehende Zersetzung des Eiweißes herbeiführt, und das er infolgedessen *Bac. putrificus* nannte.

So großes Interesse dieser Bazillus verdient, scheint er doch noch nicht sonderlich bekannt zu sein und manche Unklarheit über ihn zu bestehen. Außer der Bienstockschen Beschreibung sind nur noch zwei kurze Schilderungen von Tissier und Martelly sowie von Rodella erschienen, die aber weder konform noch in allen Punkten zutreffend sind. In die Lehrbücher ist er so gut wie gar nicht eingedrungen. Wo er aber in ihnen Aufnahme gefunden hat (Eisele, Matzschita, Migula, Schröter), stimmen die Beschreibungen zwar sehr genau überein, entsprechen aber leider den tatsächlichen Verhältnissen so wenig, daß man glauben möchte, es handle sich um verschiedene Bazillen, wenn nicht der Name Bienstocks dazu gesetzt wäre. Sie bezeichnen auch den *Bac. putrificus* als Bazillus 3 Bienstock. Nach Bienstocks Arbeiten kann es sich aber nur um seinen Bazillus 4 (wie er ihn in früheren Untersuchungen registriert hat) handeln, den er als den spezifischen Spaltpilz der Eiweißfäulnis bezeichnet. Der mikrokokkenähnliche Bazillus 3 aber veränderte nach Bienstock chemische Stoffe gar nicht und ist, wie er ausdrücklich hervorhebt, für weiße Mäuse und Kaninchen pathogen, während er bei den genannten Autoren als nicht tierpathogen geführt wird.

Dieser Unsicherheit in der Kenntnis eines Organismus, der für den Abbau von Eiweiß und anderen Stoffen eine so wesent-

liche Rolle spielt, soll die folgende Darstellung abzuhelpfen versuchen.

Der *Bacillus putrificus* ist ein kräftiges, mittellanges Stäbchen mit abgerundeten Enden. Die einzelnen Stäbchen reihen sich öfter in kurzen Verbänden aneinander; es kommt aber auch vor, daß sich in flüssigen Substraten Ketten von außerordentlicher Länge bilden. Diese treten meistens in Massen auf, und gleichzeitig beobachtet man dann hautartige Gebilde von oft solcher Ausdehnung, daß sie die ganze Flüssigkeit bis an die Oberfläche durchziehen. Die Bedingungen, unter denen diese Häute sich bilden, konnte ich nicht feststellen; möglicherweise hängen sie mit der Sauerstoffspannung im Substrat zusammen.

Betrachtet man eine solche Haut, deren Konsistenz ziemlich derb ist, unter dem Mikroskop, so stellt sie sich als eine Schleimmasse dar, in die die Bakterien teils allein liegend, teils in einem unentwirrbaren Kettengeflecht eingelagert sind (Fig. 3).

Nicht selten wächst ein Stäbchen zu einem langen, mehr oder weniger gebogenen und gewundenen Faden aus, der fast das ganze Gesichtsfeld einnimmt.

Mit den gewöhnlichen Anilinfarben ist der Bazillus gut färbbar. Die Färbung nach Gram ist intensiv, d. h. sie hält auch reichlicherer Alkoholeinwirkung stand. Körnelung oder teilweise Entfärbung des Bakterienleibes habe ich nicht wahrgenommen. Erst bei vorgerückter Sporenbildung tritt allmählich die Entfärbung des vegetativen Teiles ein.

Die Sporenbildung beginnt auf den gewöhnlichen Nährmitteln sowie in Leberbouillon, -agar etc. frühzeitig; schon am zweiten Tage sind reichlich sporulierende Individuen vorhanden und zwar erfolgt die Versporung sowohl in den einzeln liegenden Bakterien wie in den verschiedenen Gliedern größerer oder kleinerer Ketten. Die Form des sporentragenden *Bacillus putrificus* wird in der Literatur durchweg als Trommelschlegelform geschildert. So nennen Tissier und Martelly die Sporen „appendues à l'extrémité de bâtonnet, ce qui lui donne un peu l'aspect du bacille de Nicolaier“. Auch Rodella spricht noch von „tetanusähnlicher“ Gestalt. Eine solche habe ich nie beobachten können; sie war vielmehr stets tennischlägerartig.

Was den Unterschied zwischen Trommelschlegel- und Tennischlägerformen betrifft, so ist dieser hauptsächlich durch die

Gestalt der Sporen bedingt. Beim Tetanusbazillus sieht man vorwiegend runde, beim *Bac. putrificus* meistens ovale oder elliptische Sporen. Beidemale sitzen sie am Ende des Stäbchens, d. h. die Sporen sind „endständig“. Es genügt aber nicht, von endständiger Sporenbildung allein zu sprechen, weil die Sporen bei den verschiedenen Bakterienarten dem ganzen Stäbchen im mikroskopischen Gesamtbilde eine charakteristische Gestalt zu geben pflegen.

Bei der endständigen Sporenbildung kann man drei Typen unterscheiden, einen Typus ohne Aufbauchung, einen mit kugelige Auftreibung und einen mit elliptischer Vorwölbung des Endes des Stäbchens. Eine Versporung ohne stärkere Formveränderung des Bakterienendes, also ohne deutliche Aufbauchung am Pole, findet sich z. B. unter Umständen bei v. Hilters Art 15. Für die kugelige Auftreibung ist das beste Beispiel der Tetanusbazillus (Fig. 4). Die elliptische Vorwölbung, die dem Stäbchen die Form eines Tennisschlägers verleiht, ist die hauptsächlichste Erscheinung beim *Bac. putrificus* (Fig. 5). Es kommt gelegentlich auch vor, daß die Sporen vom Ende ab mehr nach der Mitte zu gerückt sind, dann nähert sich das Aussehen des Bazillus der sogenannten *Klostridium*form.

Schon vor Ablauf des zweiten Tages sieht man in der einen Hälfte vieler Individuen, entweder mehr nach dem Ende oder mehr nach der Mitte zu, eine starke Aufbauchung: die Sporenanlage. Ihre Lichtbrechung ist zunächst noch ähnlich dem vegetativen Teil des Bazillus, nimmt aber bald zu, und nach zwei Tagen ist sie in ihrem Innern stark lichtbrechend geworden. Im gefärbten Präparat sieht man an ihren Längsseiten noch deutlich einen den vegetativen Teil andeutenden Saum entlang ziehen, und polwärts sitzt auf ihr wie ein Hut ein Stück des Bakterienleibes. Das Freiwerden der Spore währt je nach dem Nährmittel verschieden lange Zeit. Die Membran der freien Spore entfärbt sich nach Gram.

Jedes Stäbchen bildet nur eine ovale Spore. Die verschiedentlich erwähnte Beobachtung, daß beiderseits in den Endstücken sich eine Spore bilde, wird mitunter und zwar vermutlich deshalb falsch gedeutet, weil sich zwei Stäbchen mit dem einen Ende so nahe aneinander legen, daß selbst mit starken Ver-

größerungen kein Zwischenraum zwischen ihnen erkennbar ist, während in den entgegengesetzten Enden die Sporen sich bilden. Es entsteht so eine Art Hantelform.

Umgekehrt hat man auch ab und zu einmal ein Bild, als ob die Spore mittelständig gebildet würde. Man wird aber dabei stets beobachten, daß das betreffende Stäbchen größer ist als die herumliegenden, und wird sich diese Erscheinung so zu erklären haben, daß zwei Stäbchen mit ihren Sporen gegeneinander stoßen und diese bei der Fixierung mehr oder weniger übereinander zu liegen kamen.

Über die Widerstandsfähigkeit der Sporen liegen nur zwei Untersuchungen vor: nach Bienstock wachsen die Sporen nach drei Minuten langem Sieden noch gut aus, nach fünf Minuten langem Kochen konnte er kein Wachstum mehr erhalten; nach Tissier und Martelly vertragen sie ein Sieden von ein bis zwei Minuten.

Zu wesentlich abweichenden Ergebnissen führten meine Versuche, die ich wiederholt über die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Einwirkung von Hitze angestellt habe. Leider vermisste ich bei beiden Autoren eine Angabe, ob die Erhitzung im siedenden Wasserbade, im Dampftopf oder im Hamburger Apparat erfolgte, und ob die zu prüfenden Röhrchen ins Wasserbad, bzw. in den Dampftopf gleichzeitig mit dem Anheizen oder erst nach erreichter Siedetemperatur eingestellt wurden. Auf möglichste Genauigkeit kann nur die Erhitzung des an Seidenfäden getrockneten Materials im Hamburger Apparat Anspruch machen. Bei beiden anderen Prüfungsarten sind Ungenauigkeiten unvermeidlich: stellt man die Röhrchen mit dem Anheizen ins siedende Wasserbad oder in den Dampftopf ein, so ist, zumal bei unseren Dampftöpfen, das Eintreten der Siedetemperatur nicht genau auf die Sekunde zu bestimmen. Stellt man aber die Röhrchen erst nach erreichter Siedetemperatur ein, so bedarf es zur gleichmäßigen Durchwärmung des Reagensglasinhaltes einer gewissen Zeit, die wiederum je nach der Beschaffenheit desselben — ob flüssig, breiig etc. — verschieden sein kann; im Dampftopf tritt durch Abheben des Deckels eine zu große Temperaturschwankung ein: alles Punkte, die unbedingt vermieden werden müssen, wenn die Art der Erhitzung eine einheitliche sein und ihre Dauer genau auf die Minute und Bruch-

teile einer solchen abgestimmt werden soll. Das Hauptgewicht für vergleichende Untersuchungen muß also auf die Prüfung im Hamburger Apparat gelegt werden.

Von dieser Unzulänglichkeit des siedenden Wasserbades und des Dampftopfes für die Erhitzung abgesehen, schwankt die Resistenz der Sporen an sich schon in gewissen Grenzen, und diese Schwankungen müssen um so größer werden, wenn die Untersuchungen nicht auf eine einheitliche Basis gestellt werden. Wenn ich nun trotzdem neben den mit dem Hamburger Apparat erhaltenen Resultaten auch meine Beobachtungen über die Widerstandsfähigkeit der Sporen im siedenden Wasserbad folgen lasse, so sollen diese Zahlen einmal ein Beispiel dafür sein, wie leicht verschiedene, sonst ganz exakt geführte Untersuchungen lediglich deshalb zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen führen können, weil sie auf verschiedenen Grundlagen aufgebaut sind, zweitens geben sie einen Anhaltspunkt für die erforderliche Sterilisation der zur Züchtung verwendeten Nährböden, und drittens mußte ich, da die früheren Untersucher nur von „Kochen“ bzw. „ébullition“ sprechen, annehmen, daß sie die Erhitzung im siedenden Wasserbad vorgenommen haben, so daß ich vergleichshalber die Resistenz der Sporen auch auf diese Weise prüfen mußte.

Das Material war auf schräg erstarrtem Leberbouillonagar gewachsen, der vier Tage über Pyrogallol im Brutschrank und einen Tag unter Luftzutritt bei Zimmertemperatur gestanden hatte. Es wurde an Seidenfäden von Turnerseide Nr. 7 getrocknet und hatte zur Trocknung zwei Tage über Chlorkalzium gelegen.

Dieses Material widerstand dem strömenden Dampf des Hamburger Apparates in der Regel durch 8—10 Minuten, vielfach sogar 12 und mitunter auch 15 Minuten. Diese letztere Zeit wurde nur bei dem Krälschen Stamm erzielt; es mußte aber durch diese $\frac{1}{4}$ stündige Erhitzung die Keimfähigkeit sehr geschädigt worden sein, denn erst nach achttägigem Verweilen im Brutschrank begann die Entwicklung einzusetzen, die auch mit weniger intensiver Gärung verlief.

Bedeutend höhere Zeiten ergaben sich bei den Sterilisierungsversuchen im siedenden Wasserbad. Zur Verwendung kam dasselbe Material, das für den Versuch im Hamburger Apparat

gedient hatte. Die geimpften Röhrcn, die mit Leberbouillon und Leberstückchen gefüllt waren, wurden mit dem Anheizen in das Wasserbad gestellt, und dieses wurde während des Versuches durch Nachgießen kochenden Wassers auf einem gleichmäßigen Stand erhalten. Nach der Entnahme wurden die Röhrcn unter der Wasserleitung sofort abgekühlt. Das Thermometer in einem Kontrollröhrcn zeigte als höchste Temperatur 99,5°. Die Zeit für den Aufenthalt im siedenden Wasserbade wurde vom Eintritt dieser Temperatur an gerechnet. Hier stieg die Zeit, während deren die Sporen unbeschadet ihrer Keimfähigkeit der Siedehitze ausgesetzt werden konnten, in der Regel auf 25—30 Minuten (Wachstum nach 2 Tagen), vereinzelt trat sogar nach 40 Minuten langer Einwirkung in 5—7 Tagen Entwicklung ein. Über diese Zeit hinaus konnte kein Wachstum beobachtet werden.

Die Eigenbewegung ist, besonders in jungen Kulturen, sehr lebhaft. Sie nimmt etwas ab, sowie die Sporenbildung einsetzt, und erfolgt in der Regel mit der Spore voran.

Der lebhaften Eigenbewegung entspricht eine reiche Geißelung. Die Geißeln sind seitenständig, gewunden, ziemlich lang und schlingen sich häufig um den Leib der Bakterie herum (Fig. 6).

Die Kolonienbildung sah ich im Gegensatz zu den meisten bisherigen Beschreibungen in der für viele Anaerobier typischen zerschlissenen Form vor sich gehen. Nur Rodella spricht von „schönen geschlängelten Ausläufern“, und Tissier und Martelly beschreiben die Kolonien als „floconeuse“, deren dichter Kern umkränzt ist „de fines et élégantes arborisations“.

Die Agartiefenkolonie verläuft in ihrem Wachstum wie ein dichtes Wurzelwerk; häufig bildet sich auch erst ein Kern, von dem aber sehr bald nach allen Seiten unzählige anastomosierende Verästelungen ausstrahlen, so daß ein Bild entsteht, das dem des *Bac. botulinus*, *Bac. tetani* und anderer Anaerobier fast aufs Haar gleicht (Fig. 7). Mit fortschreitendem Wachstum nimmt der Kern an Dichte und Größe zu, während sich die Ausläufer, sich immer weiter verzweigend und verästelnd, in den Agar hineinschieben (Fig. 9).

Ebenso verhalten sich die Agaroberflächenkolonien, bei denen die Bildung der Ausläufer noch in weit schönerem Maße zur

Geltung kommt (Fig. 11). Wie die Wurzeln der Nadelhölzer am Boden hinkriechen, so schieben sich mächtige gewundene Strahlen über den Agar, und dort, wo ein dichter Rasen die Oberfläche bedeckt, bilden sich an seiner Peripherie Ausläufer, die mitunter fast an *Penicillium* erinnern.

Der Agarstich ist wenig charakteristisch; um den Stichkanal herum bilden sich Kolonien in dichten Massen, so daß man am ersten Tage etwa an einen über und über mit Blüten besäten Mandelbäumchenzweig erinnert wird. An die Form einer Flötenbürste, mit der *Rodella* das Wachstum im Agarstich vergleicht, erinnerten meine beiden Stämme nicht. Die Agarsäule wird durch die Gasentwicklung meistens zerrissen, mitunter sogar in toto bis an den Wattestopfen emporgetrieben.

Besonders schön ist das Bild des Gelatinestiches (Fig. 10). Mit beginnendem Wachstum, also etwa am zweiten Tage, laufen zunächst entlang dem Stich einige zarte Krausen, von denen aus ringsherum in horizontaler Richtung zahlreiche feine Ausstrahlungen erfolgen, so daß die Kultur wie eine in der Gelatine steckende Gläserbürste aussieht.

Die Gelatine wurde stets verflüssigt, gleichgültig, ob sie frisch oder alt war, selbst eine sechs Monate alte Gelatine schon nach 14 Tagen. Daß das Peptonisierungsvermögen der Bakterien in alter Gelatine weniger energisch ist, wie schon Bienstock beobachtet hat, kann darauf zurückgeführt werden, daß die Gelatine durch die im Laufe der Zeit eintretende Verdunstung eine höhere Konzentration bekommen hat.

Reines erstarrtes Blutserum wird unter Bildung stinkender Gase zu einer grüngelben Flüssigkeit umgewandelt.

Die Wirkung auf Eiweiß in Form von Fibrin und Hühnerei ist energisch. Überschichtet man etwas Fibrin mit 6 ccm Bouillon und sterilisiert es im Autoklaven bei einer halben Atmosphäre Überdruck $\frac{1}{2}$ Stunde lang, so ballen sich die Fibrinfasern zu einem unregelmäßigen Klumpen zusammen, der beim Schütteln als Ganzes in der Flüssigkeit emporsteigt. Impft man nun ein solches Röhrchen mit *Bac. putrificus* und stellt es über Pyrogallol in den Brutschrank, so findet man, wenn man nach acht Tagen die Buchner-Röhre öffnet, die Flüssigkeit getrübt und am Boden einen sehr reichlichen, leicht aufschüttelbaren, weißlichen Bodensatz, in dem man das Fibrin von etwas rotbrauner Farbe

liegen sieht. Schon beim Öffnen der Buchner-Röhre merkt man einen ausgesprochenen Fäulnisgeruch, und man sieht, daß die Menge des Fibrins wesentlich verringert ist. Beim Schütteln erhebt sich nicht mehr wie zuvor ein einziger Klumpen vom Boden, sondern die anfangs zusammengeballte Fibrinmasse ist in viele feine, höchstens 4—5 mm große Fäserchen aufgelöst, die in der Flüssigkeit herumwirbeln, sich aber rasch wieder zu Boden setzen.

Ist im Laufe der ersten acht Tage die Zersetzung sehr schnell verlaufen, will jetzt, nachdem eine gewisse Stufe der Auflösung erreicht ist, die Fäulnis nicht mehr recht vorwärtsgehen. Wenn man von acht zu acht Tagen den Fortgang der Zerstörung verfolgt, ist es auch nach vier und fünf Wochen kaum möglich, eine stärkere Zersetzung festzustellen, als sie schon am Ende der ersten Woche vorhanden war. Die feinen Fibrinfäserchen liegen unverändert am Boden; der *Bac. putrificus* scheint an der Grenze seiner Tätigkeit angelangt zu sein.

Das Weiße von Hühnereiern wurde zunächst in der von Passini angegebenen Form verwendet. Nur bin ich von der Passinischen Vorschrift insofern abgewichen, als meine 8—10 ccm Eiweiß enthaltenden Reagenzgläser nicht im Autoklaven bei 140°, sondern zwei Stunden im strömenden Dampf sterilisiert worden waren. In dieser Form erwies sich der Nährboden, obwohl die Röhrchen über Pyrogallol standen, als ungeeignet. Die Verflüssigung, die nach zwei bis drei Tagen eintreten soll, war trotz einer einmal am dritten Tage vorgenommenen Nachimpfung noch nach 10 Tagen nicht einmal angedeutet; nur an dem Geruch, der aber nicht stark war, war zu erkennen, daß ein gewisses Wachstum eingetreten sein mußte.

Nun wurden kleine Würfel vom Eiweiß hart gesottener Eier, für jedes Röhrchen etwa 1 $\frac{1}{2}$ ccm, mit 6 ccm Leberbouillon überschichtet und mit den beiden Stämmen des *Bac. putrificus* geimpft über Pyrogallol gestellt. Schon nach acht Tagen war fast das ganze Eiweiß verflüssigt, nur ein paar ganz kleine, schmutzig-dunkelgrün verfärbte Klümpchen lagen noch am Boden.

Aber was sich schon bei der Untersuchung über die Einwirkung auf Fibrin gezeigt hatte, trat auch hier in Erscheinung. Die kleinen Klümpchen trotzten aller weiteren Auflösung und

lagen vier Wochen später noch genau so am Boden wie nach acht Tagen.

Bei all diesen Versuchen war dem Bazillus durch Hitze koaguliertes Eiweiß zum Abbau gegeben worden. Nun stand noch die Frage offen, wie er sich gegenüber nativem Eiweiß verhält.

Für diesen Versuch schienen frische Hühnereier am geeignetsten. Sie wurden an der Einstichstelle kräftig mit Äther gewaschen und öfters (mindestens 12—15 mal) abgeflammt, die Schale mit steriler Nadel vorsichtig, damit nicht ein Sprung entstand, durchstoßen, durch die Öffnung die infizierte Platinnadel eingeführt und dann das kleine Loch mit Kollodium und Siegelack verschlossen.

Für jeden zu prüfenden Stamm standen je drei Eier zur Verfügung. Außerdem wurde eine doppelte Kontrolle angelegt, für die gleichfalls je drei Eier vorgesehen waren. Die einen Kontrolleier wurden ohne jeden Eingriff gelassen, während die anderen die gleiche Vor- und Nachbehandlung erfuhren wie die Versuchseier, nur daß sie anstatt mit einer infizierten, mit einer sterilen Platinnadel durchstoßen wurden. Die dem Impfmateriale nach zusammengehörenden Eier wurden, durch Watte gut isoliert, in je eine verdeckte Glasschale gelegt und in den Brutschrank gestellt.

Die ersten Erscheinungen machten sich erst nach acht Tagen bemerkbar. Äußerlich waren die Eier unverändert geblieben, aber beim Öffnen der Glasschalen herrschte in der Kammer, die die mit *Bac. putrificus* Bienstock geimpften Eier enthielt, ein deutlicher Fäulnisgeruch. Einen Tag später trat die gleiche Erscheinung bei den mit dem Krälschen Stamm behandelten Eiern auf.

Nach 14 Tagen wurde die erste Untersuchung und zwar je eines Eies vorgenommen. Dazu wurden die Eier an der zur Öffnung bestimmten Stelle mit einem glühenden Instrument abgeseigt und die Schale so weit aufgebrochen, daß eine 2 mm-Öse bequem eingeführt werden konnte. Mit einer solchen Öse wurde sodann etwas von dem Eiweiß entnommen, auf einer Agarschale abgetupft und mit dem Drigalskispatel verrieben. Zur Prüfung auf aerobiotische Verunreinigungen wurden die Schalen bis zum folgenden Tage in den Brutschrank gestellt.

Aber trotzdem in den Glasschalen ein deutlicher Fäulnisgeruch herrschte, war offenbar nicht in allen Eiern Entwicklung eingetreten, da diese zuerst geprüften Versuchseier beim Öffnen ganz das gewöhnliche Aussehen zeigten und sich kein Geruch bemerkbar machte.

Auf den Plattenausstrichen hatte sich nach 24 Stunden noch nichts entwickelt. Da somit die Anwesenheit von Aerobiern ausgeschlossen werden konnte, wurden nach der im allgemeinen Teil beschriebenen Methode anaerobiotische Bedingungen geschaffen, die aber gleichfalls kein Wachstum brachten.

In Zwischenräumen von je acht Tagen wurden die übrigen Eier untersucht. Nur die Untersuchung der unverletzt gelassenen Kontrolleier konnte nicht weiter geführt werden, da sich in ihnen unter dem Einfluß der Brutschranktemperatur junge Hühnchen entwickelt hatten, die in der Nacht vom 21. zum 22. Tage die Eischale durchstoßen hatten und nun aus dem Ei befreit wurden.

Auch diese Untersuchungen wurden in der angegebenen Weise ausgeführt. Sie ergaben

nach 22 Tagen: Entwicklung nur des *Bac. putrificus* Bienstock; starker Fäulnisgeruch beim Öffnen des Eies; das Eiweiß in eine grünliche, dünne Flüssigkeit, in der schmutzig-gelbe, käsige-schmierige Klumpen schwimmen, das Eigelb in eine schwarzgrüne Masse von zäher Konsistenz umgewandelt.

In den Präparaten sehr wenig Vegetationsformen, fast ausschließlich Sporen.

Aerobiotisch gehaltene Plattenausstriche bleiben steril; Entwicklung nach Herstellung anaerobiotischer Bedingungen. In Präparat und Kultur *Bac. putrificus* in Reinkultur.

Sterilität der beiden anderen geimpften Eier sowie des Kontrolleies.

Nach 30 Tagen war das mit *Bac. putrificus* Bienstock geimpfte Ei steril geblieben und nur in dem mit dem Krälischen Stamm geimpften Ei Wachstum eingetreten. Die Umwandlung des Eiweißes und des Eigelbes entsprach vollkommen den nach 22 Tagen aufgetretenen Erscheinungen, nur schien nach dem ganz außerordentlich starken Geruch die Fäulnis noch intensiver zu sein.

Das Ergebnis der Plattenaussaaten war analog den Befunden der nach 22 Tagen gemachten Aussaaten, also Sterilität des mit *Bac. putrificus* Bienstock geimpften, aber ohne Entwicklung gebliebenen Eies sowie des Kontrolleies; auf dem von dem faulenden Ei angelegten Platten- ausstrich kein Wachstum, solange er unter Luftzutritt gehalten wurde; Entwicklung nach Schaffung anaerobio- tischer Bedingungen.

In den Präparaten und Abimpfungen: *Bac. putrificus* in Reinkultur.

Meine beiden *Putrificus*stämme erwiesen sich aber nicht in allen Eigenschaften gleich oder gleich stark. Sie unterschieden sich ein wenig in der Bildung von Oberflächenkolonien, die bei dem Krälschen Stamme nicht jenes charakteristische Gepräge zeigten; es waren einfach runde, über ihre Umgebung etwas erhabene Häufchen, die allmählich eine gelbliche Farbe an- nahmen, während die Kolonien des Bienstockschen Stammes milchigtrüb waren. Bei ihm fand ich also die Angaben über das homogene Aussehen der Kolonien bestätigt. Auch mit dem Mikroskop vermag man keine deutliche Zeichnung zu erkennen, höchstens nur schwache Spuren einer stricheligen Anlage.

Ferner fällt bei ihm die verzögerte Verflüssigung der Ge- latine auf, die oft zwei Wochen und noch später einsetzt als bei dem Bienstockschen Stamm. Es deckt sich diese Er- scheinung mit der Beobachtung, daß sein Wachstum überhaupt etwas langsamer vor sich geht; auch seine Wirkung auf Fibrin, auf Eiereiweiß und Blutserum äußert sich weniger rasch. Da sich die beiden Stämme aber sonst morphologisch wie physio- logisch vollständig gleichen, wird man nicht, wie ich zuerst vermutete, zwei verschiedene Arten in ihnen sehen, sondern bei dem Krälschen Stamm mit Erscheinungen rechnen müssen, wie sie ja bei lang fortgezüchteten Laboratoriumsstämmen aufzu- treten pflegen.

2. *Bacillus postumus*.

Die heute in den bakteriologischen Lehr- und Nachschlage- büchern zu findende Darstellung des *Bac. putrificus*, die sich etwa mit der Schilderung Bienstocks deckt, habe ich, wie auch die von Bienstock gegebenen Photogramme auf einen

anderen Bazillus viel passender gefunden, der in verschiedenen Faulgemischen des Herrn Professor Heim neben den bekannten Putrificusformen auftrat.

Der Reinzüchtung widersetzte er sich zunächst hartnäckig und war aus einem Gemisch, das durch Erhitzen schon so weit gereinigt war, daß es diesen Bazillus nur noch in Gesellschaft mit *Bac. putrificus* enthielt, weder durch Isolierungsversuche in hoher Schicht noch unter Glimmer zu trennen. Verschiedene Versuche mit dem gewöhnlichen Agar brachten zwar Kolonien des *Bac. putrificus*, nie aber eine Kolonie dieses „Borstenförmigen“. Es hatte den Anschein, als ob frische, d. h. nicht abgebaute Nährböden ihm weniger zusagten. Diese Vermutung wurde gestützt durch die Beobachtung, daß er in der Leberbouillonmischkultur erst zu wachsen begann, wenn der *Bac. putrificus* die Leber zwei bis drei Tage lang abgebaut hatte.

Daraufhin wurden 200 g Pferdeleber mit 650 ccm Bouillon überschichtet, sterilisiert und mit *Bac. putrificus* in Reinkultur geimpft. Nach 14 Tage langem Abbau wurde abermals sterilisiert, die Flüssigkeit zur Reinigung von Bakterienleichen durch das Heimsche Asbestfilter getrieben und das Filtrat teils als Bouillon verwendet (abgebaute und frische Bouillon zu gleichen Teilen), teils zu Nähragar verarbeitet.

Bei einer Aussaat in erster bis vierter Verdünnung entwickelte sich nun neben den bekannten Putrificuskolonien auch eine neue Form. Sie hat wenig Charakteristisches an sich und gleicht in ihrer Anlage einem dunkeln, rundlichen bis wetzsteinförmigen Kern mit glatten Rändern, die höchstens kleine Höcker tragen. Eine Zeichnung ist nicht aufzulösen. Allmählich, aber sehr langsam, im Laufe von Wochen, bildet sich um dieses dunkle Zentrum eine helle Zone, die — gleichgültig ob die Kernanlage rundlich oder oval war — ziemlich genau Kreisform annimmt und leicht gestrichelt erscheint; ihre Peripherie schneidet scharf gegen den Nährboden ab.

Einmal isoliert und an nicht abgebaute Nährböden gewöhnt, kam der Bazillus auch in frischem Agar zur Kolonienbildung. Diese Kolonien unterscheiden sich aber nicht wesentlich von den in abgebautem Agar gewonnenen: um einen dunklen Kern bildet sich eine nach außen sich immer mehr aufhellende Zone mit scharfer äußerer Begrenzung; die Zeichnung ist deutlicher

und erinnert bei manchen etwas an die der Typhuskolonien (Fig. 8). Wenn auch die ganze Anlage der Kolonie geschlossen ist, so sieht man doch von einzelnen Kernen auch feine Ausläufer ein wenig in die helle Hofzone hineinstrahlen.

Die Agaroberflächenkolonien sind noch weniger charakteristisch als die Tiefenkolonien; es sind lediglich flache, runde, weißliche Auflagerungen ohne jede Zeichnung.

Der Agarstich ist ebenfalls wenig charakteristisch. Er ähnelt etwas dem des *Bac. putrificus*, indem längs des Stichkanals viele kleine Kolonien sich ansetzen.

Bei Zimmertemperatur habe ich kein Wachstum beobachtet.

Der Bazillus selbst ist ein schlankes Stäbchen, das in flüssigen wie in festen Substraten ziemlich langsam wächst. Die einzelnen Individuen liegen meistens jedes für sich. Schon kurze Ketten von zwei bis drei Gliedern sind sehr selten; mitunter treten aber lange Scheinfäden auf, die sich durch das ganze Gesichtsfeld hindurchziehen können (Fig. 12).

Der Bazillus ist mit den gewöhnlichen Anilinfarben färbbar. Die Färbung nach Gram ist im allgemeinen positiv, schwankt aber etwas. In Leberbouillon-Pfuhl über Pyrogallol ist er nach 24 Stunden JG +, vom zweiten Tage ab tritt aber bei Einwirkung von 15 Tropfen Alkohol teilweise schon eine ziemliche Entfärbung ein. Besser ist die Gramsche Färbung bei Leberbouillonkulturen nach Tarozzi. In älteren Kulturen, besonders in Faulgemischen, also zum Beispiel vergesellschaftet mit *Bac. putrificus*, tritt bei ihr eine deutliche Körnelung des Bakterienleibes hervor (Fig. 13).

Je nach dem Nährsubstrat ist die äußere Form des Stäbchens etwas veränderlich.

In Bouillon schlank, mit abgerundeten Enden, nimmt es in Agarkulturen kräftigere Formen an und erscheint dabei etwas kürzer. Besonders schlank ist es in Gesellschaft mit *Bac. putrificus* in faulenden Substraten, in denen neben den kräftigen *Putrificus*stäbchen seine Borstenform am deutlichsten zutage tritt (Fig. 14).

Der Bazillus hat eine lebhaftere Eigenbewegung, die durch zahlreiche seitenständige Geißeln ermöglicht wird (Fig. 15).

Die Sporen werden normal an den Polen der Stäbchen getrieben. Jedes Stäbchen bildet nur eine Spore. An dem einen Pol bildet sich zunächst eine vollkommen runde, knopfartige Verdickung von demselben Färbungsvermögen wie das Stäbchen selbst: das bekannte Bild der Trommelschlegel. Dieses kugelige Anhängsel nimmt an Umfang zu und beginnt sich zu differenzieren: das Licht stärker zu brechen und bei den gewöhnlichen Färbungsmethoden keine Farbe mehr anzunehmen. Mit fortschreitendem Wachstum ändert die Spore ihre Form; das kugelige Gebilde streckt sich in die Länge, bis es eine länglich ovale Gestalt bekommen hat, und spitzt sich nach dem freien Pol häufig zu. Andere Sporenanlagen bevorzugen nicht dieses einseitige Längenwachstum, sondern wachsen der runden Anlage entsprechend gleichmäßig weiter, wodurch sie schließlich das typische Aussehen der Tetanusbazillen bekommen (Fig. 16). Die Sporen sind, solange sie mit der Mutterzelle in Verbindung stehen, von einem feinen Saum vegetativer Substanz umgeben. Bei vielen von ihnen ist dieser an der Übergangsstelle von Bakterienleib und Spore so fein, daß er färberisch kaum darstellbar ist, während er sich nach dem freien Sporende zu kappenartig verdickt.

Die Entstehung der Sporen ist aber nicht unbedingt an einen Pol des Stäbchens gebunden; sie kann auch in einer Zellhälfte, mehr oder weniger vom Pol entfernt, stattfinden, ja fast bis in die Mitte des Stäbchens verlagert sein, Variationen der Versporung, wie sie von v. Hibler speziell beim Tetanusbazillus beobachtet worden sind. Immer aber hat in unserem Falle die Sporenanlage Kugelform (Fig. 17).

Ein auffallendes Bild erhält man mitunter bei Präparaten aus flüssigen Substraten: durch einen deutlichen Zwischenraum von dem Stäbchen getrennt, sieht man über dem einen Pol des Bakteriums ein rundes oder ein klein wenig längliches Gebilde, so daß das Ganze aussieht wie ein „i“. Dieses einem i-Punkt ähnliche Gebilde hat entweder die Farbe des Stäbchens oder zeigt in seinem Innern sporenartige Differenzierung (Fig. 18).

Bienstock beschreibt einen ähnlichen Vorgang bei seinem *Bac. putrificus*. Er sagt:

„Allmählich schnürt sich die Spore ab, bleibt noch eine kurze Zeit durch ein unsichtbares Schleimstück mit dem

Stäbchen verbunden, — nur so ist es zu erklären, wenn die Spore, obwohl vom Stäbchen durch einen deutlichen Intervall geschieden, doch noch an dessen Bewegungen teil nimmt, — um sich endlich vollständig frei zu machen.

Das Stäbchen, das nunmehr seinen Beruf erfüllt hat, verschwindet.

. . . und die fertige Spore schlüpft dann nicht, wie bei den anderen, aus, sondern schnürt sich von dem Stäbchen ab.“

Ob man es hier mit einer regelrechten Sporenbildung zu tun hat, will ich dahingestellt sein lassen; vielleicht handelt es sich auch um einen Vorgang, wie ihn R. Graßberger bei Untersuchungen über den Rauschbrandbazillus folgendermaßen charakterisiert:

„Eine überaus oft zu beobachtende Versporungskrankheit ist die, daß die Sporenanlagen massenhaft unreif abfallen und sie liegen dann im Gesichtsfeld wie Kokken verstreut umher.“

Wie schon erwähnt, ist dieser Bazillus in fast allen Faulgemischen des Herrn Professor Heim aufgetreten, so daß man an einen ursächlichen Zusammenhang zwischen ihm und der Fäulnis glauben möchte. Es ist uns aber nicht gelungen, mit den Reinkulturen eine Zersetzung von Eiweiß in Form von Fibrin, Hühnereiweiß, Blutserum oder Leberstückchen zu bewirken; auch Gärung blieb stets aus. Trotzdem konnte man sich des Eindruckes nicht erwehren, als ob eine durch eine Mischkultur des *Bac. putrificus* und des *Bac. postumus* hervorgerufene Fäulnis lebhafter als die durch Reinkulturen des *Bac. putrificus* bewirkte verlaufe. Ist auch auf die genannten Eiweiße keine Einwirkung nachweisbar gewesen, so wäre es immer noch möglich, daß eine solche dann zur Geltung kommt, wenn der *Bac. putrificus* das Eiweiß bis zu einem gewissen Grade gespalten hat, und daß nunmehr der *Bac. postumus* die weitere Zersetzung bestimmter Gruppen übernimmt.

3. Bacillus botulinus.

Der *Bacillus botulinus* ist von van Ermengem bei der Fleischvergiftung von Ellezelles im Jahre 1895 gefunden und beschrieben worden. Seine Verbreitung scheint nicht sehr

groß zu sein; denn außer jenem Fall im Hennegau haben ihn nur P. Römer 1900 bei einem Fall in Oberhessen und Landmann bei der Darmstädter Vergiftung 1904 wiedergefunden.

Immerhin sind verschiedentlich Fleischvergiftungen beschrieben worden, bei denen zwar nicht die Erreger festgestellt wurden, die aber der Beschreibung der Krankheitsbilder zufolge annehmen lassen, daß sie mit großer Wahrscheinlichkeit durch den *Bac. botulinus* hervorgerufen worden sind.

Die ältere Literatur hierüber ist von van Ermengem erwähnt; später wird ein solcher Fall unter anderem von Lauk in der Münchener medizinischen Wochenschrift berichtet. Eine mit dem Material gefütterte Katze wurde in der typischen Weise krank.

Die Morphologie und Wachstumseigentümlichkeiten des *Bazillus* sind uns eigentlich nur durch die Arbeiten van Ermengems bekannt. Erst in neuerer Zeit hat ihn v. Hibler in den Kreis seiner Untersuchungen einbezogen. v. Hibler, der mit drei verschiedenen Stämmen arbeitete, stellt eine auffallende Verschiedenheit seiner Stämme gegenüber dem van Ermengemschen fest und sucht diese Erscheinung mit einem atypischen Verhalten des van Ermengemschen Stammes zu erklären.

Wie ich eingangs erwähnt habe, zeigten unsere *Botulinus*-stämme, die beide von Král und zwar der eine im Jahre 1903, der andere 1909 bezogen wurden, eine überraschende Übereinstimmung mit dem *Bac. putrificus*, die sich vor allen Dingen in der Zersetzung von Milch und Leber-Leberbouillon sowie in dem Fehlen jeder Pathogenität äußerte. Es deckten sich hierin unsere Befunde mit denen v. Hiblers.

Wir gingen aber noch weiter. Nachdem wir morphologisch und kulturell eine ziemlich nahe Verwandtschaft zwischen dem *Bac. botulinus* und dem *Bac. putrificus* festgestellt zu haben glaubten, ergab sich für uns die Frage, wie sich die beiden wohl gegenüber der Agglutination durch spezifisches Serum verhalten würden.

Zu diesem Zwecke wurden einem Kaninchen acht Wochen lang einen Tag alte *Bac. putrificus*-Kulturen in von Woche zu Woche von 1—6 ccm steigenden Dosen intravenös injiziert. Die Kulturen waren in Leber-Leberbouillon gezüchtet worden, die vor der Injektion filtriert wurde.

Zehn Tage nach der letzten Injektion wurden dem Kaninchen einige Kubikzentimeter Blut entnommen und die Agglutination in den Verdünnungen 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 und 1 : 1000 angesetzt. Sie ergaben sämtlich positive Resultate und zwar sowohl bei unseren *Bac. putrificus*- wie bei unseren sogen. *Bac. botulinus*-Stämmen. Die Verwandtschaft dieser beiden mußte also so nahe sein, daß man sie geradezu identifizieren konnte.

Es ist höchst unwahrscheinlich, daß der *Bac. botulinus* im Laufe der letzten zehn Jahre eine so gewaltige Umwandlung erfahren haben soll, daß man gewissermaßen von einer Mutation sprechen müßte, oder daß die mangelnde Übereinstimmung mit den neueren Kulturen in einem atypischen Verhalten des van Ermengem'schen Stammes gelegen sein soll. Gewiß kann einmal ein Stamm ein atypisches Verhalten zeigen, doch werden dabei immerhin genug Anklänge an seine eigentliche Natur erhalten bleiben. Hier aber bestehen nur Gegensätze.

Da sich, wie gesagt, die Annahme eines nahen verwandtschaftlichen Verhältnisses zwischen den beiden Bazillen mit den Befunden van Ermengem's in keiner Weise in Einklang bringen läßt und wir auch nicht geneigt waren, die Ursache für die großen Differenzen zwischen den Berichten van Ermengem's und unseren eigenen Beobachtungen lediglich in einem atypischen Verhalten des van Ermengem'schen Stammes zu suchen, erbatem wir uns von verschiedenen Instituten Botulinuskulturen, um sie mit den unsrigen zu vergleichen. Wir wandten uns dazu an Herrn Prof. van Ermengem in Gent, an drei größere staatliche Institute in Deutschland, an das Pasteursche Institut in Paris und an Herrn Prof. v. Hibler in Innsbruck

Da ergab sich denn, daß nur das Institut für Infektionskrankheiten in Berlin über einen Stamm verfügte, der Eigenschaften zeigte, die sich mit den van Ermengem'schen Beobachtungen deckten: er wurde von unserem auf *Bac. putrificus* eingestellten Serum nicht agglutiniert. Was aber von Kräl für *Bac. botulinus* ausgegeben wird, ist nichts als der *Bac. putrificus*.

Der *Bac. botulinus* stellt, wie schon van Ermengem hervorgehoben hat, der Züchtung teilweise recht beträchtliche Schwierigkeiten entgegen. Ich habe z. B. mit der Buchner-Röhre keine günstigen Ergebnisse gehabt. Für Röhren von

23 cm Länge und 26 mm lichter Weite habe ich bei Verwendung von etwa 25 ccm 10%iger KOH-Lösung die Menge des Pyrogallols zwischen 0,25—4,0 g variiert; aber die wenigen Erfolge waren nur Zufallstreffer: in der Regel blieb die Entwicklung aus, höchstens 12% der angesetzten Röhren brachten Wachstum und zwar bei verschiedenem Pyrogallolgehalt. Dieses negative Resultat gilt auch für die über Pyrogallol gehaltenen Milchkulturen.

Milchkulturen sind besonders geeignet, eine leichte und gute Unterscheidung zwischen dem *Bac. botulinus* und dem *Bac. putrificus* zu ermöglichen. Während nämlich der *Bac. putrificus* in Milch über Pyrogallol sehr üppig wächst und sie in der durch die Untersuchungen *Bienstocks* bekannten Weise verändert, sind meine *Botulinus*milchkulturen über Pyrogallol durchweg ergebnislos geblieben.

In den wenigen Leberbouillonkulturen, die über Pyrogallol angingen, blieb die Gärung aus, auch bei 23°. Es bildete sich bei klar bleibender Bouillon ein mehr oder weniger reichlicher Bodensatz, und erst beim Umrühren mit dem Platindraht erfolgte ein deutliches Aufschäumen. Die Stäbchen entfärbten sich sehr leicht nach Gram, ihre Sporenbildung war mangelhaft.

Als vorzüglicher Nährboden für den *Bac. botulinus* hat sich bei diesen Versuchen die Leber-Leberbouillon gezeigt. Der Bazillus wuchs darin zu großen kräftigen Stäbchen heran (Fig. 20), deren Färbbarkeit nach Gram etwas schwankte. In der Regel werden sie leicht entfärbt. Schon van Ermengem hat auf eine Kontrolle der verwendeten Alkoholmenge aufmerksam gemacht. 5—7 Tropfen Alkohol zu überschreiten ist m. E. im allgemeinen nicht ratsam.

Die Stäbchen liegen meistens allein, doch gehört die Bildung von kleineren Verbänden nicht eben zu den Seltenheiten.

Die Bewegung in den wenigen über Pyrogallol gewonnenen Kulturen war, wie schon der äußere Anblick — klare Bouillon, Bodensatz — erwarten ließ, sehr mangelhaft; nur vereinzelt schoben sich ein paar Bazillen träge durch das Gesichtsfeld. Hingegen ist die Bewegung in den Leber-Leberbouillonkulturen recht lebhaft und erinnert sowohl in ihrer Lebhaftigkeit wie in ihrer Art sehr an die der Heubazillen. Dieses Durcheinanderwimmeln fängt aber schon nach einer halben

Stunde, jedenfalls unter dem Einfluß des Sauerstoffes, an zu erlahmen, um nach einer Stunde ganz aufzuhören. Die Stäbchen bleiben dann völlig unbeweglich liegen.

Die Gärung, die in den Kulturen über Pyrogallol sich nur durch ein Aufbrausen beim Umrühren bemerkbar machte, ist in den Leber-Leberbouillonkulturen sehr intensiv. Sie wird, wie das Wachstum überhaupt, durch die Temperaturverhältnisse beeinflusst, worauf gleichfalls schon van Ermengem hingewiesen hat. Niedrige Temperaturen zwischen 20 und 23° sind ihm am zusagendsten. Sein Wachstum beginnt dabei meistens erst am zweiten Tage nach der Aussaat, die Gärung dauert etwa 14 Tage. Hohe Temperaturen dagegen verursachen auf Kosten der Versporungsfähigkeit Involutionsformen, und die Gärung ist bei großer Intensität nach drei Tagen vorüber.

Die Versporung beginnt am vierten Tage einzusetzen, am fünften Tage treten schon einzelne freie Sporen auf. Die Bildung der großen Sporen (Fig. 21) erfolgt in den Endstücken der Stäbchen, ohne sich sonderlich von dem für die Mehrzahl der Anaerobier bekannten Typus zu unterscheiden.

Wesentlich für ein gutes Wachstum ist die Alkaleszenz. Der Bazillus liebt ausgesprochen alkalische Nährsubstrate, doch stehen der von van Ermengem angegebenen hochprozentigen Alkalisierung gewisse Bedenken entgegen. 10 ccm Normalsodalösung z. B., zu 100 ccm Nährgelatine zugesetzt, schädigen das Erstarrungsvermögen derselben zu sehr. Die Gelatine wird nicht mehr eigentlich fest, sondern bildet eine Art derber Gallerte. Infolgedessen kommt es in solcher Gelatine zu keiner Kolonienbildung, sondern es tritt sofort Verflüssigung ein. Auch 5 ccm auf 100 ccm Nährgelatine ist noch zu reichlich. So tritt beispielsweise in Stichkulturen schon am dritten Tage eine vollständige Verflüssigung ein unter so energischer Gärung, daß, wenn man die Gelatine — wie man dies ja bei Anaerobiern gern tut — zum besseren Luftabschluß mit einer Agarschicht übergießt, dieser Agarpfropf herausgeschleudert wird und die Gelatine aus dem Reagensglase herausquillt; im Glase selbst aber bleibt nur eine lockere Schaummasse.

Um die Gelatine nicht allzu rascher Verflüssigung anzusetzen und doch ein gutes Wachstum zu erzielen, braucht man ein Prozent Normalsodalösung auf 100 ccm Nährgelatine nicht

zu überschreiten. Es ist ja auch van Ermengem im allgemeinen nicht über diese Konzentration hinausgegangen.

Die Kolonien in Gelatine in hoher Schicht sind von rundlicher, geschlossener Form mit Höckerbildung an der Peripherie. Eine Zeichnung ist auch bei jungen Kolonien nicht aufzulösen.

In Agarplatten unter Glimmer wächst der Bazillus nach dem Typus der Anaerobier mit zerschlissener Kolonienbildung (Fig. 19).

Pathogenität war von den sieben von mir untersuchten Stämmen nur dem Stamm des Instituts für Infektionskrankheiten eigen. Von den sechs anderen angeblichen Botulinuskulturen blieben selbst beträchtliche Mengen von 0,5 ccm, weißen Mäusen subkutan unter die Rückenhaut injiziert, wirkungslos.

Zur Injektion wurden regelmäßig vier Tage alte, bei 23° gezüchtete Leber-Leberbouillonkulturen verwendet, die in großen und kleinen Dosen nach wenig Stunden den Tod der Versuchstiere — Mäuse und Meerschweinchen — herbeiführten. Bei den Meerschweinchen erfolgte die Injektion unter die Bauchhaut.

Die größte verwendete Dosis betrug 0,2 ccm Kultur — Tod nach 28 Stunden, die kleinste 0,005 ccm Kultur — Tod zwischen 28 und 38 Stunden. Nach einer kurzen, je nach der Injektionsmenge zwischen 6—10 Stunden schwankenden Inkubationszeit bleiben die sonst munteren Tierchen zunächst unbeweglich auf einer Stelle kauend sitzen. Nur der starre, in die Ferne gerichtete Blick ist in diesem Moment der Erkrankung besonders auffallend. In einem späteren Stadium verkriechen sich die Tiere in eine Ecke ihres Käfigs, aus der sie nichts zu vertreiben vermag. Der Körper ist flach auf den Boden gedrückt, der Hals lang auf dem Boden ausgestreckt, die Beine sind entweder ganz unter den Leib gezogen oder, namentlich die hintere Extremität, weit ausgestreckt; die Atmung ist langsam unter starker Inanspruchnahme der Bauchmuskulatur, und von Zeit zu Zeit läuft ein wurmartiges Ringeln durch den Körper. In dieser Stellung verenden die Tiere.

Bei der Sektion zeigten sich im allgemeinen keine Veränderungen; nur einmal waren um und in der Leber viele große Blutergüsse zu sehen. Bakterien waren in Organen, Leber und

Milz sowie in den Blutergüssen weder im Ausstrich noch kulturell nachweisbar. Kleinere Hämorrhagien fanden sich zweimal an der Infektionsstelle. In beiden Fällen wurden Kulturen des *Bac. botulinus* gewonnen.

In den anderen Fällen unterschied sich die Infektionsstelle durch kein solches äußerliches Zeichen von der übrigen Bauchdecke, und es konnte mit Sicherheit keine Stelle als Infektionsort bezeichnet werden. Es ist daher anzunehmen, daß diese Hämorrhagien nicht durch die Injektion an sich verursacht worden sind, vielmehr dadurch, daß die Kanüle nicht genau zwischen Haut und Bauchdecke stand, wobei die Bauchmuskulatur ein wenig verletzt wurde.

Schlußsätze.

1. Zur Züchtung von Anaerobiern in flüssigen Nährmitteln ohne Luftabschluß eignet sich am besten eine aus Rinderleber bereitete Bouillon, der gekochte Stückchen Pferdeleber zugesetzt werden (S. 217).
2. Die Züchtung in Buchnerschen Röhren kann für gewisse Zwecke, z. B. Serumbouillon, nicht entbehrt werden. Für Massenverbrauch können aus Billigkeitsrücksichten kleinere Röhrrchen Verwendung finden (S. 218).
3. Die Leberbouillon ist auch zur Bereitung von festen Nährböden mit Agar und Gelatine zu empfehlen (S. 230).
4. Zur Isolierung der Kolonien und späteren Abimpfung ist der mit einer Glimmerscheibe bedeckte feste Nährboden sehr vorteilhaft. Man legt die Verdünnungen wie bei Aerobiern an und gießt dann eine zweite Nährbodenschicht darüber, auf die man vor dem völligen Erstarren eine möglichst große Glimmerscheibe unter Vermeidung von Luftblasen deckt (S. 227).
5. Nach dem derzeitigen Stand unserer Kenntnis der Fäulnis kommt für die erste Auflösung des Eiweißes vor allen Dingen der *Bac. putrificus* in Betracht. Später treten andere Anaerobier, z. B. *Bac. postumus*, auf.
6. Dieser *Bac. postumus* ließ sich erst dadurch in Reinkulturen gewinnen, daß man ihm die Zersetzungsprodukte des *Bac. putrificus* gab. Die Reinkultur wuchs dann auch auf den üblichen Nährböden (S. 242).

7. Der als *Bac. botulinus* von Kräl wiederholt bezogene Stamm war kein *Bac. botulinus* van Ermengem, sondern *Bac. putrificus* (S. 246).

Bemerkungen zu den Photogrammen.

Die beigegebenen Photogramme sind teils von Herrn Professor Heim, größtenteils von mir aufgenommen worden. Die Aufnahmen erfolgten unter strenger Beobachtung der in dem Lehrbuche der Bakteriologie von Heim aufgestellten Grundsätze, die ich als bekannt voraussetzen darf. Insonderheit wurde jede Retouche, auch die des Untergrundes, vermieden und lieber ein kleiner, durch ein nicht zu umgehendes Schmutzpartikelchen bedingter Schönheitsfehler bestehen gelassen, um ein naturgetreues Bild wiederzugeben. Die einzige Ausnahme bildet das Photogramm Fig. 7, eine Agartiefenkolonie des *Bac. putrificus*. Wer mit der Mikrophotographie zerschlissener Kolontypen anaerobiotischer Bazillen vertraut ist, weiß, mit welchen Schwierigkeiten eine gute Wiedergabe der zarten Ausläufer bei einer einigermaßen brauchbaren Durchleuchtung des Innern verbunden ist. Es versteht sich von selbst, daß die im Vergleich zu dem übrigen Teil des Negativs sehr dünne Stelle auf der Kopie zu einem großen, unschönen, bronzefarbenen Klecks werden muß. Um diesen störenden Kontrast wenigstens etwas abzutönen, wurde auf diesem Negativ die den Kern der Kolonie wiedergebende Stelle mit einer dünnen Schicht wasserlöslichen Karminlackes überzogen, wodurch der sonst dem Bild anhaftende harte Ausdruck einen ruhigeren Ton erhält. Ich glaube, daß dieser kleine Eingriff, der an der Wahrheit des Bildes nichts ändert, jederzeit verantwortet werden kann.

In recht störender Weise machen sich bei der Aufnahme von Kolonien auch sehr häufig kleinere oder größere Kratzer oder ähnliche Fehler im Boden der Petrischalen bemerkbar. Wenn man auch möglichst bemüht ist, die Schalen beim Übereinanderstellen durch Zwischenlagen von Filtrierpapier vor Reibungen zu schützen, so sind doch auf die Dauer mancherlei Verletzungen nicht zu vermeiden. Gleichzeitig mit den Kolonien werden natürlich auch diese Fehler im Glase von der photographischen Platte festgehalten und beeinträchtigen die Schönheit des Bildes. Diese unangenehme Begleiterscheinung hat

Herr Professor Heim in ebenso einfacher wie sicherer Weise dadurch beseitigt, daß er hinter der aufzunehmenden Kolonie auf dem äußeren Boden der Schale ein Deckgläschen mit Immersionsöl oder Kanadabalsam befestigt. Hierdurch wird eine Korrektur der Strahlenbrechung herbeigeführt, die es ermöglicht, sofern keine Mängel des Nährbodens vorliegen, die wiederzugebende Kolonie sich von einem absolut reinen Untergrund abheben zu lassen.

Dieses Hilfsmittel hat sich bei den vielen Aufnahmen, die im Institut gemacht werden, so vorzüglich bewährt, daß es bei allen einschlägigen Aufnahmen, auch bei anscheinend intakten Schalen, zur Erhöhung der Klarheit des Untergrundes angewendet wird.

Am Schlusse meiner Arbeit drängt es mich, Herrn Professor Dr. Heim für die allzeit liebenswürdige und tatkräftige Unterstützung, mit der er meine Arbeit förderte, insbesondere auch für die freundliche Einführung in die schwierige Technik der Mikrophotographie, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Erklärungen zu den Tafeln.

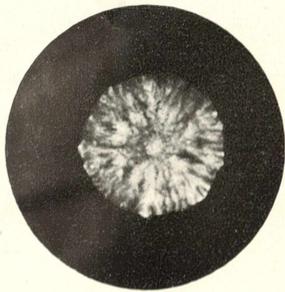
- Fig. 1. *Bac. putrificus* (Stamm Kräl). Tiefenkolonie in gewöhnlichem Agar, 20 Tage alt, gezüchtet im Maassenschen Apparat. Natürliche Größe.
- Fig. 2. *Bac. tetani*. Kolonie in Leberbouillonagar in doppelter Schicht unter Glimmer, 3 Tage alt. 5,2 fach.
- Fig. 3. *Bac. putrificus* Bienstock. Haut- und Kettenbildung in Leberbouillon mit Leberstückchen, 1 Tag alt. Gramsche Färbung. 1000fach.
- Fig. 4. *Bac. tetani*. 8 Tage alte Leberbouillonkultur über Pyrogallol, filtriert, zentrifugiert und viermal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Gramsche Färbung. 1000fach.
- Fig. 5. *Bac. putrificus* Bienstock. Leberbouillon mit Leberstückchen, 3 Tage alt. Gramsche Färbung. 1000fach.
- Fig. 6. *Bac. putrificus* Bienstock. Geißelfärbung nach Zettnow. 1000fach.

- Fig. 7. *Bac. putrificus* Bienstock. Kolonie in Leberbouillonagar in doppelter Schicht unter Glimmer, 7 Tage alt. 4 fach.
- Fig. 8. *Bac. postumus*. Kolonie in Leberbouillonagar in doppelter Schicht unter Glimmer, 7 Tage alt. 30 fach.
- Fig. 9. *Bac. putrificus* (Stamm Krål). Randzeichnung einer 20 Tage alten Tiefenkolonie in gewöhnlichem Agar, gezüchtet im Maassen-schen Apparat. 25 fach.
- Fig. 10. *Bac. putrificus* Bienstock (links) und Stamm Krål (rechts). Stich in Leberbouillongelatine, überschichtet mit Agar, 5 Tage alt, bei 23° gezüchtet. Natürliche Größe.
- Fig. 11. *Bac. putrificus* (Stamm Krål). Ausläufer einer 2 Tage alten Oberflächenkolonie, gezüchtet auf gewöhnlichem Schrägagar im Reagenzglas über Pyrogallol. 25 fach.
- Fig. 12. *Bac. postumus*. Fadenbildung. Leberbouillon über Pyrogallol, 3 Tage alt. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 13. *Bac. postumus*. Körnelung des Zelleibes. Leberbouillon, 3 Tage über Pyrogallol bei 37°, 4 Tage unter Luftzutritt bei Zimmertemperatur gestanden. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 14. *Bac. putrificus* und *Bac. postumus* in Mischkultur. Leberbouillon mit Leberstückchen, 4 Tage alt, filtriert und zentrifugiert. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 15. *Bac. postumus*. Geißelfärbung nach Zettnow. 1000 fach.
- Fig. 16. *Bac. postumus*. Verschiedene Typen der Sporenbildung (rund, oval etc.). Leberbouillon über Pyrogallol, 3 Tage alt. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 17. *Bac. postumus*. Unregelmäßige Sporenbildung. Leberbouillon über Pyrogallol, 3 Tage alt. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 18. *Bac. postumus*. i-punktähnliches Gebilde. Leberbouillon über Pyrogallol, 3 Tage alt. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 19. *Bac. botulinus*. Kolonie in Leberbouillonagar in doppelter Schicht unter Glimmer, 2 Tage alt, bei 23° gezüchtet. 30 fach.
- Fig. 20. *Bac. botulinus*. Leberbouillon mit Leberstückchen, 2 Tage alt, bei 23° gezüchtet, filtriert, zentrifugiert und mit 1%igem Formalinwasser gewaschen. Gramsche Färbung. 1000 fach.
- Fig. 21. *Bac. botulinus*. Sporenbildung. Leberbouillon mit Leberstückchen, 5 Tage alt, bei 23° gezüchtet, filtriert, zentrifugiert und mit 1%igem Formalinwasser gewaschen. Gramsche Färbung. 1000 fach.

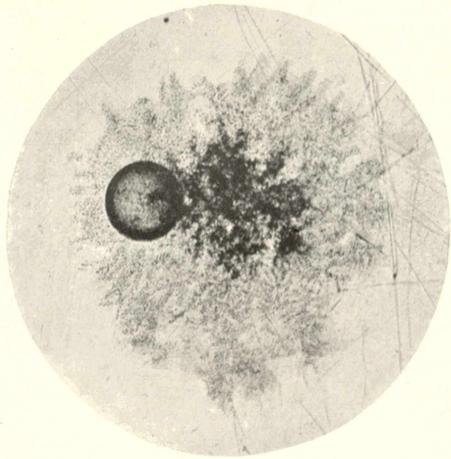
Literaturverzeichnis.

- Bienstock, B., Über die Bakterien der Fäzes. Zeitschrift für klinische Medizin, Bd. 8, pag. 1.
- Untersuchungen über die Ätiologie der Eiweißfäulnis. Archiv für Hygiene, Bd. 36, pag. 335.

1.



2.



3.



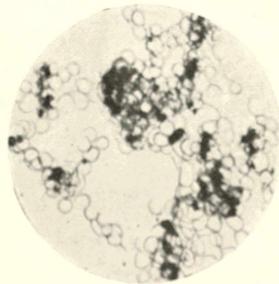
4.



5.



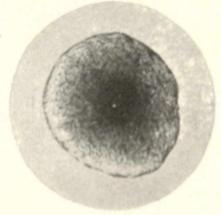
6.



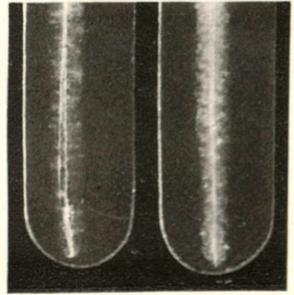
7.



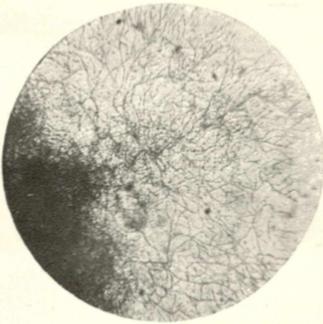
8.



10.



9.



12.



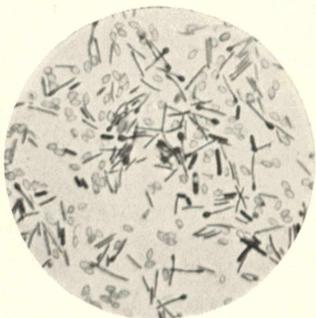
11.



13.



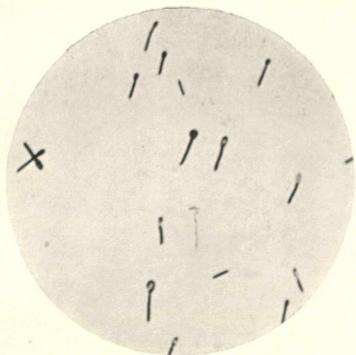
14.



15.



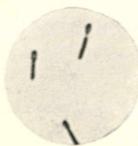
16.



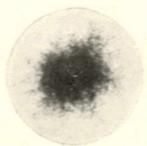
17.



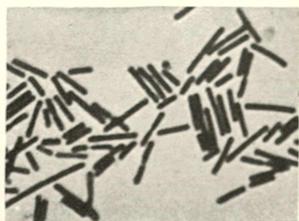
18.



19.



20.



21.



- Botkin, S., Eine einfache Methode zur Isolierung anaerober Bakterien. *Zeitschrift für Hygiene*, Bd. 9, pag. 383.
- Buchner, H., Eine neue Methode zur Kultur anaerober Mikroorganismen. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Bd. 4, pag. 149.
- Burri, R. und Kürsteiner, I., Ein experimenteller Beitrag zur Kenntnis der Bedeutung des Sauerstoffzuges für die Entwicklung obligat anaerober Bakterien. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 2. Abt., Bd. 21, pag. 289.
- Cohn, F., Kryptogamenflora von Schlesien. 3. Bd, 1. Hälfte. 1889.
- Eisenberg, *Bakteriologische Diagnostik*. 3. Aufl. 1891.
- van Ermengem, E., Über einen neuen anaeroben Bazillus und seine Beziehungen zum Botulismus. *Zeitschrift für Hygiene*, Bd. 26, pag. 1.
- Fehrs und Sachs-Mücke, Beitrag zur Züchtung und Isolierung von Anaerobiern. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Orig. Bd. 48, pag. 122.
- Ferrán, J., Über das aerobische Verhalten des Tetanusbazillus. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Bd. 24, pag. 28.
- Ghon, A. und Sachs, M., Über die anaerobe Züchtung. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Orig. Bd. 32, pag. 403.
- Graßberger, R., Morphologie des Rauschbrandbazillus und des Ödem-bazillus. *Archiv für Hygiene*, Bd. 48, pag. 1.
- Grixoni, G., Sulla biologia degli anaerobi. *Giorn. Med. del Esercito*. 1905. Ref. im *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt. Referate, Bd. 38, pag. 17.
- Hammerl, H., Ein Beitrag zur Züchtung der Anaeroben. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Bd. 30, pag. 658.
- Harras, P., Zur Frage der aeroben Züchtung sogenannter obligat anaerober Bakterien. *Münchener medizinische Wochenschrift* 1906, Nr. 46, pag. 2237.
- Hata, S., Über eine einfache Methode zur aerobischen Kultivierung der Anaeroben, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Toxinproduktion. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Orig. Bd. 46, pag. 539.
- Heim, L., *Lehrbuch der Bakteriologie*. 3. Aufl. Stuttgart, F. Enke. 1906.
- Hesse, W. und R., Über Züchtung der Bazillen des malignen Ödems. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1885, Nr. 14, pag. 214.
- v. Hibler, E., Beiträge zur Kenntnis der durch anaerobische Spaltpilze erzeugten Infektionskrankheiten des Menschen und der Tiere etc. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Bd. 25, pag. 513.
- Untersuchungen über die pathogenen Anaeroben etc. 1908.
- Kamen, L., Eine einfache Kulturschale für Anaerobien. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Bd. 12, pag. 296.
- Kindborg, E. und A., Über eine neue Farbenreaktion zur Erkennung des Typhusbazillus und verwandter Arten im Plattenausstrich. *Zentralbl. für Bakt. etc.* 1. Abt., Orig. Bd. 46, pag. 554.
- Koch, R., Konferenz zur Erörterung der Cholerafrage. *Berliner klinische Wochenschrift* 1884, Nr. 31, pag. 477.
- Kürsteiner, I., Beiträge zur Untersuchungstechnik obligat anaerober Bak-

- terien, sowie zur Lehre von der Anaerobiose überhaupt. Zentralbl. für Bakt. etc. 2. Abt., Bd. 19, pag. 1.
- Landmann, G., Über die Ursache der Darmstädter Bohnenvergiftung. Hygienische Rundschau, 14. Jahrg., pag. 449. 1904.
- Lange, L. Hygienische Rundschau, Bd. 13, pag. 12, Anm. 1903.
- Lauk, 8 Fälle von Wurstvergiftung. Münchener medizinische Wochenschrift 1900, Nr. 39, pag. 1345.
- Lentz, O., Ein neues Verfahren für die Anaerobenzüchtung. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 53, pag. 358.
- Liborius, P., Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien. Zeitschrift für Hygiene, Bd. 1, pag. 115.
- Liefmann, H., Ein einfaches Verfahren zur Züchtung und Isolierung anaerober Keime. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 46, pag. 377.
- Matzuschita, Teisi, Bakteriologische Diagnostik. 1902.
- Migula, W., System der Bakterien. 2. Bd. 1900.
- Passini, Fr., Über das regelmäßige Vorkommen der verschiedenen Typen der streng anaerobischen Buttersäurebakterien im normalen Stuhle. Jahrbuch für Kinderheilkunde, Bd. 57 (7. Bd. der neuen Folge), pag. 87.
- Pfuhl, E., Die Züchtung anaerober Bakterien in Leberbouillon, sowie in Zuckerbouillon und in gewöhnlicher Bouillon mit einem Zusatz von Platinschwamm oder Hepin unter Luftzutritt. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 44, pag. 378.
- Pringsheim, H., Über das Sauerstoffbedürfnis anaerober Bakterien. Zentralbl. für Bakt. etc. 2. Abt., Bd. 21, pag. 673.
- Rivas, D., Ein Beitrag zur Anaerobenzüchtung. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 32, pag. 831.
- Rodella, A., Über anaerobe Mundbakterien und ihre Bedeutung. Archiv für Hygiene, Bd. 53, pag. 329.
- Römer, P., Ein Beitrag zur Ätiologie des Botulismus. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Bd. 27, pag. 857.
- Sanfelice, F., Untersuchungen über anaerobe Mikroorganismen. Zeitschrift für Hygiene, Bd. 14, pag. 339.
- Smith, Theob., Das Gärungskölbchen in der Bakteriologie. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Bd. 7, pag. 502.
- Schattenfroh, A. und Graßberger, R., Über Buttersäuregärung. 1. Abhandlung. Archiv für Hygiene, Bd. 37, pag. 54.
- Tarozzi, G., Über ein leicht in aerober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaerobier gehaltenen Keimen. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 38, pag. 619.
- Tissier, H. und Martelly., Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie. Annales de l'Institut Pasteur, Bd. 16, pag. 865.
- Tizzoni, G., Cattani, I. und Baquis, E., Bakteriologische Untersuchungen über den Tetanus. Zieglers Beiträge etc. Bd. 7, pag. 596.

- Trenkmann, Das Wachstum der anaeroben Bakterien. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Bd. 23, pag. 1038.
- Veillon und Zuber, Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. Arch. de méd. expér. et d'anat. path. 1898, 1. Serie, Bd. 10, pag. 517.
- Wright, James H., A method for the cultivation of anaerobic bacteria. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Bd. 29, pag. 61.
- Wrzosek, A., Beobachtungen über die Bedingungen des Wachstums der obligatorischen Anaerobier in aerober Weise. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 43, pag. 17.
- Weitere Untersuchungen über die Züchtung von obligatorischen Anaerobiern in aerober Weise. Zentralbl. für Bakt. etc. 1. Abt., Orig. Bd. 44, pag. 607.
- Zinsser, H., A simple method for the plating of anaerobic organisms. Studies from the department of pathology of the college of physicians and surgeons Columbia University N. Y. Vol. 9. For the collegiate years 1906—1908, pag. 542.
-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Sozietät zu Erlangen](#)

Jahr/Year: 1909

Band/Volume: [41](#)

Autor(en)/Author(s): Würcker Karl

Artikel/Article: [Über Anaerobiose, zwei Fäulniserreger und Bacillus botulinus 209-257](#)